Adriano Aquino

***Análise proteômica dos ovos de codorna não fertilizados em diferentes
tempos e temperaturas de estocagem***

Tese apresentada ao curso de pós-graduação do
Instituto de Química de São Carlos como requisito
para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2015

Dedicatória

***Dedico esse trabalho a toda minha
família que mesmo distante ajudou- me
dando muito apoio e amor***

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela força para continuar no que tenho prazer em fazer, aos meus familiares por acreditarem em meu potencial e por apoiarem em todas as etapas da vida.

Aos meus irmãos João Bosco, Cleomenes e José Fernando pelo companheirismo mesmo distantes.

Aos meus sobrinhos em especial Wendell e Caroline.

Aos meus queridos amigos do Inácio Barbosa, Sheila, Enalda e Shirley pela grande amizade e pela companhia durante a minha infância até os dias de hoje.

Um agradecimento muito especial ao meu ex-orientador do mestrado em química Prof. Dr. Sandro Navickiene, pois todos os ensinamentos foram muito validos e que levarei para toda a vida.

Aos meus queridos amigos que conquistei durante minha graduação e que os carrego no meu coração: Hugo, Alan, Romário, Michel, Darlisson, Paloma, Wesley, Danielle, Niculau, Senhora Niculal, Karine, Karol e Milinho.

Agradeço ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho pelas oportunidades bem como ao desenvolvimento do trabalho de doutorado em seu grupo de pesquisa BioMics.

A todos os colegas e amigos do BioMicS em especial ao Giorgio, Tiago Mazzu e Paty pela harmonia e alegria no laboratório e principalmente pelo carinho, agradeço.

Agradeço aos professores e funcionário do IQSC em especial ao Ivan, Fabio e Bernadete pela amizade.

A Fernando pelo fornecimento das amostras de ovos de codorna, agradeço.

Agradecimento a CAPES pela bolsa de Doutorado concedida.

*A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu
tamanho original.*

Albert Einstein

Resumo

O uso de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) como modelo animal para estudos relacionados a indústria avícola está crescente em decorrência do aumento no consumo de carne e ovos. O ovo possui várias aplicações e a sua funcionalidade está correlacionada com a composição química e, mais especificamente, com seu alto valor proteico. Contudo, o ovo é um alimento altamente perecível, pois pode perder sua qualidade rapidamente entre o período de estocagem e consumo. A qualidade do ovo pode ser afetada por condições ambientais como tempo e temperatura de estocagem. Parâmetros convencionais como pH, massa e a unidade Haugh são usados para a avaliação da qualidade do ovo. Além disso, técnicas analíticas podem ser utilizadas para a avaliação de qualidade em diversas matrizes alimentares. Assim, o presente trabalho tem como objetivos a avaliação e identificação de proteínas presentes em ovos de codorna japonesa submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem empregando técnicas eletroforéticas e espectrometria de massas, além de, ferramentas estatísticas. Durante estocagem à 0-21 dias, observou um aumento no pH, diminuição na massa do ovo e uma mudança significativa no proteoma das amostras nos períodos de 14 a 21 dias. Além disso, os resultados de análise de componentes principais (PCA) demonstraram a influência da temperatura pela formação de 4 grupos independentes para amostras de albúmen e 3 grupos para as amostras de plasma e fração granular, respectivamente. Para o plasma, as amostras estocadas à 25 °C e controle se agruparam. Já para a fração granular, o agrupamento ocorreu entre as amostras estocadas a 25 °C com a 37 °C, demonstrando similaridade entre si. As proteínas com os níveis significativamente ($p < 0.05$) alterados durante a estocagem pertencem as famílias serpina (ovalbumina), transferrina (ovotransferrina), inibidores Kazal tipo de protease (ovoinibidor). Para a ovotransferrina, proteína encontrada em todas as amostras foi observado a formação de isoformas no albúmen, plasma e fração granular nas amostras estocadas a 37 °C, sendo um bom indicador de controle de qualidade. Por fim, para as amostras de albúmen fracionadas por OFFGEL e analisadas por 1D-PAGE foi observado a formação de isoformas tanto para a ovalbumina quanto para a ovotransferrina bem como a degradação de ovoinibidor nas amostras estocadas por 21 dias a 37 °C, fatos que podem estar associados ao desbaste. Esses eventos afirmam a influência do tempo e temperatura de estocagem na qualidade do ovo de codorna.

Palavras-chave: Codorna; Albúmen; Plasma; Fração granular; Estocagem; 2D-PAGE; OFFGEL; Espectrometria de Massas

Abstract

The use of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) as animal model for studies related to the poultry industry is becoming more common due to the increased consumption of meat and eggs. The egg has a variety of applications and its functionality is correlated to the chemical composition and, more specifically, its high protein value. However, the egg is a highly perishable food, and it can lose its quality between the period of storage and consumption. The egg quality can be affected by environmental conditions such as storage time and temperature. Conventional parameters such as pH and Haugh unit mass are used for egg quality assessment. Furthermore, analytical techniques can be used for quality assessment in various food matrices. This study aims to review and to identify proteins present in Japanese quail eggs submitted at different times and storage temperatures using electrophoretic techniques and mass spectrometry techniques, as well as statistical tools. During storage at 0-21 days, observed an increase in pH, decrease in egg mass and a significant change in the proteome of samples during the 14 to 21 day period. Moreover, the principal component analysis results (PCA) have shown the influence of temperature because of the formation of the four groups to albumin samples and three groups for the plasma and granules fraction samples, respectively. In plasma, the samples stored at 25 ° C and clustered control. As for the granule fraction pooling occurred between samples stored at 25 ° C to 37 ° C, showing similarities among them. The proteins with significant levels ($p < 0.05$) of change during the storage belong to serpin family (albumin), transferrin (ovotransferrin), Kazal type protease inhibitors (ovoinhibitor). Ovotransferrin, a protein isoform found in albumin, plasma and granules fraction samples and was observed the formation of more isoforms in samples stored at 37 ° C, a good to quality control lost indicator. Finally, for the albumen samples that were fractionated by OFFGEL and analyzed by 1D-PAGE, the formation of both isoforms to ovalbumin was observed as well as ovotransferrin and ovoinhibitor degradation in samples stored for 21 days at 37 ° C that can be associated to thinning. These events affirm the influence of time and storage temperature on quail egg quality.

Keywords: Quail; Albumen; Plasma; Granular fraction; Storage; 2D-PAGE; OFFGEL; Mass Spectrometry

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura de um ovo	2
Figura 2 - Ilustração dos processos da técnica eletroforética de 2D-PAGE	7
Figura 3 - Eficiência de 2D-PAGE na separação de diferentes isoformas e alterações na carga global das proteínas	8
Figura 4 - Esquema OFFGEL de fracionamento de proteínas	10
Figura 5 - Amostras de albúmen em diferentes temperaturas, controle, 4, 25 e 37 °C	16
Figura 6 - Amostras de gema, após diluição em 30 mL de água ultrapura Milli-Q®, de ovos de codorna que foram estocadas em diferentes temperaturas (controle, 4, 25 e 37 °C).....	18
Figura 7 - Avaliação da influência do tempo de estocagem na massa de ovos de codorna durante 21 dias à 37 °C.....	24
Figura 8 - Análises por 1D-PAGE das amostras de albúmen, plasma e fração granular de ovos de codorna estocadas durante 0, 7, 14 e 21 dias a 37 °C	26
Figura 9 - Avaliação do tempo de estocagem nas proteínas presentes no albúmen de ovos de codorna por 2D-PAGE.....	27
Figura 10 - Avaliação do tempo de estocagem nas proteínas presentes no plasma de ovos de codorna por 2D-PAGE.....	28
Figura 11 - Avaliação do tempo de estocagem nas proteínas presentes na fração granular de ovos de codorna por 2D-PAGE.....	29
Figura 12 - Análise do proteoma das amostras controle (0 dias de estocagem) de ovos de codorna. (a) plasma, (b) albúmen e (c) fração granular. As identificações das proteínas foram realizadas por LC-MS.	32

Figura 13 - Mapas 2D-PAGE das proteínas de amostras de albúmen de ovos de codorna submetidas as diferentes temperaturas de estocagem. (a) controle; (b) 4 °C; (c) 25 °C) e (d) 37 °C	34
Figura 14 - Gel 2D-PAGE (pH 3-10 e n = 4) de ovos de codorna submetidas as diferentes temperaturas de estocagem (a) controle; (b) 4 °C; (c) 25 °C e (d) 37 °C	35
Figura 15 - Análise de componentes principais de amostras de albúmen (controle, temperatura de 4, 25 e 37 °C)	36
Figura 16 - Gráfico de loading; distribuição das variáveis de acordo com o volume do spot, das amostras de albúmen de ovos de codorna (controle, temperatura de 4, 25 e 37 °C).....	37
Figura 17 - Identificação dos spots diferenciais (numerados acima) em amostras de albúmen estocadas em diferentes temperaturas. Controle (1); 4 °C (2); 25 °C (3); 37 °C (4).....	38
Figura 18 - Identificação dos spots diferenciais nos géis 2D-PAGE que aumentaram ou diminuíram em abundância em comparação com as amostras controle (albúmen fresco 0 dias)	39
Figura 19 - Indicação das regiões de aumento de proteínas com massas moleculares baixas (indicativo de degradação de proteínas maiores) e ampliação da região da proteína ovotranferrina, em que se verifica um aumento do número de spots horizontalmente. (a) controle, (b) 4 °C, (c) 25 °C e (d) 37 °C	41
Figura 20 - Mapa 2D-PAGE das proteínas de amostras de plasma de ovos de codorna submetidas às diferentes temperaturas de estocagem (a) controle; (b) 4 °C; (c) 25 °C e (d) 37 °C	45
Figura 21 - Análise de componentes principais (gráfico de scores) de amostras de plasma (controle, 4, 25 e 37 °C).	46
Figura 22 - Gráfico de loading; distribuição das variáveis de acordo com o volume do spot, das amostras de plasma de ovos de codorna (controle, temperaturas de 4, 25 e 37 °C).....	47

Figura 23 - Variação em abundância nos spots em amostras de plasma controle (1); 4 °C (2); 25 °C (3); 37 °C (4).....	48
Figura 24 – Identificações dos spots diferenciais em amostras de plasma estocadas a diferentes temperaturas.	49
Figura 25 - Identificação dos spots da proteína ovotransferrina em destaque por 2D-PAGE em amostras de plasma submetidos a diferentes temperaturas de estocagem. (a) controle, (b) 4 °C, (c) 25 °C e (d) 37 °C	50
Figura 26 - Mapa 2D-PAGE das amostras da fração granular de ovos de codorna submetidas as diferentes temperaturas de estocagem. (a) controle; (b) 4 °C; (c) 25 °C e (d) 37 °C	52
Figura 27 – Gráfico de scores das amostras de frações granulares estocadas a diferentes temperaturas, em comparação ao controle. (4, 25 e 37 °C)	54
Figura 28 - Gráfico de loading das amostras de fração granular de ovos de codorna (controle, temperatura de 4, 25 e 37 °C).....	55
Figura 29 - Spots diferenciais em amostras de fração granular. Controle (1); 4 °C (2); 25 °C (3); 37 °C (4)	56
Figura 30 - Identificação dos spots diferenciais nos géis 2D-PAGE de fração granular de ovos de codornas.....	57
Figura 31 - Identificação dos spots da proteína ovotransferrina nas diferentes temperaturas de estocagem, em amostra de fração granular. (a) controle, (b) 4 °C, (c) 25 °C e (d) 37 °C	58
Figura 32 - 1D-PAGE das proteínas de amostras de albúmen de ovos de codorna fracionadas por OFFGEL. Os números de 1,5-7,0 correspondem ao intervalo de pH dos reservatórios em ordem crescente de pH da tira. (a) amostra controle e (b) amostras estocada a 37 °C por 21 dias	60

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Relatos de aplicações da eletroforese em gel de poliacrilamida e espectrometria de massas em abordagens proteômicas em amostras de ovos de galinha (albúmen, plasma e fração granular)	9
Tabela 2 - Composição da solução de reidratação usadas na ressuspensão do pellet.....	17
Tabela 3 - Método empregado na focalização das proteínas presentes em albúmen, plasma e fração granular.	19
Tabela 4 - Composição da solução de equilíbrio usadas antes do processo de separação na segunda dimensão.	20
Tabela 5 - Programação empregada no fracionamento das amostras de albúmen por OFFGEL.	21
Tabela 6 - Avaliação da influência do tempo de estocagem no pH do albúmen e gema de ovos de codorna, valores médios de pH e desvios padrões, respectivamente.	24
Tabela 7 - Identificação das proteínas diferenciais presentes no albúmen, das amostras de ovos de codornas estocados nas diferentes temperaturas de estocagens (4, 25 e 37 °C), por espectrometria de massas	43
Tabela 8 - Identificações dos <i>spots</i> (proteínas) diferenciadas presentes no plasma por espectrometria de massas	51
Tabela 9 - Identificação das proteínas diferenciais presentes na fração granular por espectrometria de massas	59

Lista de abreviações e siglas

- 1D-PAGE: (*one-dimensional gel electrophoresis*)
- 2D-PAGE: (*two-dimensional gel electrophoresis*) eletroforese em gel bidimensional
- ACN: (*acetonitrile*) acetonitrila
- BSA: (*bovine serum albumin*) albumina bovina
- CID: (*collision-induced dissociation*) dissociação induzida por colisão
- CO₂: dióxido de carbono
- DDA: (*dependent Acquisition*) Análise dependente de dados
- DTT: (*dithiothreitol*) ditioneitol
- ESI: (*electrospray ionization*) Ionização por eletrosbulização
- ETD: (*electron-transfer dissociation*) dissociação por transferência de elétrons
- FTICR-MS: (*fourier transform ion cyclotron resonance*)
- HDL: (*high-density lipoprotein*) lipoproteína de alta densidade
- HU: (*haugh unit*) unidade Haugh
- IAA: (*iodoacetamide*) Iodoacetamida
- IEF: (*isoelectric focusing*) focalização isoeletrica
- IgG: (*immunoglobulin G*) imunoglobulinas
- IPG: (*immobilized pH gradient*) Gradiente de pH imobilizado
- LC-MS: (*liquid chromatography-mass spectrometry*) Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
- LDL: (*low-density lipoprotein*) lipoproteína de baixa densidade
- LTQ: (*linear Trap Quadrupole*) ions trap linear
- MALDI: (*matrix-assisted laser desorption/ionization*) dessorção/ionização a laser assistida por matriz
- MS: (*mass spectrometry*) espectrometria de massas
- NL: (*nonlinear*) não linear
- N-OTf: (*ovotransferrin N-Lobe*) ovotransferrina
- PC: (*principal component*) componente principal
- PCA: (*principal component analysis*) análise de componentes principais
- pI ponto isoeltrico
- PTM: (*posttranslational modification*) modificação pós traducional

- SDS: (*sodium dodecyl sulfate*) dodecil sulfato de sódio
- SIMCA: (*soft Independent Modeling of Class Analogy*) Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classes
- TCA: (*trichloroacetic acid*) ácido tricloroacético
- TOF: (*time-of-flight*) tempo de voo

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Codorna japonesa.....	1
1.2 Estrutura do ovo.....	1
1.3 Composição proteica do ovo.....	3
1.4 Importâncias da análise do perfil proteico dos ovos	3
1.5 Influência da temperatura sobre qualidade do ovo	4
1.6 Parâmetros convencionais usados para a avaliação da qualidade dos ovos	5
1.7 Abordagens Proteômicas	5
1.8 Técnicas eletroforéticas empregadas na separação de proteínas	6
1.9 Fracionamento de proteínas por eletroforese em OFFGEL.....	9
1.10 Identificação de proteínas por espectrometria de massas	11
1.11 Análise quimiométrica	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Obtenções das amostras de ovos de codornas	15
3.2 Avaliações do tempo de estocagem	15
3.3 Avaliações da temperatura de estocagem	15
3.4 Extrações das proteínas do albúmen	16
3.5 Fracionamento e extração de proteínas da gema de ovos de codorna.....	17

3.6 Quantificações das proteínas totais	18
3.7 Eletroforese Bidimensional.....	19
3.8 Análises quimiométricas	20
3.9 Fracionamento do albúmen por OFFGEL	20
3.10 Digestão e análises dos peptídeos por espectrometria de massas.....	21
3.11 Análises dos Dados	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
4.1 Avaliações do tempo de estocagem no pH, massa e nas proteínas presentes em ovos de codorna.....	23
4.1.1 Influência no pH e massa dos ovos de codorna.....	23
4.2 Avaliações da influência do tempo de estocagem nas proteínas presentes nos ovos de codorna por eletroforese em gel.....	26
4.3 Avaliações das temperaturas de estocagem nas proteínas presentes em ovos de codorna .	30
4.3.1 Estocagem das amostras	30
4.3.2 Análises proteômica do albúmen, plasma e fração granular	31
4.3.3 Análises proteômica do albúmen de ovos de codorna estocados em diferentes temperaturas	33
4.3.4 Análises quimiométricas das amostras de albúmen	36
4.3.5 Análises proteômica das amostras de plasma submetidos a diferentes temperaturas de estocagem	44
4.3.6 Análises quimiométricas das amostras de plasma.....	45
4.3.7 Análise proteômica da fração granular da gema de ovos de codorna submetidos a diferentes temperaturas de estocagem	51

4.3.8 Análises quimiométricas das amostras de fração granular.....	53
4.3.9 Fracionamentos por OFFGEL	59
5 CONCLUSÕES	62
6 PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Codorna japonesa

A ingestão de uma quantidade suficiente de proteínas é de fundamental importância para a saúde física e mental. Entre as fontes de proteínas animais, as aves têm o seu espaço devido a inúmeras vantagens, como baixo investimento para criação, ciclo curto de produção e elevada taxa de postura, de modo que nos últimos anos observou-se que a avicultura de codorna se beneficiou tanto na produção de ovos quanto de carne. Embora a produção de carne de codorna seja maior em alguns países, a criação para a produção de ovos se tornou mais importante no mercado asiático [1–4].

No Brasil, no ano de 2002, o número de codornas criadas foi de 6,2 milhões e tem aumentado constantemente. As variedades mais utilizadas são: as codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*), empregada exclusivamente na produção de ovos e a codorna comum (*Nothura maculosa*), usada para a produção de carne e ovos. No geral, as codornas criadas no Brasil quase que exclusivamente são para a produção de ovos, de tal forma que, cerca de 28% dos ovos produzidos são consumidos como conserva, 71% fresco, e apenas 1% de outras maneiras [5,6].

Com o aumento no consumo de ovos de codorna como fonte de proteínas aumentou-se também a exigência dos consumidores em relação aos padrões de qualidade, ao passo que os agricultores e as empresas de processamento de alimentos passaram a repensar sobre seus sistemas de produção a fim de oferecer produtos comprovadamente seguros e de qualidade aos seus clientes [5]. Assim, torna-se de extrema importância a avaliação da influência do tempo e temperatura de estocagem nesse produto alimentício, por meio do estabelecimento de biomarcadores para a avaliação do controle de qualidade.

1.2 Estrutura do ovo

O ovo é estruturalmente constituído pela casca, membrana da casca, câmara de ar, calaza, membrana vitelina, albúmen e a gema, que são essenciais para o desenvolvimento embrionário (Figura 1). A casca, composta por substâncias orgânicas e minerais, apresenta uma

estrutura porosa. Os poros presentes na casca são revestidos pela cutícula que regula a troca de água e gases, além de proteger o ovo contra contaminação por microrganismos. A membrana da casca, constituída por duas camadas uma externa (espessa) e outra interna (fina), atribui resistência e impermeabilização ao ovo. Além disso, entre as extremidades estão presentes as câmaras de ar que estão situadas entre as membranas interna e externa [7–10].

A membrana vitelina, matriz extracelular proteica situada em ao redor do oócito, atua como uma barreira evitando a mistura entre a gema e o albúmen. O albúmen, representa uma parte essencial como fonte de nutrientes e estabelece uma barreira contra infecção microbiana. A gema, separada do albúmen pela membrana vitelina, tem a função biológica proporcionar lipídios, proteínas, vitaminas e sais minerais ao embrião [11–13].

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura de um ovo

Fonte: Adaptação de Aquino (2015) a partir de GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T. J.; VAN IMMERSEEL, F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 718-38, 2009.

Para os seres humanos o albúmen é um dos alimentos mais versáteis, sendo amplamente utilizado pela indústria de alimentos como agente emulsificante e gelificante [13,14]. A gema é geralmente empregada na indústria de cosméticos como agente emulsificante e antioxidante natural. Aplicações terapêuticas também têm sido sugeridas e as imunoglobulinas IgG da gema possuem uso generalizado nas ciências da vida. Além disso, algumas proteínas do ovo também podem se tornar matéria-prima importante para a produção de peptídeos bioativos [11].

1.3 Composição proteica do ovo

Os ovos das aves possuem elevada quantidade de proteínas distribuídas em toda sua estrutura. No albúmen, as proteínas mais presentes são: ovalbumina,; ovotransferrina, ovomucóide, lisozima C, ovomucina e ovoglicoproteína [14]. Na gema as principais proteínas e lipoproteínas estão distribuídas entre dois compartimentos. Dentre eles, o plasma, a fração proteica solúvel em água, a qual é constituída principalmente por α -livetina (albumina do soro), β -livetina (α 2-glicoproteína), e γ -livetina (IgY) e a fração granular (globular) que apresenta as lipovitelinas como componentes de lipoproteína de alta densidade (HDL); fosvitina, e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) apo proteínas (APO) entre outras [11]. Dentre as proteínas citadas, a ovalbumina, lisozima C e a ovotransferrina são as que possuem diversas aplicações em diferentes áreas da ciência.

1.4 Importâncias da análise do perfil proteico dos ovos

Além da sua função biológica na reprodução das aves, o ovo possui um papel importante como uma fonte de proteína de alta qualidade e de baixo custo. Os alimentos que os contém são muito importantes para a nutrição humana, pois são fontes de moléculas bioativas e um sistema de fornecimento de proteínas terapêuticas, o que explica o grande interesse científico [15]. No albúmen de ovos de galinha foram recentemente caracterizadas novas proteínas com propriedades antibacterianas, imunomoduladora, anti-carcinogênica, anti-hipertensiva, antitrombótica e hidrolisados proteicos com atividade antimicrobiana [16].

Algumas proteínas no albúmen mostram propriedades biológicas úteis que possuem aplicações na área médica e na indústria de alimentos, como a ovalbumina, que produz peptídeos anti-hipertensivos. Além disso, as proteínas mais abundantes presentes nos ovos como a ovotransferrina e lisozima C são amplamente utilizadas como modelo para o desenvolvimento de proteínas com atividade bactericida mais potentes e com especificidade antimicrobiano mais ampla [15,17].

No entanto, a busca de componentes bioativos presentes em ovos tem sido prejudicada devido à falta de conhecimento detalhado sobre sua composição proteica. Consequentemente, o conhecimento sobre a composição e as propriedades físicas individuais podem aumentar suas aplicações na indústria de alimentos e também melhorar a compreensão de diversos processos

biológicos [18]. Contudo, os ovos são alimentos perecíveis, ou seja, perdem sua qualidade rapidamente durante a estocagem. Muitas mudanças complexas ocorrem durante sua estocagem, como: desbaste do albúmen (diminuição da viscosidade), perda de água e dióxido de carbono, aumento do pH no albúmen e conteúdo de água na gema, enfraquecimento e alongamento da membrana vitelínica, além de alterações na conformação das proteínas [13].

1.5 Influência da temperatura sobre qualidade do ovo

Todos os alimentos têm uma vida de prateleira, conhecido vulgarmente como validade, que pode variar de acordo com o tipo e as condições de estocagem. O ovo é um alimento altamente perecível, pois pode perder sua qualidade rapidamente entre o período de estocagem e consumo. A qualidade do ovo pode ser afetada por fatores como tempo de estocagem e condições ambientais como temperatura e umidade [19]. Em países desenvolvidos, ovos frescos são tipicamente estocados a temperatura entre 5 e 8 °C, enquanto que na maioria dos países em desenvolvimento, como o Brasil são estocados à temperatura ambiente [13].

Alterações específicas nas proteínas de ovo foram comprovadas durante a estocagem, dentre as modificações mais comuns está a conversão de ovalbumina para a forma termicamente estável, a S-ovalbumina. Além disso, foi demonstrado que as mudanças são mais influenciadas pela temperatura do que pelo tempo de estocagem. Em um estudo recente, a atividade antisalmonela do albúmen foi medida em diferentes temperaturas e tempo, sendo a maior atividade detectada na temperatura de 37 °C, após 5 dias de estocagem, seguido de um decaimento [13,20].

Assim, essas alterações foram associadas à redução da atividade antimicrobiana e/ou desbaste do albúmen. Estes resultados permitiram investigar as alterações nas proteínas que ocorreram durante a estocagem e descobrir marcadores proteicos para avaliar a qualidade dos ovos [13]. Atualmente para a avaliação da qualidade interna do ovo ainda são utilizados parâmetros convencionais como, pH da clara e gema, perda de peso, gravidade específica, unidade Haugh (UH) entre outros [19].

1.6 Parâmetros convencionais usados para a avaliação da qualidade dos ovos

Como dito, dentre os parâmetros empregados para a avaliação da qualidade dos ovos está o pH, massa e (unidade Haugh) HU. O albúmen de um ovo de galinha recentemente colocado apresenta um pH que pode variar entre 7,6 e 8,5 e aumenta a uma taxa que depende da temperatura de estocagem. O aumento no pH do albúmen é causado por uma perda de dióxido de carbono através dos poros da casca [21] e depende do equilíbrio entre o dióxido de carbono dissolvido, íons de bicarbonatos, carbonato e proteínas. Já o pH da gema é de aproximadamente 6,0 e não contém dióxido de carbono [19].

Um parâmetro também bastante utilizado, embora muito criticado, para a determinação da qualidade do albúmen é a unidade Haugh, que se baseia na determinação do peso do ovo e da altura do albúmen. Outros parâmetros usados para avaliar a qualidade dos ovos é o tamanho ou altura da célula de ar, que afeta o peso do ovo e depende da umidade relativa do ar. Este parâmetro é o único considerado pela regulamentação da União Europeia [19,21]. Além desses, existem outros parâmetros também muito empregados para estimar a qualidade de ovos que são relacionadas ao albúmen como a altura do albúmen, índice do albúmen; índice da área do albúmen e a percentagem do albúmen espesso ou fino. Para a gema, o parâmetro empregado é a cor que depende quase totalmente da dieta, tornando-a facilmente manipulável [22,23]. Contudo, os parâmetros convencionais não são associados a variações em nível proteico ou a nível do proteoma.

1.7 Abordagens Proteômicas

Nos últimos anos, tem se observado avanços em diferentes campos, em decorrência da evolução das tecnologias ômicas. Deste modo, as abordagens proteômicas promoveu plataformas eficazes para a análise de proteínas em diferentes matrizes [57]. As abordagens proteômicas tem como objetivo compreender a função das proteínas presentes em amostras biológicas implicando na identificação, quantificação, caracterização estrutural, avaliação de modificações pós-traducionais (PTMs), determinação de interações e distribuição subcelular de proteínas [58].

A evolução das técnicas proteômicas possibilitou a compreensão dos mecanismos moleculares em doenças clínicas, e atualmente está sendo aplicadas em diferentes áreas, como

farmacêutica, microbiológica, agrícola e de tecnologia de alimentos [58]. Deste modo, as abordagens proteômicas nas áreas agrícolas e de tecnologia de alimentos promoveu a origem de uma subdivisão das ciências ômicas, a foodômica [57]. As aplicações de ferramentas ômicas para a análise de alimentos tem como objetivo, garantir a segurança alimentar [59].

A foodômica possui suporte para avaliar produção, execução e monitoramento de alimentos. Garantir a segurança alimentar no futuro exigirá métodos para identificação e avaliação dos riscos de origem alimentar, métodos de estocagem, transporte e consumo [59]. Nas abordagens foodômicas estão também incluídos o desenvolvimento de novos produtos transgênicos, identificação de biomarcadores para a controle de qualidade, investigações sobre bioatividade de alimentos e seu efeito sobre a saúde humana e o desenvolvimento de estratégias genômicas para explorar questões de segurança alimentar, entre outras [60].

Nas abordagens foodômicas podem ser empregadas as mesmas técnicas usadas nas abordagens proteômicas, como a cromatografia líquida (LC), eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) e métodos de ionização, como o MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) e ESI (Electrospray Ionization) ambos associadas a espectrometrias de massas (MS) [58].

1.8 Técnicas eletroforéticas empregadas na separação de proteínas

O sucesso da análise do proteoma é altamente dependente da qualidade da amostra. Técnicas de alta resolução como eletroforese em gel bidimensional de poliacrilamida (2D-PAGE) são empregadas para separar várias proteínas presentes em diversas amostras complexas [24,25]. A técnica baseia-se na carga e massa molecular, sendo capaz de separar milhares de proteínas em um único gel de poliacrilamida. A separação é auxiliada a partir da combinação de detergentes e agentes caotrópicos, como SDS e CHAPS, ureia e tiourea, respectivamente, além de agentes redutores que contribuem para desnaturação e solubilização de proteínas [26,27]. As proteínas solubilizadas são separadas por carga durante a focalização isoeletrica (IEF) em um gradiente de pH imobilizado e pela massa (tamanho) em um gel de poliacrilamida. Por fim, as proteínas são detectadas por coloração usando *coomassie Brilhante Blue*, prata ou outros corantes comerciais. Assim, a capacidade de alta resolução de 2D-PAGE na primeira e segunda dimensões são baseadas em duas características independentes das proteínas, carga e massa [28]. A Figura 2 mostra o procedimento por 2D-PAGE.

Figura 2 - Ilustração dos processos da técnica eletroforética de 2D-PAGE

Fonte: Adaptação de Aquino (2015) a partir de RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1829–41, 2011.

A técnica 2D-PAGE, mostra a distribuição ou mapas de proteínas intactas fornecendo informações, como pI da proteína, sua massa e mudança no nível de expressão entre duas ou mais condições biológicas relevantes. Além disso, a técnica possibilita a identificação de modificações pós-traducionais (PTMs), que afetam a carga e a massa molecular das proteínas. Essas informações podem ser perdidas quando as amostras são analisadas diretamente por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, após a digestão triptica. Durante a focalização a técnica é capaz de discriminar mudanças induzidas por pequenas alterações no pI da proteína, ou seja, em sua carga líquida. Assim, as modificações que promovem a adição ou remoção de cargas elétricas podem ser detectadas por esta técnica, ao contrário das modificações eletricamente neutras. As modificações mais comuns e facilmente reconhecidas são a glicosilação, acetilação, fosforilação e desaminação [29].

A mudança no pI de uma proteína gerada por uma única modificação é normalmente bastante pequena, pois as proteínas não modificadas e modificadas são observadas umas próximas as outras, e são essencialmente distribuídas horizontalmente através do padrão de gel 2D-PAGE, sendo facilmente visualizadas como mostra a Figura 3 [29].

Figura 3 - Eficiência de 2D-PAGE na separação de diferentes isoformas e alterações na carga global das proteínas

Fonte: Adaptação de Aquino (2015) a partir de ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; LE BIHAN, M.-C.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; ROEPSTORFF, P. (2013, August 2). 2D gels still have a niche in proteomics. *Journal of Proteomics*, v. 88, p. 4-13, 2013.

A 2D-PAGE vem sendo aplicada na separação de proteínas em ovos nos últimos anos. Em 2006, Guerin-Dubiard e colaboradores identificaram 16 proteínas, sendo duas delas inéditas, identificadas como Tenp e VMO-1 em albúmen de galinha. Em 2007, Mann identificou 76 proteínas das quais, 54 pela primeira vez. No ano de 2008, Man e colaboradores identificaram 119 proteínas em gema, sendo 86 inéditas. Em 2011, Mann e colaboradores, usando LTQ Orbitrap Velos identificaram 158 proteínas, sendo 79 inéditas (Tabela 1) [11,15,30].

Além de identificações de novas proteínas, existem estudos sobre a influência da temperatura de estocagem em proteínas do albúmen. Dentre eles está o estudo realizado por Qiu e colaboradores em 2012 [13]. Tais trabalhos demonstram o interesse e os esforços recentes na identificação de proteínas em ovos em geral. Nesses estudos, as proteínas foram separadas por 2D-PAGE e em seguida identificadas por espectrometria de massas (MS).

Tabela 1 - Relatos de aplicações da eletroforese em gel de poliacrilamida e espectrometria de massas em abordagens proteômicas em amostras de ovos de galinha (albúmen, plasma e fração granular)

Referências	Técnicas	Matriz
Mann, 2007	1D-PAGE e LC-MS/MS	albúmen
Anton, 2003	1D-PAGE e LC-MS/MS	plasma
Mann et al., 2008	1D-PAGE e LC-MS/MS	plasma e fração granular
Mann e Mann, 2013	1D-PAGE e LC-MS/MS	casca
Wang, et al., 2011	2D-PAGE e LC-MS/MS	albúmen
Raikos et al., 2006	2D-PAGE e MALD-TOF	albúmen e gema
Mann, 2008	1D-PAGE e LC-MS/MS	membrana vitelina

Fonte: Autoria própria.

1.9 Fracionamento de proteínas por eletroforese em OFFGEL

Reduzir a complexidade da amostra por meio do fracionamento permite uma análise mais eficiente e completa das amostras por espectrometria de massas. Neste contexto, o OFFGEL é um avanço na tecnologia de separação que fraciona proteínas ou peptídeos de acordo com seu ponto isoelétrico (pI). Esta técnica consegue a mesma alta resolução de géis com gradientes de pH imobilizado (IPG), mas permite a recuperação da amostra em fase líquida, diferentemente da 2D-PAGE, combinando-se com a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS) [25,31].

A separação de proteínas ou dos peptídeos ocorre em duas fases ou sistemas: uma fase líquida superior, que é dividida em compartimentos, e outra que é a tira IPG convencional. Tipicamente, a amostra é diluída no tampão de focalização, e este é usado para preencher todos os reservatórios. Como não há nenhuma ligação fluidica entre os reservatórios, as proteínas ou peptídeos são forçados a migrar através do gel IPG onde a separação real ocorre. Depois da IEF, as proteínas ou os peptídeos presentes na fase líquida podem ser facilmente recuperados dos reservatórios para posterior análise [25]. A Figura 4 mostra o processo de fracionamento por OFFGEL.

Figura 4 - Esquema OFFGEL de fracionamento de proteínas

Fonte: Adaptação de Aquino (2015) a partir de Hörth, P.; Miller, C. A.; Preckel, T.; Wenz, C. Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. **Molecular & Cellular Proteomics** : MCP, v. 5, n. 10, p. 1968-74, 2006.

A combinação do convencional gradiente de pH imobilizado (IPG) com a separação em fases líquidas é dificultada pelo fato de que as proteínas ou peptídeos têm que ser transferidos do gel para solução para posterior análise. Este é um procedimento laborioso e propenso a erros, que inclui várias etapas e perda da fita IPG após a IEF. Contudo, esta técnica tem vantagem do poder de separação dos géis IPG, além de proporcionar a amostra em fase líquida após IEF [25].

Assim, a inclusão de eletroforese OFFGEL na proteômica oferece diversas vantagens, como: (i) determinação do pI dos polipeptídeos (ii) proteínas estão disponíveis na fase líquida após focalização isoeletrica, (iii) o método funciona em formato de microescala com frações de 150 μ L ou menos e (iv) tiras comercialmente disponíveis de gel IPG podem ser usadas com a

garantia de repetibilidade [25,31]. Esses fatores associados facilitam a identificação das proteínas após análises por espectrometria de massas.

1.10 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Nos últimos anos, a espectrometria de massas emergiu como uma poderosa ferramenta para a identificação, quantificação e caracterização de proteínas em amostras biológicas complexas [32]. O desenvolvimento e o aperfeiçoamento da instrumentação facilitou a aplicação dessa técnica em estudos proteômicos [33]. Dessa forma, a espectrometria de massas (MS) tornou-se rapidamente uma ferramenta essencial para biólogos e bioquímicos, pois a combinação de velocidade, sensibilidade, exatidão de massas e poder de resolução resultou numa ferramenta eficaz na identificação e quantificação de proteínas [33,34].

A espectrometria de massas possibilita a identificação tanto de proteínas intactas (*top down*) quanto dos seus peptídeos (*bottom up*). Embora considerando a possível detecção de proteínas intactas, existem inúmeras razões que justificam o uso de peptídeos e não proteínas em análises proteômicas. Dentre essas razões estão a dificuldade de manuseio e instabilidade, podendo ainda apresentar problemas de solubilidade das proteínas intactas, sendo necessário em alguns casos a adição de tensoativos. No entanto, os tensoativos interferem na análise, uma vez que muitos desses componentes ionizam e quase sempre estão presentes em excesso na amostra. Além disso, a detectabilidade para a análise de proteínas intactas é menor em relação à análise de peptídeos. A análise de peptídeos tem várias vantagens sobre as proteínas intactas, incluindo uma separação mais eficiente por meio de cromatografia líquida (LC), uma massa molecular menor e menor número de estados de carga, o que leva a melhorias em sua detecção [35,36].

Para a obtenção de peptídeos são empregados procedimentos de digestão que podem ser enzimáticas ou não. Dentre os procedimentos de digestão enzimáticas a tripsina é a mais utilizada no estudo proteômico. A tripsina, atua clivando no C-terminal dos aminoácidos lisina e arginina presentes nas proteínas [28]. Dependendo do tamanho dos peptídeos produzidos, a abordagem é definida como proteômica *bottom-up* ou *middle-down*. Numa estratégia *bottom-up*, a proteína é digerida formando peptídeos dentro do intervalo de aproximadamente 500-3000 Da. Os peptídeos são posteriormente analisados por cromatografia líquida com ionização por *electrospray* e espectrometria de massas (LC-ESI-MS) ou ionização/dessorção a laser assistida

por matriz e tempo-de-voo (MALDI-TOF-MS). A identificação de proteínas é realizada com base em impressões digitais da massa ou sequência dos peptídeos [35].

A digestão de uma amostra biológica complexa para estudo de um proteoma completo baseado em uma abordagem *bottom-up* produz uma grande quantidade de peptídeos, além da capacidade que o instrumento pode analisar. Contudo, a complexidade da amostra pode ser reduzida sem comprometer o conteúdo da informação, produzindo uma quantidade menor de peptídeos, no entanto, com tamanhos maiores. Essa abordagem chamada proteômica *middle-down* combina o melhor de *top-down* e *bottom-up*, aproveitando as melhorias na instrumentação da MS e da disponibilidade de métodos de fragmentação, mantendo o nível de sensibilidade associado com a análise de peptídeos. Os peptídeos de tamanho médio (~3000-20000 Da) mostram uma melhor separação por LC e depois da ionização por ESI os peptídeos ionizados transportam um número maior de cargas o que aumenta o número de fragmentações por dissociação induzida por colisão (CID) ou dissociação por transferência de elétrons *Electron-transfer dissociation* (ETD) em instrumentos como Orbitrap, íons quadrupolo-linear (QTRAP) MS e quadrupolo-FTICR-MS. [35,37]. Assim, digestão de proteínas é um passo essencial para ambas as estratégias proteômicas e tem uma grande influência sobre a qualidade da identificação da proteína. [35]. Deste modo as técnicas de 2D-PAGE e a MS associadas com a ferramentas de bioinformática e quimiométricas são os principais componentes de uma abordagem que tem sido chamada de proteômica clássica [28].

1.11 Análise quimiométrica

O método conhecido como reconhecimento de padrões é muito usado em quimiometria para as diferentes finalidades, dentre elas estão a análise exploratória de dados, a classificação supervisionada de amostras e a resolução de curvas multivariadas [38]. A análise exploratória é usada para se tentar detectar padrões de associação no conjunto de dados, a partir dos quais se podem estabelecer relações entre objetos (amostras analíticas, cromatogramas, imagens) e variáveis (concentração, perfis cromatográficos), descobrir objetos anômalos ou agrupar os que estão em geral inter-relacionados. Dentre as técnicas estatísticas, a análise de componentes principais (PCA) é a mais popular [39].

O principal objetivo de uma PCA é reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados ou tabela de dados, preservando o máximo da informação. Isto é feito calculando-se combinações lineares das variáveis originais. A primeira componente principal (P1) é a combinação linear

de máxima variância e possui a informação máxima. A segunda componente (PC2) também possui máxima variância, porém ortogonal a PC1. A terceira é de máxima variância, sendo ortogonal às duas primeiras PCs, e assim sucessivamente [39].

Na PCA a matriz consiste em um número determinado de linhas consideradas como as observações (**N**) e colunas que são as variáveis (**K**) que são representadas em termos de *scores* e *loadings*. A matriz consiste do produto de duas matrizes, sendo a matriz *scores* **T** (**NXA**) que resume as variáveis, e a matriz de *loading* **P'** (**AXK**), representando a influência das variáveis no modelo de projeções. O termo denominado como **A** é o número de componentes principais, somada a uma matriz “ruído” **E** (**NXK**): $\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}' + \mathbf{E}$, que expressa os desvios entre os valores originais e as projeções [40]. Deste modo, os gráficos de *scores* são formados pelas componentes principais (PCs), sendo ordenadas em ordem crescente de variância.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência dos diferentes tempos e temperaturas de estocagem nos ovos de codorna japonesa empregando parâmetros convencionais como pH e massa, bem como ferramentas proteômicas para a identificação de potências biomarcadores presentes tanto no albúmen quanto na gema (plasma e fração granular)

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do tempo de estocagem no pH, massa e perfil proteico dos ovos de codorna;
- Avaliar a influência da temperatura de estocagem no perfil proteico do albúmen, plasma e fração granular usando 1D e 2D-PAGE;
- Identificar marcadores biológicos para controle de qualidade;
- Empregar técnicas como OFFGEL para o fracionamento das amostras de albúmen controle e as estocadas por 21 dias à 37 °C e compará-las entre si.
- Identificar as proteínas por espectrometria de massas empregando análise dependente de dados (DDA).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenções das amostras de ovos de codornas

Os ovos frescos coletados logo após a oviposição, obtidos em uma coturnicultura (produtor) de São Carlos-SP, foram usados na avaliação do tempo de estocagem enquanto que os empregados na avaliação da influência da temperatura foram comprados em um supermercado local também na cidade de São Carlos. Os ovos de codornas japonesas (*coturnix coturnix japonica*) colhidos e comprados foram acondicionados em embalagens plásticas e em seguida estocados. Para os ovos considerados como amostras controles (0 dias), não foram estocados, sendo abertos e separados o albúmen da gema logo no chegar ao laboratório de pesquisa.

3.2 Avaliações do tempo de estocagem

A avaliação do tempo foi realizada a partir da estocagem dos ovos à temperatura de 37 °C durante 21 dias em estufa para cultura bacteriológica modelo ECB 1.2 – Odontobras. A cada período de 7 dias, 7 ovos foram pesados em balança analítica modelo Ohaus Adventurer e outros 3 foram abertos e cuidadosamente separados o albúmen da gema. Depois de separados, o albúmen e a gema foram homogeneizados separadamente durante 30 min e em seguida mediu-se o pH; para ambas as amostras foi usado um pHmetro de bancada marca ION, modelo PHB-500.

3.3 Avaliações da temperatura de estocagem

Os ovos não fertilizados comprados em um mercado local foram selecionados aleatoriamente para amostragem e em seguida estocadas nas temperaturas de 4 (geladeira), 25 (ambiente) e 37 °C (estufa) por um período de 14 dias. Passado esse período, o albúmen e a gema foram cuidadosamente separados para posterior extração das proteínas totais. Os ovos não estocados (0 dias) foram consideradas como o controle. Os experimentos foram realizados em quadruplicata, sendo quatro réplicas biológicas analisadas individualmente. Para reduzir as

variações biológicas foi feito um *pool* de quatro amostras e analisadas em quadruplicata por 2D-PAGE.

3.4 Extrações das proteínas do albúmen

As extrações das proteínas do albúmen foram realizadas segundo método previamente descrito por Qiu e colaboradores com algumas modificações [13]. Após separação do albúmen e gema, o albúmen foi transferido para um tubo de polietileno (15 mL) e homogeneizado por 30 min à temperatura de 4 °C. A Figura 5 mostra as amostras que foram submetidas às diferentes temperaturas de estocagem, sendo: amostras controle e as submetidas à 4, 25 e a 37 °C.

Figura 5 - Amostras de albúmen em diferentes temperaturas, controle, 4, 25 e 37 °C

Fonte: Autoria própria.

Para a extração das proteínas foi retirado uma alíquota de 100 μ L e transferido para um tubo *ependorf* de 2 mL e adicionado 1 mL de acetona gelada, contendo 10% (v/v) de ácido tricloroacético e 0,07% (v/v) de 2-mercaptoetanol e armazenado em freezer (-20 °C) por um período 12 horas. Após 12 horas, o homogenato foi centrifugado a 13000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado 3 vezes com acetona gelada contendo 0,007% de 2-mercaptoetanol e em seguida seco à temperatura de -80 °C, e ressuspensionado em 500 μ L de solução de reidratação descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição da solução de reidratação usadas na ressuspensão do *pellet*

Composição	Concentração	Quantidade
Ureia	7 mol/mL	2,1 g
Tiourea	2 mol/mL	0,76 g
CHAPS	2 % (m/v)	0,1 g
IPG buffer pH 3-10 *NL	2 %	100 μ L
DTT	1 %	50 mg
Azul de bromofenol 1%	0,002 %	10 μ L
Água ultra pura	-	5 mL

*NL=não linear

Fonte: Autoria própria.

3.5 Fracionamento e extração de proteínas da gema de ovos de codorna

Para a separação do plasma da fração granular foram adicionadas à gema 30 mL de água Milli-Q®, agitado durante 30 min à 4 °C e em seguida retirada uma alíquota de 500 μ L (Figura 6). O homogenato foi centrifugado a 13000 rpm por 10 min à 4 °C e o sobrenadante (plasma) e *pellet* (fração granular) separados. O *pellet* (fração granular), foi lavado 3 vezes com etanol e em seguida com hexano, ambos gelados.

Figura 6 - Amostras de gema, após diluição em 30 mL de água ultrapura Milli-Q®, de ovos de codorna que foram estocadas em diferentes temperaturas (controle, 4, 25 e 37 °C)

Fonte: Autoria própria.

Ao sobrenadante (plasma) foi adicionado 1,0 mL de acetona gelada e incubado no freezer por um período de 12 horas e em seguida centrifugado 13000rpm por 10 min à 4 °C. O *pellet* resultante foi lavado 3 vezes com acetona gelada e seco a temperatura de -80 °C.

Os *pellets* dos plasmas e das frações globulares foram resusspensos com 500 µL e 250 µL de solução de reidratação [ureia (7 mol/mL), tiourea (2 mol/mL), 2 % CHAPS, 2 % IPG e 1 % azul de bromofenol] conforme listado na Tabela 2, respectivamente.

3.6 Quantificações das proteínas totais

Após a extração, a quantificação de proteínas totais foi realizada empregando-se o procedimento de microensaio do *kit Bradford protein assay* (GE Healthcare). A curva usada

para as quantificações das amostras variou entre 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 µg/mL. Para as amostras de albúmen foi usado um volume de 0,5 µL, enquanto que para o plasma e fração granular foi usado 1,0 µL. As amostras foram diluídas em 800 µL de água ultrapura, em seguida adicionado 200 µL do reagente de Bradford, incubados à temperatura ambiente (25 °C) por 5 min e medida a absorbância no comprimento fixo de 495 nm. A quantidade de proteína total foi calculada usando a equação de regressão linear dada a absorbância da solução de soro de albumina bovina (BSA).

3.7 Eletroforese Bidimensional

As focalizações foram realizadas usando uma massa de proteína de 300 µg para amostras de albúmen e 150 µg para plasma e fração granular. A voltagem hora total foi de 22.120 V h em tiras de IPG com 13cm. O método empregado está descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Método empregado na focalização das proteínas presentes em albúmen, plasma e fração granular.

Intervalo de pH	Modo	Voltagem (V)	Tempo (h:min)	kVh
3-10 NL	Step	130	4:00	520
	Step	200	3:00	600
	Step	500	2:00	1000
	Grad	1000	1:00	750
	Grad	8000	2:30	11250
	Step	8000	1:00	8000

Tempo total de focalização 13:30 e volte hora de 22.120 V h mantendo corrente máxima por fita de 50 µA.

Fonte: Autoria própria.

Após focalização, as fitas foram reidratadas em duas etapas durante 15 min cada, usando a solução de equilíbrio descrita na Tabela 4. A primeira com a solução de equilíbrio contendo 10 mg/mL de ditiotriol (DDT) e a segunda com 25 mg/mL de iodoacetoamida (IAA).

A separação na segunda dimensão foi realizada em géis de polacrilamida na proporção de 10% (previamente preparado), aplicando-se uma voltagem de 50 V (25 V para cada gel) durante 15 min e em seguida uma voltagem de 100 V até a chegada do corante no final do gel. A detecção dos *spots* foi realizada usando corante *coomassie blue R* e em seguida os géis foram digitalizados com *Imagescanner* e as imagens tratadas pelo *software Imagemaster 2D Platinum 7* ambos da *General Electric* (GE).

Tabela 4 - Composição da solução de equilíbrio usadas antes do processo de separação na segunda dimensão.

Composição	Concentração
Ureia	6 mol/L
Tris (pH 8,8)	75,0 mol/L
Glicerol	29,3% (v/v)
Azul de bromofenol 1%	0,002%
SDS	2,0% (m/v)
Agua ultra pura	-

Fonte: Autoria própria.

3.8 Análises quimiométricas

Os dados das imagens digitalizadas obtidos por 2D-PAGE foram transportados a uma matriz para análise quimiométrica usando o programa estatístico SIMCA. Os comandos utilizados foram: gráficos de *scores* e *loading* para a avaliação das tendências das amostras com relação a influência da temperatura de estocagem das proteínas presentes no albúmen, plasma e fração granular.

3.9 Fracionamento do albúmen por OFFGEL

Para o fracionamento das amostras de albúmen foram utilizados 300 µg de proteínas sendo empregado o método de focalização citado na tabela 5 por um período de 19 h. Após esse período, as frações foram coletadas separadamente e analisadas por 1D-PAGE. Nas focalizações foram usadas tiras IPG de 13 cm com faixa de pH variando entre 4-7. A Tabela 5 mostra a programação utilizada.

Tabela 5 - Programação empregada no fracionamento das amostras de albúmen por OFFGEL.

	Volt hora (kVh)	Voltagem (V)	Corrente (μ A)	Potencia (mW)	Tempo (h:mm)
Focalização	64	8000	50	200	19
Hold		500	20		

Fonte: Autoria própria.

3.10 Digestão e análises dos peptídeos por espectrometria de massas

Os *spots* diferenciais identificados nos géis foram cortados e lavados com aproximadamente 500 μ L de água ultra pura por 3 ciclos em temperatura ambiente (25 °C). Em seguida foi usada uma solução contendo metanol 50% e ácido acético 2,5% em água purificada para remoção do *coomassie blue r-250*, e posteriormente os *spots* foram lavados com uma solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Os fragmentos dos géis foram secos com 200 μ L acetonitrila 100% por 10 min e posterior reidratados com 10 μ L uma solução de bicarbonato de amônio 100 mM, cloreto de cálcio 5 mM contendo tripsina (Promega) 12,5 ng e incubado no gelo por 30 min. Decorrido o tempo estabelecido, os géis foram imersos em solução tampão de bicarbonato de amônio 100 mM e incubados à 37 °C por 14h. Os peptídeos tripticos foram extraídos com solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% e o solvente evaporado em *speed vac*. Após digestão com tripsina, os peptídeos foram desalinizados antes da análise por espectrometria de massa, procedimentos descritos por Shevchenko e colaboradores em 2006 [41]. As misturas de peptídeos foram analisados por EASY-nLC (Proxeon Biosystems, Odense, Dinamarca, agora parte da Thermo Fisher Scientific), com coluna capilar de 15 cm, diâmetro interno de 75 μ m preenchido com partículas de 3 μ m *Reprosil-Pur C18-AQ resin* (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Germany).

Para a separação dos peptídeos por nLC foi empregado o isocrático de 5% de acetonitrila em ácido fórmico a 0,1% a uma taxa de fluxo de 300 nL/min por 10 min, seguido de um gradiente de 5-30% com taxa de fluxo de 300 nL/min durante 20 min, 30-60% de acetonitrila em 0,1% fórmico, a uma taxa de fluxo de 300 nL/min e 60-80% acetonitrila em ácido fórmico a 0,1% a uma taxa de fluxo de 300 nL/min durante 7 min. O fluido foi inserido por *electrospray* em um LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) através de uma fonte de íons *nanoelectrospray* Proxeon.

3.11 Análises dos Dados

Os arquivos obtidos foram processados empregando o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Os parâmetros de busca usados foram: tripsina como enzima empregada na digestão; carbamidometilação de cisteínas (modificação fixa) e oxidação de metionina (modificação variável). Tolerância massa peptídeo inicial foi definida como tolerância 7ppm e massa do fragmento de 0,5 Da.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O ovo pode ser consumido após 21 ou até mesmo 28 dias depois da deposição, pois as características comumente relacionadas com a sua qualidade diminuem logo após a postura. A diminuição na qualidade do ovo está associada às alterações químicas, nutricionais, funcionais e de higiene que são mais dependentes do tempo e temperatura de estocagem [42]. Para expressar a qualidade do ovo são usados parâmetros que podem ser obtidos a partir do albúmen ou da gema. Assim, durante a estocagem, a qualidade interna de ovos pode ser avaliada empregando parâmetros como pH e peso dos ovos [43]. Atualmente, novos métodos estão sendo usados para estudos em matriz de ovos. Neste contexto, métodos proteômicos ainda foram pouco utilizados em pesquisas com o objetivo de identificar biomarcadores que indicam as variações de qualidade interna de ovo durante a estocagem [13]. Consequentemente, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade do ovo em diferentes tempos e temperatura usando tanto parâmetros comumente empregados bem como ferramentas proteômicas.

4.1 Avaliações do tempo de estocagem no pH, massa e nas proteínas presentes em ovos de codorna

4.1.1 Influência no pH e massa dos ovos de codorna

Em amostras de albúmen analisadas após estocagem a 37 °C durante 21 dias foi observado que o pH do albúmen já no 7º e entre os 14º e 21º dias foram maiores em relação as amostras controles (0 dias). Os valores médios de pH variaram entre 9,07 e 10,00 com desvios padrões entre 0,07 e 0,14. Nas amostras de gema foi observado um aumento efetivo no pH que variou entre 6,05 e 7,34 com desvios padrões entre 0,01 e 0,33. A Tabela 6 apresenta os valores médios de pH para as amostras de albúmen e gema nos tempos de estocagens de 0 - 21 dias e os respectivos desvios padrões.

Tabela 6 - Avaliação da influência do tempo de estocagem no pH do albúmen e gema de ovos de codorna, valores médios de pH e desvios padrões, respectivamente.

pH				
Dias	Albúmen		Gema	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0	9,07	0,14	6,05	0,01
7	10,00	0,07	7,10	0,10
14	9,91	0,07	7,10	0,30
21	9,66	0,13	7,34	0,33

Fonte: Autoria própria.

Além do pH foi avaliada a influência do tempo de estocagem na massa dos ovos durante os 21 dias a 37 °C e observou-se uma diminuição de aproximadamente 26 % na massa dos ovos de codornas. A tendência na diminuição das massas pode ser observada na Figura 7.

Figura 7 - Avaliação da influência do tempo de estocagem na massa de ovos de codorna durante 21 dias à 37 °C

Fonte: Autoria própria.

Observou-se um aumento do pH tanto no albúmen quanto na gema em decorrência da diminuição do dióxido de carbono causada pelas perdas ou trocas gasosas realizadas através dos poros presentes na casca dos ovos [19]. Nos experimentos realizados por Sedat e

colaboradores com ovos de galinha também foi observado um aumento do pH no albúmen com o tempo de estocagem [44]. Além disso, Ono e colaboradores observou que o aumento acelerado do pH no albúmen em ovos de galinha não fertilizados foi devido principalmente a temperatura de estocagem [45]. Em estudos realizados por Biladeau e Keener [46] com ovos de galinha foi verificado também o aumento do pH na gema. Deste modo, os dados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os observados independentemente por Sedat, Ono e Biladeau [44].

Em nível do proteoma, o aumento no pH durante a estocagem leva à oxidação, dissociação de hidrogênio ligados covalentemente e exposição dos grupos COOH por meio da desnaturação das proteínas [47].

Além do aumento do pH no albúmen e na gema, quando os ovos são estocados durante longos períodos ocorre também a redução da massa do ovo devido à perda de água, dióxido de carbono e a descentralização da gema [23]. Para a perda de massa, valores menores foram obtidos em estudo realizados por Imai e colaboradores [48] com ovos de codornas japonesas (*coturnix coturnix japônica*), sendo observado uma perda de massa de somente 5,90 % durante os 28 dias de estocagem à temperatura ambiente, valor aproximadamente 5 vezes menor ao observado no presente estudo. Nas amostras analisadas foi observado além da variação de pH e massa, a evasão da gema ao albúmen, em decorrência do rompimento da membrana vitelina.

A membrana vitelina atua como uma barreira que evita a mistura entre o albúmen e gema e o seu enfraquecimento durante a estocagem ocasiona a invasão da gema ao albúmen devido à degradação da proteína ovomucina e a conversão do albúmen de espessura espessa para fina, o que resulta em alterações na rede de fibra da membrana vitelina. A degradação da membrana vitelina é decorrente do aumento do pH do albúmen e da gema [46,49]. Para as amostras de ovos de codornas estocadas entre o 14º e 21º dia foi observado o colapso da membrana da gema, dados que estão de acordo com os observados por Imai e colaboradores [48], mesmo os estudos tendo sido realizados em temperatura de estocagem abaixo da empregada no presente trabalho. Assim, a variação do pH, enfraquecimento da membrana vitelina e a diminuição da massa dos ovos estão correlacionados com a perda de dióxido de carbono e água presentes nos ovos.

4.2 Avaliações da influência do tempo de estocagem nas proteínas presentes nos ovos de codorna por eletroforese em gel

Os ovos que foram estocados à temperatura de 37 °C por 21 dias também foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, para a verificação da influência do tempo de estocagem nas proteínas dos ovos. Antes das análises por eletroforese em gel, as amostras de gema foram fracionadas, ou seja, foi realizada a separação do plasma da fração granular. A Figura 8 mostra os géis 1D-PAGE com as amostras de albúmen, plasma e fração granular.

Figura 8 - Análises por 1D-PAGE das amostras de albúmen, plasma e fração granular de ovos de codorna estocadas durante 0, 7, 14 e 21 dias a 37 °C

Fonte: Autoria própria.

Entre as amostras de albúmen analisadas foram observadas algumas alterações, como o desaparecimento de algumas bandas no gel. O desaparecimento das bandas indicadas com seta

na figura 8 foi mais evidente após o 14º e 21º dias de estocagens. Nas amostras de gemas, nas frações granulares não foram observadas variações visíveis por 1D-PAGE, mas algumas alterações foram observadas nas amostras de plasma logo após o 21º dia de estocagem (indicada pela seta). Assim, os dados obtidos demonstram que o tempo de estocagem não só influencia na variação de pH e massa, mas também as proteínas presentes nas amostras.

Para melhor visualização das proteínas ou visualização de outra propriedade (como o ponto isoelétrico (pI)), foram realizadas análises por 2D-PAGE, para avaliar a influência do tempo de estocagem no pI das proteínas, no que diz respeito a mudança de carga global da proteína ocasionada pela perda ou aquisição de grupos funcionais carregados. A Figura 9 apresenta as análises por 2D-PAGE das amostras de albúmen de ovos de codornas.

Figura 9 - Avaliação do tempo de estocagem nas proteínas presentes no albúmen de ovos de codorna por 2D-PAGE

Fonte: Autoria própria.

As análises por 2D-PAGE mostraram algumas variações no pI de algumas proteínas principalmente as que possuem massa entre 77 e 45 kDa. Essas alterações não foram observadas nos géis de 1D-PAGE. Além disso, foi observado um aumento no número de *spots* com massa entre 30 e 45 kDa podendo estar associados à degradação das proteínas presentes entre as massas maiores que 45 kDa.

Para as amostras de plasma, observou-se o mesmo comportamento com relação às proteínas ovotransferrina, ou seja, um aumento no número de *spots* horizontais que estão relacionados com uma mudança em sua carga global. A Figura 10 mostra os géis 2D-PAGE das amostras de plasma em diferentes tempos de estocagem.

Figura 10 - Avaliação do tempo de estocagem nas proteínas presentes no plasma de ovos de codorna por 2D-PAGE

Fonte: Autoria própria.

Na fração granular, também ocorreu o aumento no número de *spots* (indicado pela seta) para as amostras estocadas principalmente entre o 14º e 21º dia de estocagem. A Figura 11 apresenta as imagens dos 2D-PAGE das amostras de fração granular.

Figura 11 - Avaliação do tempo de estocagem nas proteínas presentes na fração granular de ovos de codorna por 2D-PAGE

Fonte: Autoria própria.

As amostras analisadas confirmaram a observação feita por Omana e colaboradores, 2011, em que o tempo de estocagem pode além de influenciar na mudança no pH dos ovos, causa também alterações no proteoma. Contudo, os estudos foram realizados somente com o albúmen de ovos de galinha. Para ovos de galinha foi observado que dentre as proteínas do albúmen, apenas para a clusterina foi observada uma mudança continua no perfil durante o período de estocagem concluindo que o aumento nas abundâncias relativas das proteínas: clusterina e ovoinibidor, juntamente com a alteração do teor de ovalbumina durante a estocagem

pode contribuir para desbaste do albúmen. Além disso, foi observado que a degradação de ovalbumina e clusterina durante a estocagem pode ser devido ao efeito combinado da proteólise e aumento do pH; sendo também parcialmente responsável pelo desbaste do albúmen [47].

No presente trabalho, foi observado para as amostras de albúmen que a influência do tempo de estocagem foi mais acentuada entre 14^o e o 21^o dias de estocagem, corroborando com o observado por Omana e colaboradores uma vez que as amostras estudadas foram estocadas à temperatura de 37 °C [47]. Após as análises do tempo de estocagem foi realizado em seguida a avaliação da influência da temperatura de estocagem para amostras de ovos de codorna, estabelecendo o tempo de estocagem de 14 dias.

4.3 Avaliações das temperaturas de estocagem nas proteínas presentes em ovos de codorna

4.3.1 Estocagem das amostras

A avaliação da influência da temperatura foi feita através da estocagem das amostras às temperaturas de 4, 25 e 37 °C durante 14 dias. Nas amostras estocadas a 25 e 37 °C verificou-se a mudança de coloração do albúmen, saindo de transparente brilhante (controle) para amarelo opaco (amostras estocadas a 37 °C). A mudança na coloração do albúmen ocorreu devido ao rompimento da membrana vitelina e consequentemente a evasão da gema para o albúmen. Além da mudança da coloração foi verificado um aumento significativo do desbaste, que é a diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura. Essa mudança foi observada visualmente (Figura 5).

A característica gelatinosa do albúmen de ovos frescos funciona como uma barreira contra contaminações bacterianas. Desde modo, o desbaste ou liquefação do albúmen promove uma invasão microbiana fácil. Segundo Omana e colaboradores o processo de liquefação do albúmen ainda não foi elucidado. O processo do desbaste dos ovos de galinha foi observado, visualmente, logo após 20 dias de estocagem à temperatura ambiente, período em que foi observado também alterações a nível do proteoma. As proteínas em ovos de galinha que apresentaram mudanças significativas em abundância durante a estocagem foram ovalbumina, clusterin, ovoinibitor, ovotransferrina, e prostaglandina D2 sintase [47].

4.3.2 Análises proteômica do albúmen, plasma e fração granular

Os *spots* separados por 2D-PAGE e detectados usando corante *coomassie blue* foram digitalizados e tratados no *ImageMaster 2D Platinum Software-GE Healthcare Life Sciences*. Para amostras controle de albúmen foram identificados 41 *spots* e na gema 34 e 44 *spots* em plasma e na fração granular, respectivamente. A quantidade de *spots* detectados na fração granular foi maior que em albúmen, mesmo usando a metade da quantidade total de proteína. Isso se deve a presença da grande quantidade de proteínas como a ovalbumina, que representa cerca de 50% da constituição proteica do albúmen [47].

Verificam-se que os *spots* (proteínas) estavam presentes tanto no albúmen quanto na gema (plasma e na fração granular). Entre as amostras de albúmen e gema (plasma e fração granular) foi verificada a presença da ovotransferrina, que está entre as proteínas mais abundantes no albúmen. Além disso, foi observado a presença de alguns grupos de *spot* (isoformas) com massas de aproximadamente 65 kDa e outro grupo com massa de 45 kDa nas duas frações da gema, tanto no plasma como na fração granular; os *spots* identificados estão representados como círculos (Figura 12). Os grupos de proteínas presentes no plasma e na fração granular são a soroalbumina e albumina. As proteínas encontradas em ambas as frações apresentam abundâncias diferentes, ou seja, concentrações diferentes. Segundo Mann e colaboradores 2008, diversas proteínas do albúmen também foram encontradas na gema de ovos de galinha. Foram identificadas proteínas em ovos de galinha como ovalbumina, ovomucoide, ovotransferina e ovoinibidor. A sugestão do autor é que essas proteínas migraram do albúmen para a gema por endocitose mediada por receptores [11].

Figura 12 - Análise do proteoma das amostras controle (0 dias de estocagem) de ovos de codorna. (a) plasma, (b) albúmen e (c) fração granular. As identificações das proteínas foram realizadas por LC-MS.

Fonte: Autoria própria.

Algumas proteínas presentes tanto no albúmen quanto na gema não foram identificadas. Em alguns *spots* foram observados um conjunto de proteínas já identificadas em *spots* presentes em outras regiões do gel, ou seja, *spots* com mais de uma proteína, podendo ser uma indicação de formação de complexos proteicos já observado por Omana e colaboradores [47].

4.3.3 Análises proteômica do albúmen de ovos de codorna estocados em diferentes temperaturas

As amostras compradas em supermercado e as obtidas com um produtor local (os coletados a menos de 24 h após a ovoposição, ou mais precisamente a 1h após ovoposição), mostraram os mesmos perfis proteicos, o que pode indicar um bom estado de conservação das amostras comercializadas. Nas amostras de albúmen analisadas por 2D-PAGE foram identificados 41 *spots* no controle, 34 *spots* nas amostras estocadas à 4 °C; 41 nas estocadas a 25 °C e 59 em amostras estocadas à temperatura de 37 °C. Alguns destes *spots* sofreram variação em abundância quando os ovos foram armazenados a temperaturas mais elevadas (Figura 13). Mudanças físico-químicas em ovos de galinha durante a estocagem têm sido bem documentadas e a temperatura apresentou maior influência no perfil proteico do que o tempo de estocagem [13].

Para a avaliação da variabilidade biológica foram realizadas as análises por 2D-PAGE individuais podendo-se verificar que mesmo sendo o albúmen de diferentes amostras de ovos, manteve-se um padrão para cada temperatura de estocagem (Figura 14).

Figura 13 - Mapas 2D-PAGE das proteínas de amostras de albúmen de ovos de codorna submetidas as diferentes temperaturas de estocagem. (a) controle; (b) 4 °C; (c) 25 °C) e (d) 37 °C

Fonte: Autoria própria.

Para desconsiderar a variabilidade biológica e considerar somente o erro experimental das amostras de albúmen foi realizado as análises por 2D-PAGE do *pool* das amostras em quadruplicata. A Figura 14 mostra as análises do *pool* das amostras de albúmen por 2D-PAGE das amostras de albúmen.

Figura 14 - Gel 2D-PAGE (pH 3-10 e n = 4) de ovos de codorna submetidas as diferentes temperaturas de estocagem (a) controle; (b) 4 °C; (c) 25 °C e (d) 37 °C

Fonte: Autoria própria.

Para amostras de albúmen estocadas em diferentes temperaturas, foi verificado um aumento do número de *spots* com o aumento da temperatura, principalmente para as amostras estocadas à temperatura de 37 °C. Após a separação das proteínas por 2D-PAGE foram realizados os tratamentos das imagens usando o *software ImageMaster 2D Platinum 7.0* para obtenção da matriz e a realização da análise quimiométrica.

4.3.4 Análises quimiométricas das amostras de albúmen

A análise quimiometria é de uma importância peculiar para avaliar as tendências, como separação ou agrupamento das amostras, visto que cada proteína se comporta de maneira distinta em cada temperatura de estocagem. Assim, os resultados do 2D-PAGE das amostras de albúmen submetidas às temperaturas de 4, 25 e 37 °C e controles (0 dias) foram analisadas empregando a análise de componentes principais (PCA). A análise estatística das amostras definiu a separação ou classificação das amostras de acordo com os padrões de variação do volume do *spot* (abundância) em cada temperatura de estocagem. A Figura 15 ilustra a PCA para as diferentes temperaturas de estocagem.

Figura 15 - Análise de componentes principais de amostras de albúmen (controle, temperatura de 4, 25 e 37 °C)

Fonte: Autoria própria.

A PCA demonstrou uma boa separação entre as amostras pela formação de 4 grupos independentes, nos quais se verificou um agrupamento entre as amostras estocadas na mesma temperatura e uma separação ou nenhuma similaridade entre as amostras estocadas em diferentes temperaturas. Esse evento comprova que há influência da temperatura de estocagem nas proteínas presentes em albúmen de ovos de codorna. A Figura 16 apresenta o gráfico de *loading*, que exibe os números dos *spots* e variáveis que influenciaram na separação ou agrupamento das amostras de albúmen de ovos de codorna. A PCA aplicada explicou 95% da variância dos dados analisados.

Figura 16 - Gráfico de *loading*; distribuição das variáveis de acordo com o volume do *spot*, das amostras de albúmen de ovos de codorna (controle, temperatura de 4, 25 e 37 °C)

Fonte: Autoria própria.

Estudos recentes, demonstraram mudanças nas proteínas presentes em ovos que foram sujeitos a diferentes temperaturas de estocagem. Essas mudanças estão fortemente correlacionadas à redução da atividade antimicrobiana e ao desbaste do albúmen [13]. A figura 17 apresenta os *spots* que sofreram variações no volume do *spot* nas diferentes temperaturas de estocagens e que contribuíram para o agrupamento e separação entre as amostras. Para tanto,

foi realizado uma comparação entre as amostras que foram estocadas a 4, 25 e 37 °C e as amostras controle. A Figura 17 apresenta os *spots* que tiveram um aumento ou diminuição na abundância.

Figura 17 - Identificação dos *spots* diferenciais (numerados acima) em amostras de albúmen estocadas em diferentes temperaturas. Controle (1); 4 °C (2); 25 °C (3); 37 °C (4)

Fonte: Autoria própria.

Após o tratamento das imagens foi possível identificar o desaparecimento de alguns *spots* de proteínas em condições de estocagem em temperatura elevada. Com base nos dados pode-se observar o desaparecimento do *spot* número 1 das amostras de ovos estocados a 25 °C e um aumento desse *spot* nas amostras estocadas a 37 °C. Para o *spot* 9 foi observado um aumento significativo no volume nas amostras estocadas a 37 °C. Para o *spot* 11 foi observado a mesma tendência que o *spot* 1 apresentou. Os *spots* número 32 e 33 seguiram as mesmas tendências, ou seja a degradação em todas as temperaturas de estocagem. Para o *spot* 36 foi

observado a degradação nas temperaturas de 4 e 37 °C. As proteínas referentes ao *spot* 40 desapareceu ou degradou na temperatura de 4 e 25 °C. Os *spots* 18 e 24 sofreram uma diminuição em sua abundância relativa, principalmente em elevadas temperaturas de estocagem. Diferenças significativas ($p < 0,05$) na abundância das proteínas foram detectadas e os *spots* marcados nos géis de poliacrilamida como mostra a Figura 18.

Figura 18 - Identificação dos *spots* diferenciais nos géis 2D-PAGE que aumentaram ou diminuíram em abundância em comparação com as amostras controle (albúmen fresco 0 dias)

Fonte: Autoria própria.

As proteínas com os níveis significativamente alterados ($p < 0.05$) durante a estocagem pertencem às famílias serpina (ovalbumina), transferrina (ovotransferrina) e inibidores Kazal tipo de protease (ovoinibitor). A proteína ovoinibidor, identificada como *spot* número 24, degradou durante a estocagem em elevadas temperaturas (37 °C).

O equilíbrio entre protease e antiprotease no albúmen deve estar envolvido na embriogênese e defesa antimicrobiana. A degradação ou redução na abundância de proteínas como ovomucóide e ovoinibidor induzida pela temperatura de estocagem pode ser um indicativo das principais razões da diminuição da capacidade antimicrobiana no albúmen [13]. Durante a estocagem, foi observada a degradação da ovalbumina também na temperatura de estocagem de 37 °C [13].

Qiu e colaboradores no ano de 2012, usou eletroforese bidimensional e MALDI-TOF MS/MS e identificou 32 *spots* no albúmen de ovos de galinha, o que representava 8 proteínas com diferenças significativas em sua abundância relativa, quando estocados em diferentes temperaturas, e a associou a degradação acelerada da ovalbumina e a redução da atividade antiprotease, sendo a degradação observada após a estocagem dos ovos em temperaturas mais elevadas [13].

Para as amostras de albúmen de ovos de codorna estocadas a 37 °C foi observada uma degradação maior das proteínas em relação às amostras controle, e aquelas estocadas à 4 e 25 °C, que foi evidenciada pela maior quantidade de *spots* identificados. O aumento no número de *spots* nas amostras estocadas a temperatura de 37 °C se deve a degradação da ovotransferrina, pois a sua degradação foi marcada pelo aumento no número de *spots* distribuído horizontalmente ao longo do gel (Figura 19). Na região destacada com círculos na figura 19 foram identificadas proteínas como ovalbumina com *scores* de 172 e 33 para ovalbumina [*Coturnix coturnix*] e ovomucoide [*Coturnix coturnix japônica*], respectivamente. Com a degradação das proteínas presentes nos ovos ocorre também um favorecimento de contaminação por microrganismos, já que algumas dessas proteínas possuem atividade bactericida.

Figura 19 - Indicação das regiões de aumento de proteínas com massas moleculares baixas (indicativo de degradação de proteínas maiores) e ampliação da região da proteína ovotransferrina, em que se verifica um aumento do número de *spots* horizontalmente. (a) controle, (b) 4 °C, (c) 25 °C e (d) 37 °C

Fonte: Autoria própria

A ovotransferrina possui três glicoformas com três valores de pI distintos para as formas aférrico, monoférrico e diférrico, que são responsáveis pela transferência de íons férricos (Fe^{3+}) do oviduto para o embrião em desenvolvimento [16]. Esta proteína possui atividade antimicrobiana para bactérias distintas, incluindo as Gram-positivas e Gram-negativas. A ovotransferrina apresenta certos peptídeos como ovotransferrina OTAP-92 que exerce capacidade antimicrobiana através da interação com membranas [47]. Assim, uma alteração em sua abundância ou modificação que cause uma diminuição na atividade antimicrobiana pode acarretar em uma maior contaminação dos ovos de codorna. No presente trabalho, uma modificação do perfil no grupo de *spots* (formação de mais *spots* distribuídos horizontalmente) identificados como ovotransferrina foi observada no gel por 2D-PAGE. Esse comportamento foi observado nas amostras de ovos de codornas estocadas a temperatura de 37 °C. Esses dados estão de acordo com os reportados por Qui e colaboradores que observou várias isoformas da ovotransferrina em ovos de galinha [13].

As modificações das proteínas que podem ocasionar a variação em sua carga global e consequentemente a mudança em pI são a fosforilação, glicosilação e a proteólise ou degradação. A perda dessas modificações pode levar à perda de alguma funcionalidade das proteínas, tais como a atividade antimicrobiana. A atividade antissalmonela do albúmen diminui rapidamente a temperatura de estocagem de 37 °C, mas permanece no nível mais elevado quando armazenado a 20 °C [47]. Após o tratamento dos géis e identificação dos *spots* com variação significativa na abundância, foi realizada a identificação das proteínas por espectrometria de massas. A Tabela 7 mostra a identificação de cada grupo de *spots* analisados por espectrometria de massas.

Tabela 7 - Identificação das proteínas diferenciais presentes no albúmen, das amostras de ovos de codornas estocados nas diferentes temperaturas de estocagens (4, 25 e 37 °C), por espectrometria de massas

Proteínas identificadas	Spot	pI Teórico	Score	Cobertura (%)	Massa (kDa)
Sero albumina (α-livetina) [<i>Gallus gallus</i>]	33	5.51	65	18	71.868
Ovalbumina [<i>Coturnix coturnix japonica</i>]		5.29	112	28	42.497
Proteína AATF [<i>Gallus gallus</i>]		4.82	70	2	65.235
Ovomucoide [<i>Coturnix coturnix japonica</i>]	9	4.71	64	84	21.489
Lisozima C [<i>Coturnix coturnix japonica</i>]	1, 32 e 40	9.32	76	58	16.78
Ovalbumina [<i>Coturnix coturnix japonica</i>]		5.29	133	40	42.497
Sero albumina [<i>Gallus gallus</i>]		5.51	110	15	71.868
Lisozima C [<i>Coturnix coturnix japonica</i>]	11 e 36	9.32	76	58	16.78
Sero albumina [<i>Gallus gallus</i>]		5.51	200	27	71.868
Ovalbumina-relatada proteína Y [<i>Gallus gallus</i>]	58	5.20	161	13	44.029
Ovoinibidor [<i>Gallus gallus</i>]	24	6.16	40	6	54.394

Fonte: Autoria própria.

Entre as proteínas identificadas foi confirmada a presença de ovalbumina, soroalbumina e lisozima C, sendo essas as proteínas mais abundantes em albúmen. A albumina no ovo é usada como de fonte proteína para o desenvolvimento do embrião e o protege contra contaminação microbiana, e a sua degradação durante a estocagem além de afetar o desenvolvimento embrionário, torna-o mais suscetível a contaminação por microrganismos [50].

4.3.5 Análises proteômica das amostras de plasma submetidos a diferentes temperaturas de estocagem

Para as amostras de plasma, fração solúvel em água, foi necessária a remoção dos lipídios das amostras, pois a interação hidrofóbica entre os lipídios com as proteínas podem interferir na separação das proteínas por 2D-PAGE. Em muitos casos o complexo lipídio-proteína são insolúveis em solução aquosa, resultando na dificuldade para a realização da primeira dimensão (IEF). Os lipídios podem ser removidos a partir da precipitação com acetona [51], etapa que foi realizada no presente trabalho, antes das análises por 2D-PAGE. Após precipitação e quantificação foram realizadas as análises por 2D-PAGE, como mostra a Figura 20.

Figura 20 - Mapa 2D-PAGE das proteínas de amostras de plasma de ovos de codorna submetidas às diferentes temperaturas de estocagem (a) controle; (b) 4 °C; (c) 25 °C e (d) 37 °C

Fonte: Autoria própria.

4.3.6 Análises quimiométricas das amostras de plasma

Para as amostras de plasma foram verificadas tendências distintas das amostras de albúmen, submetidas às mesmas temperaturas de estocagem. A PCA demonstrou uma boa separação entre as amostras estocadas a 4 e 37 °C e o agrupamento ou similaridade entre as amostras estocada a 25 °C e controles. Esse evento demonstra que há uma elevada influência da temperatura também nas proteínas presentes em plasma de ovos de codorna. Contudo, para

as amostras de plasma não foi possível a diferenciação entre as amostras estocadas a 25 °C das amostras controles, visto que ocorreu um agrupamento como mostras a Figura 21. Assim, estas proteínas são lábeis em meio a 4 ° C e 37 °C, mas, ao mesmo tempo sofrem a mesma variação em abundância nas amostras controles e as estocadas à temperatura de 25 °C, ou seja, temos agrupado as proteínas com base na sua diferente sensibilidade à temperatura de estocagem.

Figura 21 - Análise de componentes principais (gráfico de *scores*) de amostras de plasma (controle, 4, 25 e 37 °C).

Fonte: Autoria própria

Para a identificação dos *spots* que contribuíram significativamente para a separação e/ou agrupamento, foi plotado o gráfico de *loading*. A Figura 22 mostra o conjunto de *spots* que contribuíram para a separação e ou agrupamento das amostras de plasma de ovos de codorna estocadas a diferentes temperaturas.

PCA plot showing the distribution of 48 variables (labeled Var_1 to Var_48) in a 2D space defined by principal components p[1] (X-axis) and p[2] (Y-axis). The plot includes the following R-squared values:

- $R^2X[1] = 0.338$
- $R^2X[2] = 0.198$

The plot shows a clear separation of variables into two main groups, likely corresponding to the two different conditions or treatments being compared. The variables are labeled with their respective IDs (e.g., Var_1, Var_2, ..., Var_48).

A variação nas abundâncias dos *spots* de proteínas para as amostras de plasma são mostrados na Figura 23. Para alguns *spots* (8 e 34) foi observado uma diminuição na abundância relativa quando estocadas à 37 °C, enquanto que ocorreu um aumento para esses *spots* nas amostras estocado à 4 °C quando comparados à amostra controle. Para os *spots* 29, 30, 31 e 32 houve um aumento na abundância, principalmente nas amostras estocadas a 37 °C.

Figura 23 - Variação em abundância nos *spots* em amostras de plasma controle (1); 4 °C (2); 25 °C (3); 37 °C (4)

Fonte: Autoria própria.

A maioria dos *spots* aumentou em abundância nos ovos que foram estocados à temperaturas mais elevadas e outros diminuíram o que está de acordo com o observado por Qiu e colaboradores [13] para amostras de albúmen de ovos de galinha estocados a diferentes temperaturas. A Figura 24 mostra as regiões dos *spots* com variações significativas nas abundâncias.

Figura 24 – Identificações dos *spots* diferenciais em amostras de plasma estocadas a diferentes temperaturas.

Fonte: Autoria própria.

A ovotransferrina é outra importante proteína encontrada em grande abundância no albúmen e em menor proporção na gema. A literatura reporta a ovotransferrina como tendo atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de bactérias [11]. Assim, sua degradação ocasiona a diminuição da proteção dos ovos contra bactérias. A Figura 25 mostra em destaque a degradação da ovotransferrina nos ovos estocados em elevada temperatura.

Para as amostras de plasma, assim como nas amostras de albúmen, foi observada uma alteração na distribuição no grupo de *spots*, identificados como ovotransferrina, em temperaturas mais elevadas. Essa alteração ou modificação ocorreu com a formação de mais *spots* distribuídos horizontalmente, o que pode estar relacionada com a perda ou aquisição de alguma modificação pós-traducional. A modificação da ovotransferrina tanto no albúmen quanto na gema pode ocasionar numa diminuição da atividade antimicrobiana.

Figura 25 - Identificação dos *spots* da proteína ovotransferrina em destaque por 2D-PAGE em amostras de plasma submetidos a diferentes temperaturas de estocagem. (a) controle, (b) 4 °C, (c) 25 °C e (d) 37 °C

Fonte: Autoria própria.

Após a análise dos géis de 2D-PAGE, foi realizada a identificação das proteínas por espectrometria de massas. Algumas proteínas identificadas no albúmen também foram encontradas no plasma. A literatura relata que várias proteínas do albúmen tinham sido detectadas na gema (plasma mais fração granular) de ovos de galinha. Foi identificada além da ovalbumina, que estava entre as proteínas mais abundantes do plasma, ovomucóide, ovotransferrina, e ovinibidor [11]. A Tabela 8 apresentam as proteínas identificadas por espectrometria de massas.

Tabela 8 - Identificações dos *spots* (proteínas) diferenciadas presentes no plasma por espectrometria de massas

Proteínas identificadas	Spot	pI Teórico	Score	Cobertura (%)	Massa (kDa)
Sero albumina [<i>Gallus gallus</i>]	29,30,31	5.51	78	12%	71868
Sero albumina [<i>Gallus gallus</i>]	34 e 32	5.51	864	39%	71868
Ovalbumina [<i>Coturnix coturnix</i>]	8	5.29	1158	77%	42467

Fonte: Autoria própria.

O plasma, que contém a fração solúvel em água da gema de ovos de galinha, consiste principalmente de α -livetina (soroalbumina), β -livetina (α 2-glicoproteína), e γ -livetina (IgY) e transferrinas [11,52]. Entre as proteínas identificadas no plasma de ovos de codorna foi confirmada a presença da α -livetina, a albumina e ovotransferrina.

Algumas proteínas foram identificadas nas diferentes regiões distantes do gel. Esse evento pode ser devido à limitada solubilidade em tampão de solubilização de amostra para a separação por eletroforese em gel, a agregação mediante desdobramento e degradação parcial de algumas proteínas por proteases de gema de ovo antes da análise por 2D-PAGE [11].

4.3.7 Análise proteômica da fração granular da gema de ovos de codorna submetidos a diferentes temperaturas de estocagem

Para as amostras da fração granular foi necessária a remoção dos lipídios, que foi feita a partir das lavagens com hexano e com etanol, ambos gelados. As proteínas dessa fração possuem uma grande dificuldade de solubilização no tampão de reidratação usado devido à grande presença de proteínas com características hidrofóbicas. Além disso, as proteínas mais hidrofóbicas são mais difíceis de serem focalizadas, ocorrendo sua precipitação, justificando a maior dispersão entre as amostras. As análises usando 2D-PAGE são mostradas na Figura 26.

Figura 26 - Mapa 2D-PAGE das amostras da fração granular de ovos de codorna submetidas as diferentes temperaturas de estocagem. (a) controle; (b) 4 °C; (c) 25 °C e (d) 37 °C

Fonte: Autoria própria.

As análises realizadas usando 2D-PAGE têm como objetivo a obtenção da matriz de dados para avaliação por métodos quimiométricos, como análise de componentes principais. As imagens das amostras de fração granular foram tratadas da mesma maneira que as de albúmen e plasma.

4.3.8 Análises quimiométricas das amostras de fração granular

A PCA das amostras de fração granular demonstrou uma separação entre as controles e as estocadas as temperaturas de 4° C e um agrupamento entre às estocadas a temperaturas mais elevadas 25 e 37 °C. Para as amostras da fração granular foi observado a formação de 3 grupos independentes, semelhante as amostras de plasma. Algumas proteínas (*spots*) variaram em abundância em meio a 4 ° C, ao mesmo tempo, as estocadas a 37 e 25 °C sofreram variações semelhantes no volume dos *spots*. Nesse sentido, conclui-se que para essas amostras, algumas proteínas sofreram as mesmas influências para as diferentes temperaturas de estocagem (Figura 27). Pasella e colaboradores [53] observaram o mesmo comportamento de algumas proteínas do plasma humano, em que as proteínas de ligação à vitamina D, alfa-1-antitripsina, serotransferrina, apolipoproteína AI, apolipoproteína E, haptoglobina diminuíram em abundância com o aumento da temperatura até 4 °C, mas a temperatura ambiente os seus valores de intensidade média foram semelhantes aos de tempo zero e -80 °C. Além disso, para as amostras da fração granular observou-se um agrupamento diferente em relação as amostras de plasma devido a algumas proteínas que estavam presentes somente na fração granular. Uma dispersão maior das amostras se deve a maior dificuldade de focalização das proteínas mais alcalinas e hidrofóbicas.

Figura 27 – Gráfico de *scores* das amostras de frações granulares estocadas a diferentes temperaturas, em comparação ao controle. (4, 25 e 37 °C)

Fonte: Autoria própria.

Assim como as demais amostras, o gráfico de *loading* foi empregado para a observação das variáveis responsáveis pelo agrupamento e/ou separação entre as amostras. As variáveis com alterações significativas em abundância estão apresentadas na Figura 28.

Figura 28 - Gráfico de *loading* das amostras de fração granular de ovos de codorna (controle, temperatura de 4, 25 e 37 °C)

Fonte: Autoria própria.

Para as amostras de fração granular foi observado um aumento e diminuição de *spots* distintos assim como nas demais amostras de albúmen e plasma. Com base nos dados pode-se observar uma diminuição na abundância para os *spots* 17 e 18 na temperatura de estocagem de 37 °C, enquanto se observou um aumento dos *spots* 18, 20 e 21 nas amostras estocadas a 4 °C. Os *spots* 17, 18, 20 e 21 diminuíram em abundância nas amostras estocadas a 24 °C. Entre as amostras de fração granular foi observado o aparecimento do *spot* identificado como número 35 que pode ser originado a partir da degradação de proteínas com maior massa molecular (Figura 29).

Figura 29 - *Spots* diferenciais em amostras de fração granular. Controle (1); 4 °C (2); 25 °C (3); 37 °C (4)

Fonte: Autoria própria.

Na fração granular foi verificada um número bem menor de proteínas com variações significativas em relação às amostras de albúmen e plasma (Figura 30). Foi verificada uma quantidade maior de proteínas com pI mais básico, considerando as demais amostras de ovos de codornas. Esse número menor de proteínas pode ser devido a menor solubilidade dessas proteínas com característica hidrofóbica.

Figura 30 - Identificação dos *spots* diferenciais nos géis 2D-PAGE de fração granular de ovos de codornas

Fonte: Autoria própria

Assim como nas amostras de albúmen e plasma observou-se o mesmo comportamento da ovotransferrina nas amostras estocadas a 37 °C, ou seja, um aumento no número de *spots* com o aumento da temperatura de estocagem. A Figura 31 destaca o comportamento da ovotransferrinas em ovos de codornas estocados em diferentes temperaturas.

Figura 31 - Identificação dos *spots* da proteína ovotransferrina nas diferentes temperaturas de estocagem, em amostra de fração granular. (a) controle, (b) 4 °C, (c) 25 °C e (d) 37 °C

Fonte: Autoria própria.

Esse comportamento foi observado tanto em amostras de albúmen quanto em plasma, além da fração granular. Esse aumento na quantidade de isoformas também foi observado em algumas proteínas presentes em amostras de plasma humano [53].

Para as amostras de plasma e fração granular, mesmo não se observando uma separação em grupos específicos como ocorreu em amostras de albúmen, podemos estabelecer o *spot* com massa de 76 kD, identificado como ovotransferrina, como um “indicador” que estabelece que as amostras de ovos de codorna foram estocadas em temperaturas acima do ambiente. Além disso, podemos estabelecê-las como biomarcador para controle de qualidade de ovos de codorna.

A ovotransferrina, além de outras proteínas, está presente em grande quantidade no albúmen principalmente em galiformes (frango, *Gallus gallus* e peru, *Meleagris gallopavo*) e também está relacionada com atividade antimicrobianas. Essa atividade é maior nos galiformes do que nos anseriformes (pato, *Anas platyrhynchos*), sendo relacionada à capacidade de sequestrar ferro (Fe^{3+}), essencial para o crescimento microbiano [54].

A ovotransferrina foi sugerida por alguns autores como sendo uma boa indicação para biomarcador de controle de qualidade da casca de ovos de galinha, sendo observada uma mudança em sua abundância durante estocagem das amostras na temperatura entre 20-21 °C por 20 dias [54]. No presente trabalho, além da ovotransferrina foram observadas variações significativas nas proteínas identificadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Identificação das proteínas diferenciais presentes na fração granular por espectrometria de massas

Proteínas identificadas	Número do spot	pI Teórico	Score	Cobertura (%)	Massa (kDa)
Soro albumina [<i>Gallus gallus</i>]	20,21	5.51	448	35%	71.868
Soro albumina [<i>Gallus gallus</i>]	17,18	5.51	119	26%	71.868
Ovalbumina [<i>Coturnix coturnix</i>]	35	5.29	1005	66%	42.467

Fonte: Autoria própria

A função do precursor de soro albumina, presente no albúmen ainda é desconhecida, mas a albumina sérica, a principal proteína do plasma humano é o transporte de Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , ácidos graxos, hormônios, drogas e bilirrubina e a manutenção da pressão osmótica do sangue [55].

4.3.9 Fracionamentos por OFFGEL

As amostras de albúmen estocadas por 21 dias a 37 °C foram fracionadas por OFFGEL e as proteínas separadas por 1D-PAGE. Essas amostras demonstraram uma diminuição da viscosidade, ou seja, um desbaste significativo. As análises por OFFGEL-1D-PAGE revelou a formação de isoformas com características ácidas, ou seja, pI ácido para ovalbumina e ovotransferrina além da degradação da proteína identificada como ovoinibidor (Figura 32).

Figura 32 - 1D-PAGE das proteínas de amostras de albúmen de ovos de codorna fracionadas por OFFGEL. Os números de 1,5-7,0 correspondem ao intervalo de pH dos reservatórios em ordem crescente de pH da tira. (a) amostra controle e (b) amostras estocada a 37 °C por 21 dias

Fonte: Autoria própria.

A ovalbumina é a proteína mais abundante no albúmen de ovos de galinhas e constitui mais de 50% das proteínas totais. Para a proteína ovalbumina está relatada a existência de múltiplas formas desde a difosforilada que representando 87% à forma monofosforilada (12%) e não fosforilada (1%) [47]. Por isto, para o fenômeno do desbaste ou diminuição da viscosidade do albúmen, a literatura sugere que seja ocasionado pela participação dos grupos sulfidrilas (SH) presentes na ovalbumina e que estão possivelmente envolvidos na reação de transição durante o aquecimento ou estocagem. A transição da ovalbumina para a conformação mas

termicamente estável a S-ovalbumina é devido à inversão da configuração dos resíduos de aminoácidos que desempenham um papel central para a formação da ovalbumina termoestável [47].

No presente trabalho, foi empregando o fracionamento por OFFGEL o qual revelou que, após 21 dias de estocagem ocorre a formação de mais isoformas da ovalbumina, ou seja a mudança na proporção de isoformas, sendo o mesmo observado para a ovotransferrina. Além disso, foi observado a degradação da proteína identificada como ovoinibidor. O surgimento do aumento da S-ovalbumina, outras isoformas da ovotransferrina, bem como a degradação do ovoinibidor pode ser devido ao aumento do pH no albúmen, que está correlacionado com a temperatura e tempo de estocagem e que causam consequentemente o desbaste do albúmen. Huang e colaboradores, empregaram os parâmetros HU, pH do albúmen e índice de gema para avaliar a qualidade dos ovos de galinha, a partir da correlação entre o teor de S-ovalbumina e estabeleceu a utilização de S-ovalbumina como um indicador da qualidade de ovos de galinha [56].

A ovotransferrina é a segunda proteína mais abundante presente em ovo e são responsáveis pelo transporte de ferro devido as regiões de ligação aos íons de ferro. Tem sido relatado que ovotransferrinas podem estar presentes em três formas distintas: a ferro livre (pI 7,2), a mono férrica (pI 6,6) e a diférrica (pI 6,2) [47]. No presente trabalho foi observado a degradação em decorrência da formação de mais isoformas com pI ácidos. Embora o aumento da degradação de ovalbumina e OTf durante a estocagem em temperaturas elevadas ter sido demonstrado em ovos de galinha, a análise das mudanças nas proteínas induzida termicamente em albúmen de ovos de codorna, pode ajudar a elucidar a atuação de certas proteínas no processo de deterioração e revelar potenciais biomarcadores associados com a qualidade inferior. Em ovos de galinha, a redução em abundância em algumas proteínas importantes, como clusterina, pode estimular diretamente a diminuição da viscosidade dos ovos de galinha, levando ao processo de deterioração acelerada [47]. Além da formação de isoformas para a ovalbumina e a ovotransferrina, foi observado também a degradação da ovoinibidor, ou seja, durante o processo de desbaste do albúmen ocorre a alteração e degradação de diversas proteínas presentes no albúmen. A mudança no pI de uma proteína depende de modificações que ocorrem a partir de processos bioquímicos, como a desfosforilação, a oxidação ou a perda de aminoácidos carregados [53]. Essas alterações nas proteínas presentes em ovos de codornas estão diretamente associadas ao tempo e temperatura, que consequentemente leva ao aumento do pH tanto do albúmen quanto da gema.

5 CONCLUSÕES

A degradação de proteínas seja do albúmen ou da gema, quer devido ao tempo ou temperatura de estocagem é responsável pela perda da qualidade dos ovos de codorna. O aumento do pH durante um determinado período de estocagem parece ser a principal razão para a modificação das propriedades físico-químicas das proteínas do albúmen e gema (plasma ou fração granular), o que leva a perda na natureza viscosa do albúmen, fenômeno denominado como desbaste. Além do aumento no pH, ocorreu também a perda de massa dos ovos ao longo do período de estocagem. As variações nesses parâmetros estão diretamente correlacionadas com o tempo e temperatura de estocagem.

Em amostras de ovos de codornas estocadas na temperatura de 37 °C por um período de 0-21 dias foi observado um aumento do pH tanto do albúmen quanto da gema e esse aumento, em conjunto com o período, influenciaram também no proteoma das amostras de albúmen, plasma e fração granular. Entre o tempo e temperatura, foi observado uma influência maior da temperatura do que o tempo, uma vez que foi realizado a avaliação da influência da temperatura de amostras estocadas a 4, 25 e 37 °C e observou-se uma maior variação do proteoma nas amostras estocadas na temperatura de 37 °C, ou seja, quanto maior a temperatura menor será o tempo de estocagem.

Nas análises por 2D-PAGE das amostras de albúmen, plasma e fração granular foi observada a presença de proteínas tanto no albúmen quanto na gema, no entanto em abundancias diferentes, essas proteínas são transportadas pelo sangue ao albúmen e do albúmen para a gema por meio de receptores mediados por endobiose. Entre as proteínas presentes em ambas as amostras estão a ovalbumina e ovotransferrinas, proteínas mais abundantes em ovos de galinha e codornas.

A influência da temperatura foi avaliada por meio da separação das proteínas por 2D-PAGE e por aplicação de análises quimiométricas, a análise de componentes principais (PCA). A PCA confirmou a influência da temperatura de estocagem pela formação de 4 grupos independentes para as amostras de albúmen estocadas nas temperaturas de 4, 25 e 37 °C, e as controles. Para as amostras de plasma e fração granular foi observado as mesmas tendências com relação aos grupos, pois ocorreu a formação de 3 grupos. Para as amostras de plasma observou-se o agrupamento das amostras estocadas a 25 °C com as amostras controles. Nas amostras de fração granular foi observado o agrupamento das amostras estocadas a 25 com as 37 °C.

Entre as amostras foi observado alterações em abundância de proteína de diferentes famílias como das pertencentes a serpina (ovalbumina), transferrina (ovotransferrina), inibidores do tipo Kazal (ovoinibidor). Com base nas análises por 2D-PAGE e sem a eliminação de proteínas mais abundante, apenas 9 proteínas do albúmen, 6 do plasma e 5 da fração granular foram observadas com alterações significativas. A degradação dessas proteínas ocasiona uma diminuição da atividade bactericida dessas proteínas e consequentemente, uma maior facilidade de contaminação dos ovos por microorganismos.

Para as amostras fracionadas por OFFGEL e analisadas por 1D-PAGE foi observado a formação de outra isoforma da ovalbumina a partir de sua degradação, essa outra isoforma pode se um produto da transformação da ovalbumina para S-ovalbumina, sua conformação mais estável. Foi observado também a formação de isoformas com pI mais ácidos para a ovalbumina e a ovotransferrina. Essas alterações não foram possíveis de serem observadas por 2D-PAGE em decorrência do intervalo de pH usando nas separações, as quais foram 3-10 NL para 2D-PAGE e 4-7 para OFFGEL. Para a ovoinibidor observou-se sua degradação no 21º dia de estocagem a 37 °C. Assim, as alterações nas isoformas da ovalbumina e da ovotransferrina além da degradação do ovoinibidor, são indicadores de perda da qualidade de ovos de codornas, podendo ser considerados como potenciais biomarcadores para controle de qualidade de ovos de codorna.

6 PERSPECTIVAS

- Avaliar as modificações que ocasionaram a mudança do pI tanto da ovalbumina quanto para a ovotransferrina;
- Identificar quais peptídeos foram formados a partir da degradação do ovoinibidor;
- Avaliar as proteínas presentes em ovos de codornas fertilizados e a influência da temperatura de incubação artificial [37,7 - 37,3 °C, umidade (65%)] nas proteínas presentes e correlacionar ao desenvolvimento do embrião.

REFERÊNCIAS

- 1 KUL, S.; SEKER I. Phenotypic correlations between some external and internal egg quality traits in the japanese quail (*coturnix coturnix japonica*). **International Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 400-405, 2004.
- 2 DACHI, S.; SUYAMA, K.; SUGAWARA, H. Lipids in the egg yolk of japanese quail (*coturnix coturnix japonica*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 60, p. 117-120, 1978.
- 3 CAMPOS, E. J. O comportamento das aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, p. 93-113, 2000.
- 4 MARINHO, A. L. **Qualidade interna e externa de ovos de codornas japonesas armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem**. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - U. A. Centro de Ciências Agrárias em Zootecnia, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2001.
- 5 SERNAGIOTTO, E.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.; STRADIOTTI, A. C.; MARUNO, M. K.; ARAUJO, P. C.; CARVALHO, F. B.; PEZZATO, A. C. The use of carbon and nitrogen stable isotopes type quail feeds. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 15, p. 65-70, 2013.
- 6 PINTO, R. M.; KNOFF, M.; GOMES, C. T.; NORONHA, D. Helminths of the spotted nothura, *nothura maculosa* (temminck, 1815) (aves, tinamidae) in south america. **Parasitología Latinoamericana**, v. 61, p. 152-159, 2006.
- 7 ALMEIDA, D. S. **Qualidade físico-química de ovos comerciais submetidos a diferentes métodos de tratamento de casca e tempos de estocagem**. 2013. 63 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos) Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2013.
- 8 MANN, K.; MANN, M. The proteome of the calcified layer organic matrix of turkey (*meleagris gallopavo*) eggshell. **Proteome Science**, v. 11, p. 40, 2013.
- 9 MANN, K.; MACEK, B.; OLSEN, J. V. Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. **Proteomics**, v. 6, p. 3801-3810, 2006.
- 10 GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T. J.; IMMERSEEL, F. V. Mechanisms of egg contamination by salmonella enteritidis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p. 718-738, 2009.
- 11 MANN, K.; MANN, M. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. **Proteomics**, v. 8, p. 178-191, 2008.
- 12 MANN, K. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. **Proteomics**, v. 8, p. 2322-2332, 2008.

- 13 QIU, N.; MA, M.; ZHAO, L.; LIU, W.; LI, Y.; MINE, Y. Comparative proteomic analysis of egg white proteins under various storage temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7746-7753, 2012.
- 14 MANN, K. The chicken egg white proteome. **Proteomics**, v. 7, p. 3558-3568, 2007.
- 15 D'AMBROSIO, C.; ARENA, S.; SCALONI, A.; GUERRIER, L.; BOSCHETTI, E.; MENDIETA, E. M.; CITTERIO, A.; RIGHETTI, P. G. Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 3461-3474, 2008.
- 16 WANG, J.; LIANG, Y.; OMANA, D. A.; KAV, N. N. V.; WU, J. Proteomics analysis of egg white proteins from different egg varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 272-282, 2012.
- 17 IBRAHIM, H. R.; AOKI, T.; PELLEGRINI, A. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 671-693, 2002.
- 18 DESERT, C.; GUÉRIN-DUBIARD, C.; NAU, F.; JAN, G.; VAL, F.; MALLARD, J. Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4553-4561, 2001.
- 19 AKYUREK, H.; OKUR, A. A. Effect of storage time, temperature and hen age on egg quality in free-range layer hens. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, p. 1953-1958, 2009.
- 20 REHAULT-GODBERT, S.; BARON, F.; MIGNON-GRASTEAU, S.; LABAS, V.; GAUTIER, M.; HINCKE, M. T.; NYS, Y. Effect of temperature and time of storage on protein stability and anti-salmonella activity of egg white. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 1604-1612, 2010.
- 21 KAROUI, R.; KEMPS, B.; BAMELIS, F.; KETELAERE, B. D.; DECUYPERE, E.; BAERDEMAEKER, J. D. Methods to evaluate egg freshness in research and industry: a review. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 727-732, 2005.
- 22 SILVERSIDES, F. G.; BUDGELL, K. The relationships among measures of egg albumen height, pH and whipping volume. **Poultry Science**, v. 1, p. 1619-1623, 1996.
- 23 ALLEONI, A. C. C.; ANTUNES, A. J. Haugh Unit as a measure of the quality of hen. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 681-685, 2001.
- 24 RAIKOS, V.; HANSEN, R.; CAMPBELL, L.; EUSTON, S. Separation and identification of hen egg protein isoforms using SDS-PAGE and 2D gel electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 99, p. 702-710, 2006.
- 25 HÖRTH, P.; MILLER, C. A.; PRECKEL, T.; WENZ, C. Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, v. 5, p. 1968-1974, 2006.

- 26 GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.
- 27 RAILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1829-1841, 2011.
- 28 BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 273-281, 2003.
- 29 ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; BIHAN, M. L.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; ROEPSTORFF, P. 2D gels still have a niche in proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 88, p. 4-13, 2013.
- 30 MANN, K.; MANN, M. In-depth analysis of the chicken egg white proteome using an LTQ Orbitrap Velos. **Proteome Science**, v. 9, p. 7, 2011.
- 31 LAM, H.; JOSSERAND, J.; LION, N.; GIRAULT, H. H. Modeling the isoelectric focusing of peptides in an OFFGEL multicompartiment cell. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 1666-1676, 2007.
- 32 KALLI, A.; SMITH, G. T.; SWEREDOSKI, M. J.; HESS, S. Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ Orbitrap mass analyzers. **Journal of Proteome Research**, v. 12, p. 3071-3086, 2013.
- 33 MCALISTER, G.; BERGGREN, W. T.; HORNING, S.; MAKAROV, A.; PHANSTIEL, D.; GRIEP-RAMING, J.; STAFFORD, G.; SWANEY, D. L.; SYKA, J. E. P.; ZABROUSKOV, V.; COON, J. J. A proteomics grade electron transfer dissociation-enabled hybrid linear ion Trap Orbitrap mass spectrometer. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 3127-3136, 2008.
- 34 CHAIT, B. T. Mass spectrometry in the postgenomic era. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, p. 239-246, 2011.
- 35 SWITZAR, L.; GIERA, M.; NIESSEN, W. M. A. Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. **Journal of Proteome Research**, v. 12, p. 1067-1077, 2013.
- 36 CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.
- 37 AHRNÉ, E.; MÜLLER, M.; LISACEK, F. Unrestricted identification of modified proteins using MS/MS. **Proteomics**, v. 10, p. 671-686, 2010.
- 38 NETO, B. B.; BRUNS, R.; SCARMINIO, I. S. Assuntos gerais. **Química nova**, v. 29, p. 1401-1406, 2006.
- 39 ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, p. 433-459, 2010.

- 40 SUSSULLINI, A. **Avaliação dos perfis metabonômicos, proteômicos e metalômicos para o transtorno afetivo bipolar e seu tratamento com lítio em amostras de soro sanguíneo**. 2010. 115 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Campinas, Unicamp, Campinas, 2010.
- 41 SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2856-2860, 2006.
- 42 RAMOS, B.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Changes of yolk biogenic amine concentrations during storage of shell hen eggs. **Food Chemistry**, v. 116, p. 340-344, 2009.
- 43 OLIVEIRA, G. E.; FIGUEIREDO, T. C.; SOUZA, M. R.; OLIVEIRA, A. L.; CANÇADO, S. V.; GLORIA, M. B. A. Bioactive amines and quality of egg from dekalb hens under different storage conditions. **Poultry Science**, v. 88, p. 2428-2434, 2009.
- 44 SEDAT, A. Effects of age and storage duration on relationships among albumen quality traits and egg weight in japanese quails. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, p. 3340-3344, 2011.
- 45 ONO, T.; MURAKAMI, T.; TANABE, Y.; MIZUTANI, M.; MOCHII, M.; EGUCHI, G. Culture of naked quail (*coturnix coturnix japonica*) ova *in vitro* for avian transgenesis : culture from the single-cell stage to hatching with pH-adjusted chicken thick albumen. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 113, p.287-292, 1996.
- 46 BILADEAU, A. M.; KEENER, K. M. The effects of edible coatings on chicken egg quality under refrigerated storage. **Poultry Science**, v. 88, p. 1266-1274, 2009.
- 47 OMANA, D. A.; LIANG, Y.; KAV, N. N. V.; WU, J. Proteomic analysis of egg white proteins during storage. **Proteomics**, v. 11, p. 144-153, 2011.
- 48 IMAI, C.; MOWLAH, A.; SAITO, J. Storage stability of japanese quail (*coturnix coturnix japonica*) eggs at room temperature. **Poultry Science**, v. 65, p. 474-480, 1984.
- 49 MORI, M.; MASUDA, N. Proteins of the vitelline membrane of quail (*coturnix coturnix japonica*). **Poultry Science**, v. 72, p. 1566-1572, 1990.
- 50 QIU, N.; MA, M.; CAI, Z.; JIN, Y.; HUANG, X.; HUANG, Q.; SUN, S. Proteomic analysis of egg white proteins during the early phase of embryonic development. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 1895-1905, 2012.
- 51 SHAW, M. M.; RIEDERER, B. M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 3, p. 1408-1417, 2003.
- 52 JUNEJA, R. K.; KURLY, J.; WILHELMSON, M. Genetic polymorphism of β -livet in egg yolk of hens. **Hereditas**, v. 99, p. 251-255, 2008.

- 53 PASELLA, S.; BARALLA, A.; CANU, E.; PINNA, S.; VAUPEL, J.; DEIANA, M.; FRANCESCHI, C.; BAGGIO, G.; ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; CASTALDO, G.; CARRU, C.; DEIANA, L. Pre-analytical stability of the plasma proteomes based on the storage temperature. **Proteome Science**, v. 11, p. 10, 2013.
- 54 GIANSAANTI, F.; LEBOFFE, L.; PITARI, G.; IPPOLITI, R.; ANTONINI, G. Physiological roles of ovotransferrin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, 218-225, 2012.
- 55 PRAJANBAN, B.; SHAWSUAN, L.; DADUANG, S.; KOMMANEE, J.; ROYTRAKUL, S.; DHIRAVISIT, A.; THAMMASIRIRAK, S. Identification of five reptile egg whites protein using MALDI-TOF mass spectrometry and LC/MS-MS analysis. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 1940-1959, 2012.
- 56 HUANG, Q.; QIU, N.; MA, M. H.; JIN, Y. G.; YANG, H.; GENG, F.; SUN, S. H. Estimation of egg freshness using s-ovalbumin as an indicator. **Poultry Science**, v. 91, p. 739-743, 2012.
- 57 CAPOZZI, F.; BORDON, A. Foodomics: A New Comprehensive Approach to Food and Nutrition. **Genes and Nutrition**, v. 8, p. 1-4, 2013.
- 58 CUNSOLO, V.; MUCCILLI V.; SALETTI, R.; FOTI, S. Mass Spectrometry in Food Proteomics: A Tutorial, **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, p. 768-84, 2014.
- 59 GIACOMETTI, J.; JOSIC, D. Foodomics in Microbial Safety. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 16-22, 2013.
- 60 HERRERO, M.; SIMÓ, C.; GARCIA-CAÑAS, V.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Foodomics: MS-Based Strategies in Modern Food Science and Nutrition. **Mass spectrometry reviews**, v. 31, p. 49-69, 2012.