

# Aula

---

# 5

## ELETROFORESE

### META

Ao final desta aula o aluno deverá dominar o princípio básico da eletroforese, os fatores que influenciam a migração eletroforética, assim como, conhecer os diferentes tipos de eletroforese.

### OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:

conhecer o princípio de separação de proteínas usando o campo elétrico;

conhecer os principais tipos de eletroforese; e

conhecer os métodos eletroforéticos para determinação do peso molecular e do ponto isoelétrico de uma proteína

### PRÉ-REQUISITOS

Para entender esta aula o aluno precisará de um conhecimento prévio de:

noções básicas de campo elétrico;

bioquímica de proteína;

pH e tampões.



O gel de acrilamida é usado para separar proteínas. As proteínas são transferidas a uma membrana e detectadas então com um anticorpo (Fonte: <http://www.molecularstation.com>).

### INTRODUÇÃO

A eletroforese é uma técnica analítica de separação de misturas de substâncias carregadas eletricamente, utilizando para isto um campo elétrico. Além de separar substâncias com carga elétrica, ela pode ser usada na caracterização de uma molécula, tal como determinar a massa relativa e o seu ponto isoelétrico. Em análises clínicas, esta técnica tem grande valor diagnóstico uma vez que é possível determinar a concentração de substâncias no soro humano. Atualmente, esta técnica vem sendo largamente usada em vários ramos da Biologia, Medicina Humana e Veterinária: análises clínicas, bioquímica, genética molecular, pesquisa, entre outros.

O campo de aplicação desta técnica é vasto e isto se deve principalmente a simplificação da aparelhagem utilizada e também da disponibilidade de meios de suportes altamente purificados, o que veio a diminuir o tempo gasto no processo de separação.



Equipamento de eletroforese em gel (Fonte: <http://pt.wikipedia>).

## ELETROFORESE

A eletroforese é uma técnica biofísica de análise baseada na migração diferencial de compostos carregados eletricamente quando submetidos a um campo elétrico. A principal força motriz para o movimento das partículas carregadas em um campo elétrico é a diferença de potencial aplicada entre os eletrodos. O eletrodo positivo (ânodo) atrai ânions (íons negativos) e o eletrodo negativo (cátodo) atrai cátions (íons positivos). Consequentemente, quanto maior a intensidade da voltagem aplicada, maior será a velocidade com que as cargas se dirigem ao polo de sinal oposto. Entretanto, se a voltagem utilizada for muito alta pode gerar muito calor e ressecar o suporte, além de poder desnaturar as partículas que estão sendo submetidas à separação (Heneine, 1995, p. 33).

As moléculas carregadas eletricamente migram para o polo de carga oposta quando submetidas a um campo elétrico. Só há migração eletroforética ou mobilidade eletroforética se a partícula possuir carga elétrica livre, seja ela negativa ou positiva. Frente ao campo elétrico, os ânions migram para o polo positivo e os cátions migram para o polo negativo. Uma partícula eletricamente neutra não possui mobilidade eletroforética.

A migração eletroforética é regida por 2 leis de Coulomb:

1. migração qualitativa – as partículas migram para o polo de sinal contrário. Como foi explicado anteriormente, os cátions migram para o polo negativo (cátodo) e os ânions migram para o polo positivo (ânodo). Na Fig. 47 a mistura foi aplicada no centro do campo elétrico como indicado pela seta. Como podemos ver mistura é constituída de 3 partículas, uma neutra, uma positiva e uma negativa. A neutra não tem mobilidade sob ação do campo elétrico e permanece no ponto de aplicação (centro), a positiva migra para o polo (-) e a negativa migra para o polo (+). Desta forma, é possível através da eletroforese separar partículas de cargas diferentes. Vale ressaltar, que quando a amostra apresenta uma heterogeneidade em carga elétrica, a aplicação deve ser no centro do suporte.

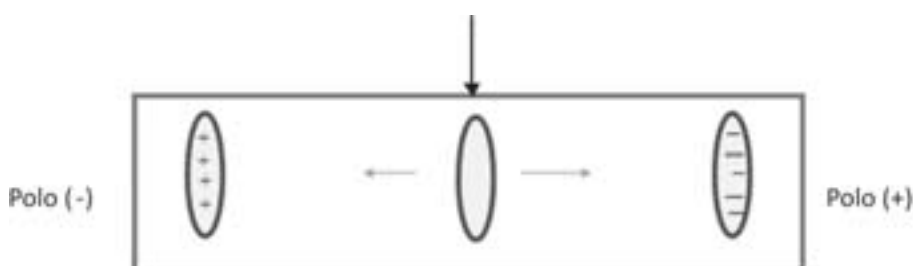


Figura 47. Migração qualitativa de partículas eletricamente carregadas sob a ação de um campo elétrico. Observe que as partículas migram para o polo de sinal contrário.

2. migração quantitativa – a velocidade de migração eletroforética depende da quantidade ou densidade de cargas da partícula. Desta forma, quanto mais carregada estiver uma partícula, ou seja, quanto maior a densidade de carga dela, maior será a velocidade de migração em um campo elétrico. A Fig. 48 mostra um exemplo representativo de uma migração quantitativa de uma mistura de 3 partículas carregadas negativamente. Nota-se que como a amostra é negativa o ponto de aplicação fica mais próximo do polo negativo e aí elas migram todas para o polo positivo. A molécula com maior densidade de carga terá um maior deslocamento quando sob a ação de um campo elétrico. Se a mistura fosse composta por partículas positivas, a aplicação da amostra seria no polo positivo (Hencine, 2006, p.192).

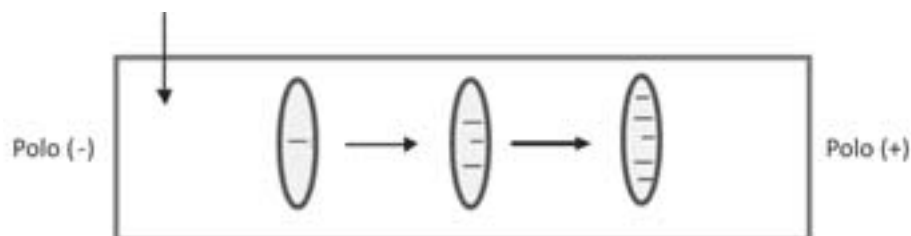


Figura 48. Migração quantitativa de três moléculas carregadas negativamente. Podemos observar que a partícula que migrou mais apresenta uma maior quantidade de cargas.

A velocidade com que uma partícula se movimenta no campo elétrico não depende somente da sua quantidade de cargas ou da diferença de potencial aplicada entre os eletrodos, mais também da massa relativa da molécula. O tamanho da macromolécula ou massa relativa também influencia de forma decisiva na sua velocidade de migração. Quanto maior a massa relativa de uma partícula menor será a sua velocidade de migração em direção ao polo de sinal contrário.

Até aqui vimos que 3 fatores importantes podem influenciar na velocidade de migração de uma partícula em campo elétrico. Estes fatores são:

1. Quantidade de carga elétrica de uma partícula – quanto maior a densidade de cargas maior a velocidade de migração;
2. Massa relativa da partícula - quanto maior o tamanho da partícula menor a velocidade de migração;
3. Diferença de potencial elétrico – quanto maior a diferença de potencial (ddp), entre os eletrodos, maior a velocidade de migração.

As proteínas são moléculas que apresentam grupamento ácido ( $\text{COO}^-$ ) e grupamento básico ( $\text{NH}_3^+$ ). As proteínas são moléculas anfotéricas, ou seja, em solução ou suspensão, as proteínas podem apresentar-se com carga positiva, negativa ou neutra. O pH (potencial hidrogeniônico) altera a carga de uma proteína. Cada proteína apresenta um ponto isoelétrico (pI) específico. O que é pI? É o pH em que a proteína se encontra eletri-

camente neutra e, conseqüentemente, a mobilidade em campo elétrico é nulo. Se o pI da proteína for igual ao pH da solução, a proteína apresenta-se neutra. Se o pI da proteína for menor do que o pH do meio (meio básico) a proteína apresenta-se negativa. E se o pI da proteína for maior do que o pH do meio (meio ácido) a proteína apresenta-se positiva.

A proteína fica positiva quando apresenta maior número de grupos  $\text{NH}_3^+$ . Isto ocorre em pH ácido, uma vez que os grupos  $\text{COO}^-$  serão neutralizados pelo excesso de prótons ( $\text{H}^+$ ) do meio e, conseqüentemente, haverá excesso de grupos  $\text{NH}_3^+$ . Em pH básico, as partículas ficam carregadas negativamente, isto é, com maior número de grupos  $\text{COO}^-$ , pela neutralização dos grupos  $\text{NH}_3^+$  pelas hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) presentes no meio básico. Se o pH do meio for igual ao pI da proteína, as partículas ficam neutras, ou seja, as cargas positivas serão iguais às cargas negativas (mesma quantidade de grupos  $\text{COO}^-$  e  $\text{NH}_3^+$ ) (Heneine, 2006, p.192).

Exemplo: a albumina apresenta um pI fixo de 4,7. Vamos ver como o pH do meio influencia na carga elétrica desta proteína (Tabela 1).

Tabela 1. Alteração da carga elétrica da albumina variando-se o pH do meio

pI	pH	Carga elétrica	Relação pI/pH
4,7	4,7	Neutra	pI = pH
4,7	8,0	Negativa	pI < pH
4,7	3,0	Positiva	pI > pH

O pH da solução também influencia na quantidade de cargas da proteína. Quanto maior a diferença entre o pI e o pH do meio maior a densidade de cargas da partícula. Ou seja, quanto maior a diferença de entre os valores de pI e pH, mais carga a molécula terá e, conseqüentemente, maior será sua movimentação em um campo elétrico.

Exemplo: Duas proteínas A e B com pI de 4,0 e 6,0, respectivamente, são submetidas a uma eletroforese com um pH igual a 8,0. Como ambas apresentam um pI menor do que o pH do meio elas vão possuir carga negativa, ou seja, o meio está básico e elas vão se comportar como ácidos. Qual destas 2 proteínas tem maior quantidade de cargas? A quantidade de cargas não pode ser igual uma vez que elas apresentam pontos isoelétricos diferentes. A proteína que estiver mais ácida ou a que estiver mais distante do pH estará mais carregada eletricamente. Entre as proteínas A e B, a proteína A com o pI de 4,0 é a mais ácida ou a mais negativa. Sob ação do campo elétrico, ela vai migrar com maior velocidade.

A solução tampão determina qual a carga da proteína (positiva, negativa ou neutra) e também determina a quantidade de carga da proteína.

### MATERIAL USADO EM ELETROFORESE

1. *Fonte de energia* – existem vários tipos e modelos de fontes usadas em eletroforese. As fontes de energia contêm um regulador de voltagem e outro de intensidade e um interruptor para ligar e desligar. A corrente elétrica que chega nas tomadas é alternada e não serve para a separação de partículas. Para se obter a separação é preciso ter corrente contínua, cujo sentido é invariável: um polo é sempre positivo e o outro é negativo. A fonte usada em eletroforese tem essa função de fornecer corrente contínua (Heneine, 1995, p.28).

2. *Cuba eletroforética* – a cuba eletroforética consiste em uma câmara com uma divisória central. Apresenta um formato retangular e tamanho variado. Os eletrodos (cátodo e ânodo) estão de cada lado da cuba e podem ser de platina, carvão ou cobre. A cuba possui uma ponte para adaptar o suporte usado para aplicação da mistura que se deseja separar.

3. *Suportes* – o suporte é o local onde se aplica a amostra a ser analisada. Ele pode ser sólido (papel, acetato de celulose) ou semi-sólido (gel de ágar, gel de agarose, gel de poliacrilamida). Os suportes são adaptados na cuba eletroforética com as duas extremidades do suporte mergulhados na solução tampão.

4. *Aplicadores* – A amostra a ser separada eletroforéticamente deve ser aplicada no suporte com o auxílio de aplicadores. Os aplicadores podem ser seringas, micropipetas, capilares de vidro ou aplicadores específicos para eletroforese. Vale ressaltar que para fazer a separação de uma mistura deve ser aplicado um volume determinado da amostra.

5. *Solução tampão* – a cuba eletroforética é preenchida com solução tampão com igual volume de cada lado. A solução tampão é uma solução composta por um ácido fraco e o sal deste ácido ou uma base fraca e o sal desta base. O tampão é uma solução que tem a capacidade de resistir a variações de pH, mesmo após a adição de pequenas quantidades de ácidos ou bases. Além de manter o pH constante, a solução tampão é uma solução condutora de corrente elétrica. O tampão também ajuda a manter o ambiente com uma atmosfera úmida, isto evita o ressecamento do suporte decorrente do calor gerado pela passagem de corrente elétrica pelo suporte. Para evitar o aquecimento, recomenda-se usar tampão gelado ou câmara dotada de sistema de resfriamento. Além disso, é recomendado trabalhar com voltagens baixas para que ocorra uma pequena passagem de corrente elétrica através do suporte e, conseqüentemente, produção de pouco calor.

Resumindo as funções do tampão na cuba eletroforética:

- a) Conduzir corrente elétrica;
  - b) Manter o pH constante;
  - c) Fornecer a concentração de íons adequada;
  - d) Manter a umidade dentro da câmara;
  - e) Repor o líquido evaporado no suporte (Heneine, 1995, p.32).
6. *Corantes* – O corante é usado para revelar as moléculas que foram fracionadas. O corante é específico para a cada molécula (proteína, lipídio, etc.).
7. *Densitômetro* – Após a separação das frações, elas podem ser quantificadas, ou seja, é possível determinar a concentração de cada fração. O densitômetro é um aparelho que permite a dosagem das frações de forma direta. Uma luz monocromática, produzida pelo aparelho, atravessa cada fração e a quantidade de luz absorvida por ela é determinada. No final, o densitômetro fornece os valores relativos (% do total) e absolutos (g/dL) de cada fração separada através da eletroforese.
8. *Espectrofotômetro* – Se o laboratório não dispõe de um densitômetro, é possível determinar a absorção de luz usando um espectrofotômetro, aparelho bastante usado nas dosagens bioquímicas. Neste caso, cada fração deve ser cortada do suporte e eluída (removida) com um solvente apropriado, colocada em uma cubeta e feita a leitura da absorção de luz no espectrofotômetro.

## TIPOS DE ELETROFORESE

A eletroforese pode ser feita sem suporte (eletroforese livre) ou com o uso de suportes.

### ELETROFORESE SEM SUPORTE OU LIVRE

A eletroforese livre foi desenvolvida por Arne Tiselius, em 1937. A cuba eletroforética tem um formato de um tubo em forma de U (Fig. 49). Este tubo é preenchido com uma solução tampão com um determinado pH. A mistura protéica a ser fracionada é adicionada no tampão. Aplica-se uma diferença de potencial entre os eletrodos e as proteínas migram, na solução, para o polo de sinal contrário. No final, formam-se duas frentes de proteínas, as negativas no polo positivo e as positivas no polo negativo. Esta técnica está em desuso.

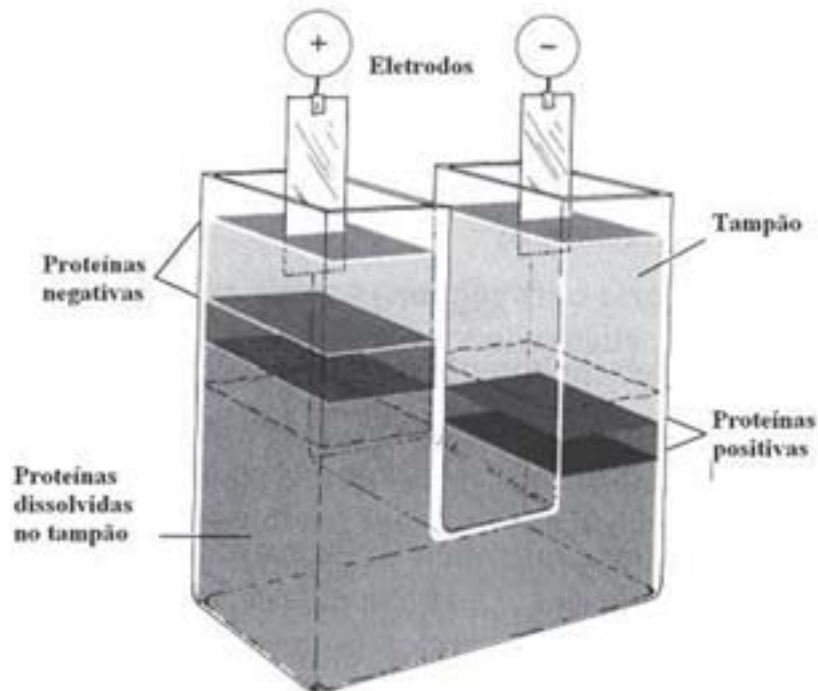


Figura 49. Representação da eletroforese livre ou sem suporte. A cuba tem um formato de U e as proteínas estão dissolvidas no tampão.

### ELETROFORESE COM SUPORTE

A eletroforese em suporte foi inventada por um brasileiro chamado Paulo Koenig, em 1937. Ele trabalhava no Instituto Butantan, em São Paulo, e usou o papel como suporte para separar proteínas de venenos ofídicos (Heneine, 1995, p. 23). Nos suportes, as amostras são aplicadas e são separadas em frações ou bandas no próprio suporte. Apresenta algumas vantagens em relação à eletroforese sem suporte: pequeno volume de amostra (0,5 a 2 ml) a ser aplicado no suporte e separações mais nítidas.

O material a ser examinado é aplicado no suporte, no centro ou nas extremidades a depender da carga da amostra. Depois, a corrente elétrica é ligada em uma determinada voltagem e as partículas migrarão para o polo de sinal contrário, numa velocidade característica. No fim da corrida eletroforética, cada componente é nitidamente separado dos outros.

Os suportes podem ser sólidos (papel, acetato de celulose) ou semi-sólidos (gel de ágar, agarose, amido e gel de poliacrilamida).

A eletroforese pode ser feita em posição horizontal ou vertical. A Fig. 50 mostra uma eletroforese realizada em sistema horizontal. Os suportes sólidos ou semi-sólidos podem ser usados em sistema horizontal e o princípio de separação é baseado na diferença de cargas entre os



componentes. A eletroforese vertical usa suporte semi-sólido e o princípio de separação está baseado tanto na carga quanto na massa dos componentes (Fig. 51).

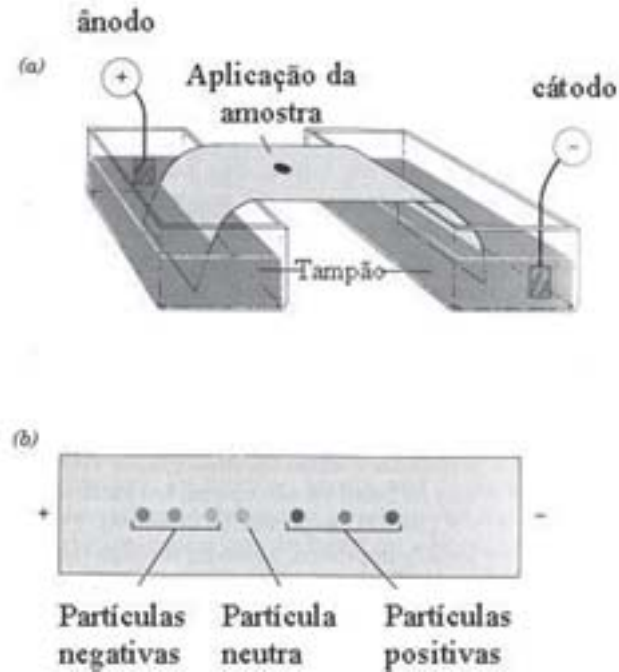


Figura 50. Eletroforese horizontal. (a) cuba eletroforética com aplicação da amostra no centro do suporte sólido. (b) perfil eletroforético com as frações separadas.

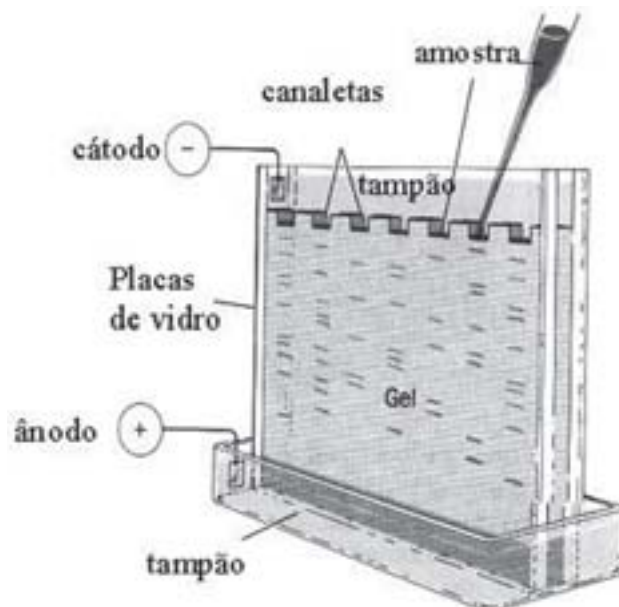


Figura 51. Eletroforese em gel vertical. A amostra é aplicada nas canaletas posicionadas no topo do gel. A corrida eletroforética ocorre de forma descendente, do cátodo para o ânodo.

### SUPORTES SÓLIDOS

Os suportes sólidos permitem a separação de acordo com a carga elétrica das partículas, ou seja, moléculas de mesma carga ou mesmo pI não são separadas neste tipo de suporte.

### ELETROFORESE EM PAPEL

O primeiro suporte utilizado em eletroforese foi o papel de filtro (Fig. 50). O papel deve ser umedecido no mesmo tampão usado na cuba eletroforética e conectado com as extremidades imersas na solução tampão. A amostra pode ser aplicada no centro do suporte (amostra com diferentes cargas) ou na extremidade do papel. Quando a amostra é negativa aplica-se no polo negativo e quando a amostra é positiva aplica-se no polo positivo.

### ELETROFORESE EM ACETATO DE CELULOSE

O suporte de acetato de celulose substituiu o papel e com algumas vantagens. A principal vantagem é que o acetato de celulose, após a corrida eletroforética, revelação e secagem, fica transparente, apenas com as frações coradas. A transparência do suporte permite a leitura automatizada das frações no densitômetro, diferentemente do papel, que é opaco (branco) e não permite a passagem da luz. É um suporte de escolha em laboratórios de análises clínica pelo baixo custo, facilidade e rapidez na execução.



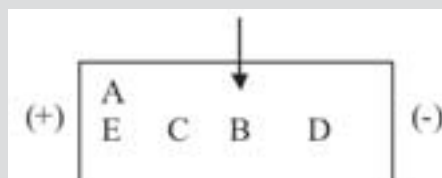
### ATIVIDADES

Uma mistura contendo 5 proteínas (A, B, C, D e E) de pI 4.5, 6.0, 5.5, 7.0 e 4.5, respectivamente, foram submetidas a uma eletroforese em suporte sólido usando um tampão de pH 6.0. Qual vai ser a ordem de separação e o ponto de aplicação?

### COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

Em pH 6.0, teremos proteínas negativas, positivas e neutras. Então, o ponto de aplicação deve ser no centro do suporte, como indicado com uma seta. As proteínas com o pI menor do que o pH possuem carga negativa, as que possuem pI maior do que o pH possuem carga positiva e as que apresentam o pI igual ao pH são neutras. Desta forma, a proteína B (pI 6.0) está neutra e não migrará em campo elétrico. As proteínas A, C e E estão eletronegativas neste pH e irão migrar para o

polo positivo. Como as proteínas A e E possuem o mesmo pI, não se separam porque apresentam a mesma mobilidade eletroforética. A proteína D é positiva e migrará para o polo negativo. Veja, na figura abaixo, como ficaria separada a mistura de proteínas em suporte sólido.



*Faça você este exercício:* uma mistura contendo 5 proteínas (A, B, C, D e E) de pI 5,0, 8,5, 7,5, 7,0 e 8,5, respectivamente, foram submetidas a uma eletroforese em suporte sólido usando um tampão de pH 9,0. Qual vai ser a ordem de separação e o ponto de aplicação?

### SUPORTES SEMI-SÓLIDOS (GEL)

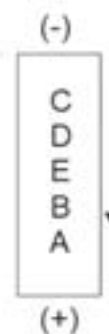
O suporte em gel promoveu um grande avanço na eficiência de separação das frações submetidas à eletroforese. Isto se deve ao fato do gel ser um polímero com poros que permite a separação das partículas não somente pela carga mais também pela massa relativa. O gel dificulta a migração das partículas de massa grande e facilita a migração de partículas de massa pequena. Para isto, é preciso variar o tamanho dos poros do gel de acordo com a faixa de massa relativa.

### ATIVIDADES

Como seria a separação da mistura abaixo, em suporte em gel usando um tampão 9,0?



Proteína	pI	Massa
A	4,0	35.000
B	5,5	25.000
C	8,0	18.000
D	7,0	40.000
E	5,5	37.000



Comentário: em pH 9.0, todas as proteínas estão com o pI menor do que o pH. Portanto, estão com carga negativa. A aplicação deve ser feita na extremidade do suporte voltada para o polo negativo. Todas as proteínas irão migrar para o polo positivo. A proteína mais carregada eletricamente irá migrar mais rápido. Qual proteína está mais carregada? Aquela que estiver com um pI mais distante do pH do meio. A proteína A está mais carregada eletricamente e irá migrar mais em campo elétrico. As proteínas B e E apresentam o mesmo pI mais com massas diferentes. A proteína B como é menos pesada do que a proteína E e, portanto, irá migrar mais.

### ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS

Um outro tipo de eletroforese é aquela feita em presença de SDS (dodecil sulfato de sódio). O SDS é um detergente negativo que rompe todas as ligações covalentes da proteína que perde sua conformação tridimensional e se desenrola. O SDS liga-se as proteínas formando um complexo de carga negativa (Fig. 52). As proteínas quando tratadas com o SDS adquirem carga negativa e a separação ocorre baseada apenas na diferença de massa relativa entre elas. Neste sistema as proteínas de menor massa relativa migram com maior velocidade.

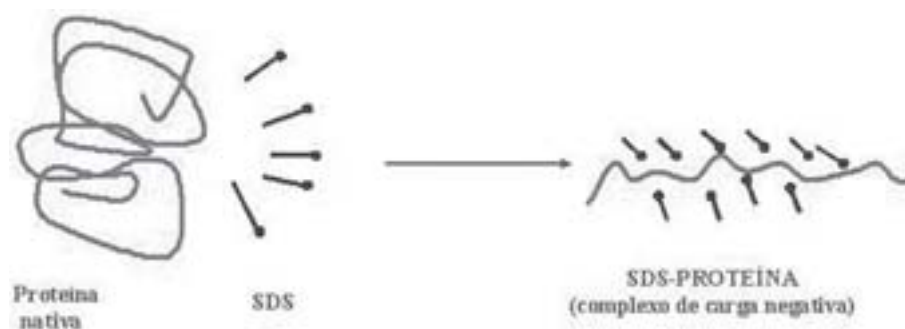


Figura 52. Ligação entre uma proteína nativa e o SDS (dodecil sulfato de sódio). O SDS forma um complexo de carga negativa com a proteína.

A eletroforese em gel na presença de SDS é um método bastante usado para o cálculo do peso molecular das proteínas. É possível determinar a massa de uma proteína através da comparação com proteínas de massa conhecida (proteínas padrão). No gel, é reservada uma canaleta para aplicação das proteínas de massa relativa conhecida e em uma segunda canaleta aplica-se a proteína de massa desconhecida (Fig. 53). Depois da corrida eletroforética mede-se, com o auxílio de uma régua, a migração

das proteínas padrão e da desconhecida. Depois, constrói-se uma curva padrão que representa a mobilidade eletroforética de cada proteína padrão frente ao logaritmo do peso molecular. Com isto obtém-se uma reta que pode ser utilizada para determinar a massa relativa de uma proteína que se quer estudar.

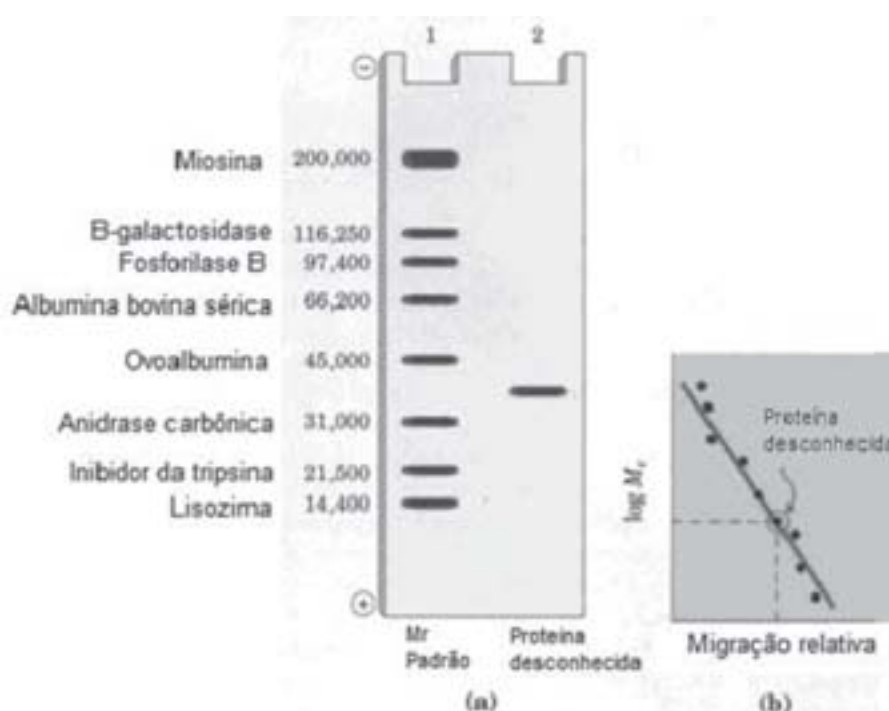


Figura 53. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Painel (a), na canaleta 1 foram aplicadas as proteínas padrão de massa relativa ( $M_r$ ) e na canaleta 2 foi aplicada a proteína desconhecida. Painel (b) gráfico para cálculo da massa relativa da proteína desconhecida.

## ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS E BETA-MERCAPTOETANOL

Quando se quer verificar se uma dada proteína é formada por mais de uma subunidade, ou seja, mais de uma cadeia polipeptídica, trata-se a proteína com SDS para que ela adquira carga negativa e adiciona-se o beta-mercaptoetanol. Esta substância rompe ponte dissulfeto da proteína (S-S) e dissocia as subunidades. Se uma proteína tratada com beta-mercaptoetanol é submetida à eletroforese e nela são visualizadas 2 bandas separadas, significa que a proteína é constituída por 2 subunidades protéicas unidas por ponte dissulfeto. Além disso, é possível determinar a massa de cada subunidade através de sua migração relativa. A Fig. 54 mostra uma eletroforese em gel de poliacrilamida em que as proteínas foram tratadas com SDS e beta-mercaptoetanol.

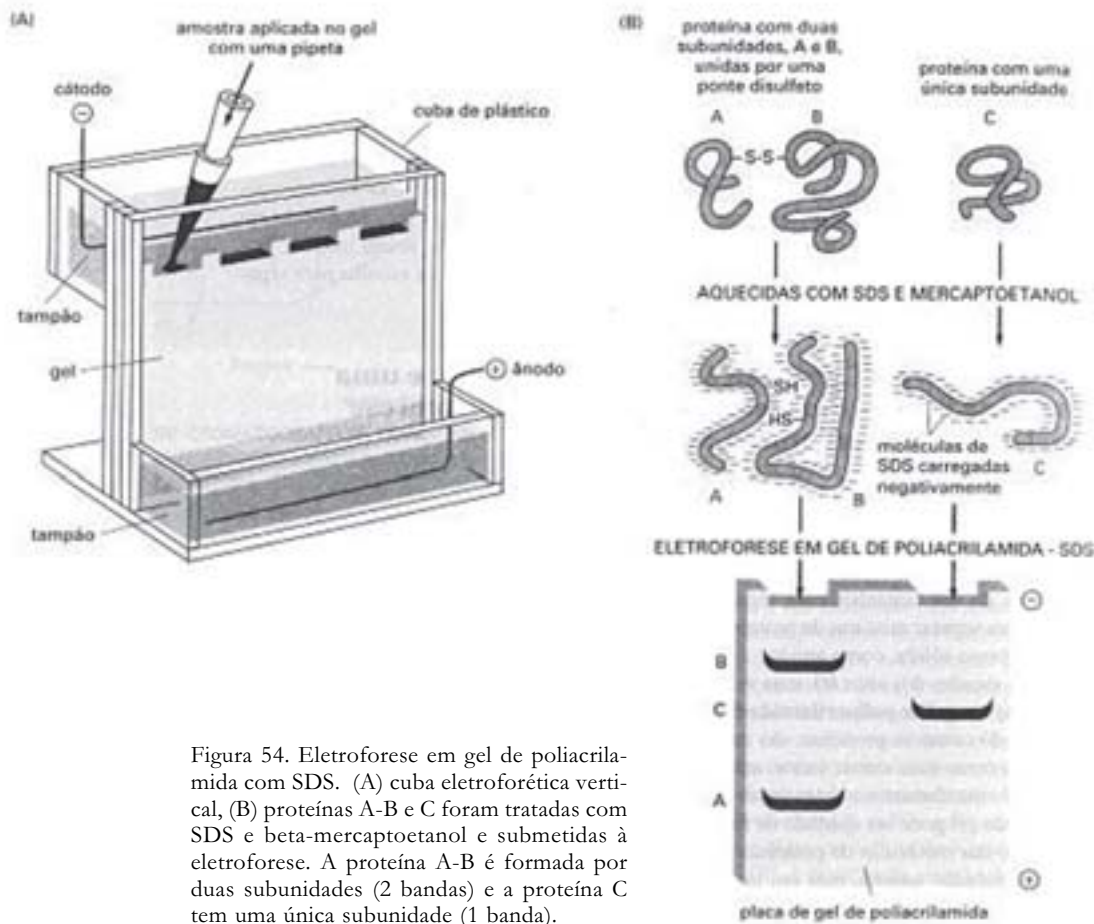


Figura 54. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. (A) cuba eletroforética vertical, (B) proteínas A-B e C foram tratadas com SDS e beta-mercaptoetanol e submetidas à eletroforese. A proteína A-B é formada por duas subunidades (2 bandas) e a proteína C tem uma única subunidade (1 banda).

## FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA OU ELETROFOCALIZAÇÃO

A Focalização Isoelétrica ou Eletrofocalização é uma técnica eletroforética usada para determinar o ponto isoelétrico (pI) de uma proteína. Ao longo do gel é estabelecido um gradiente de pH através da distribuição de uma mistura de ácidos e bases orgânicos mediante o campo elétrico. Quando uma mistura protéica é aplicada no gel, cada proteína migra para o polo de sinal contrário e ela para de migrar quando fica eletricamente neutra. Isto acontece quando o pI da proteína é igual ao pH do gel. Para saber o pI da proteína, é só verificar o pH em que ela estacionou. A Fig. 55 mostra uma proteína submetida a uma eletrofocalização para determinação do seu ponto isoelétrico.

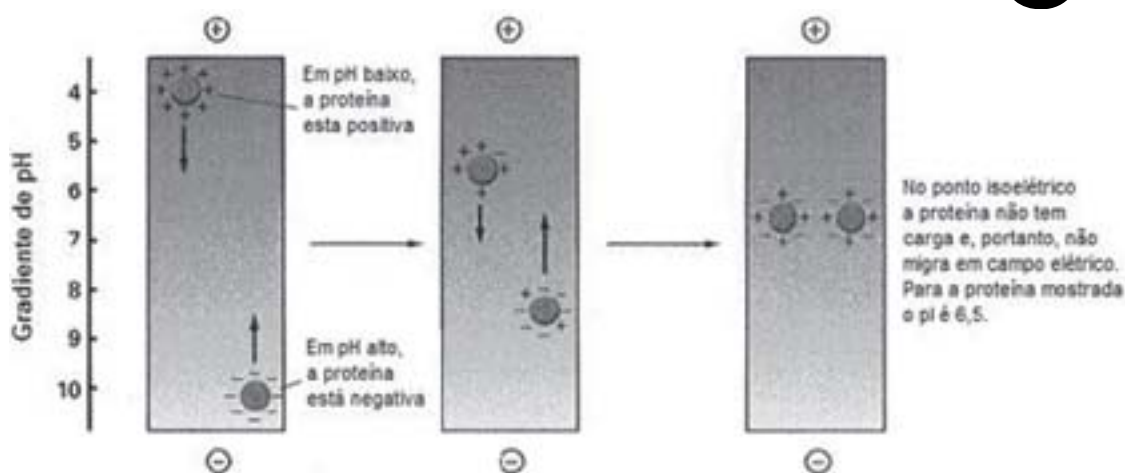


Figura 55. Focalização isoeletrica usada para determinação do pI de uma proteína. Em pH baixo (4,0) a proteína está carregada positivamente e em pH alto (10,0) a proteína está carregada negativamente. Em campo elétrico, estas proteínas migram para o polo de sinal contrário e fica estacionária em pH 6,5. O pI da proteína é 6,5.

## APLICAÇÃO DA ELETROFORESE

### ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SÉRICAS (PROTEINOGRAMA)

A eletroforese é utilizada de rotina no laboratório de análises clínicas para separar e quantificar as proteínas do soro humano. Quando o soro humano é submetido a uma eletroforese em suporte sólido usando um sistema horizontal é possível visualizar 5 classes de proteínas. São elas: albumina, alfa 1-globulina ( $\alpha_1$ ), alfa 2-globulina ( $\alpha_2$ ), beta-globulina ( $\beta$ ) e gama-globulina ( $\gamma$ ). O soro humano é o sobrenadante (fase líquida) obtido após a centrifugação do sangue coletado sem o uso de anticoagulante. A eletroforese de proteína também pode ser feita usando o plasma humano. O plasma é o sobrenadante (fase líquida) obtido após a centrifugação do sangue coletado com anticoagulante. A eletroforese de plasma revela a presença de 6 frações, incluindo agora o fibrinogênio. As proteínas presentes no plasma são: albumina, alfa 1-globulina, alfa 2-globulina, beta-globulina, fibrinogênio e gama-globulina.

As proteínas séricas apresentam uma faixa de pI entre 4,7 e 8,3. Desta forma, é utilizado na corrida eletroforética um tampão de pH acima de 8,3 para que todas as proteínas fiquem carregadas negativamente. A aplicação é, então, no polo negativo. A albumina apresenta o pI menor igual a 4,7. Então, a albumina irá migrar mais rápido em campo elétrico. A



gama-globulina apresenta o pI mais alto igual a 8,3 e irá migrar menos. A Fig. 56 mostra um perfil eletroforético das proteínas séricas. A aplicação do soro foi feita no polo negativo (seta), uma vez que, as proteínas estão negativas em pH acima de 8,3. O gráfico, acima das bandas separadas, representa a leitura da absorção de luz feita pelo densitômetro. Este aparelho fornece o valor relativo (%) de cada proteína. Sabendo-se a concentração de proteínas totais (PT) no sangue do paciente é possível, através de uma regra de três simples, determinar a concentração (g/dL) de cada proteína. Observe, na Fig. 56, que a concentração de proteína total foi de 7,0 g/dL, o que corresponde a 100 %. Sabendo-se esta relação, calcula-se a concentração de cada fração. Podemos observar que a proteína mais concentrada no soro normal é a albumina (3,99 g/dL) e a menos concentrada é a  $\alpha_1$ -globulina (0,36 g/dL). Algumas condições patológicas alteram a concentração destas proteínas e, por isso, este exame é solicitado para auxiliar no diagnóstico de algumas patologias.

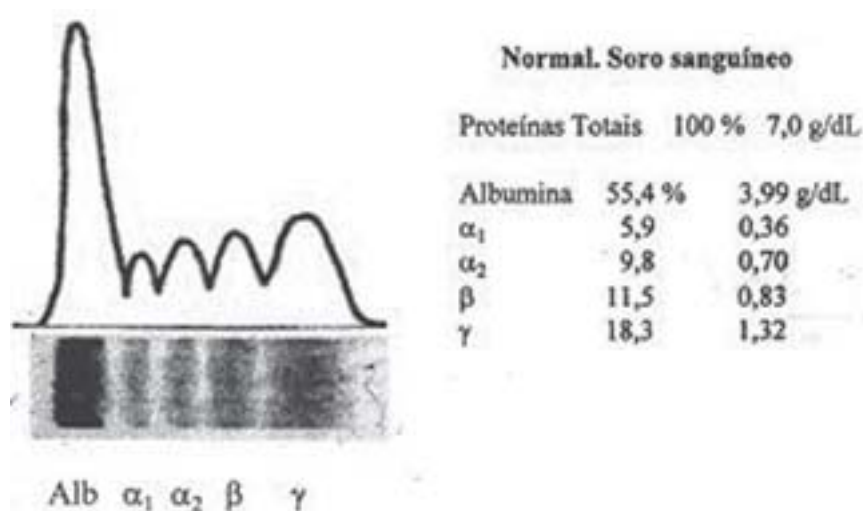


Figura 56. Perfil eletroforético de soro sanguíneo normal. Os valores relativos (%) e absolutos (g/dL) das proteínas séricas podem ser vistos. A seta indica o ponto de aplicação (Heneine, 1995, p.97).

## CONCLUSÃO

A eletroforese foi inventada por Arne Tiselius, em 1937 com o objetivo de separar partículas orgânicas. No mesmo ano, Paulo Koenig no Brasil introduziu a eletroforese com suporte e que até hoje é largamente usada. A eletroforese consiste em um método laboratorial com o objetivo de separar frações de proteínas, enzimas, lipídios, hemoglobina, DNA e RNA. A técnica é fundamentada na separação de partículas que apresentam cargas elétricas em um determinado pH. Para isso, é usada uma cuba



eletroforética com duas câmaras preenchidas com solução tampão e onde estão o eletrodo positivo e o negativo. Entre as câmaras ajusta-se o suporte sólido ou semi-sólido. As amostras a serem analisadas são aplicadas no suporte escolhido. Terminada a corrida eletroforética, o suporte deve ser corado com corantes específicos de acordo com a amostra. Por último elas são quantificadas usando a técnica manual de eluição ou por método automatizado usando a densitometria. A eletroforese constitui hoje uma técnica de uso na rotina laboratorial de fundamental importância no diagnóstico de algumas doenças, tais como hemoglobinopatias, talassemias, mieloma múltiplo, além de aplicação em lipidogramas, biologia molecular e enzimopatias.

### RESUMO

A eletroforese é uma técnica que emprega o campo elétrico na separação de componentes eletricamente carregados. Em campo elétrico, as partículas migram para o eletrodo de sinal contrário e quanto maior a densidade de cargas da partícula e quanto maior a diferença de potencial elétrico aplicado entre os dois eletrodos (cátodo e ânodo) maior será a mobilidade eletroforética. Por outro lado, quanto maior a massa relativa da partícula menor a velocidade de migração. Existem 2 tipos de eletroforese: sem suporte e com suporte. A eletroforese sem suporte está em desuso. Os suportes usados podem ser sólidos ou semi-sólidos e a corrida eletroforética pode ser feita na horizontal ou vertical. A eletroforese em sistema horizontal separa as partículas de acordo com a carga elétrica. Já a eletroforese com suporte sólido na vertical, separa tanto pela carga elétrica quanto pela massa relativa sendo, portanto, mais eficiente no número de frações obtidas. A eletroforese em gel com SDS separa as proteínas apenas pela massa relativa e, por isto, esta técnica é usada para determinar a massa relativa das substâncias. O uso de beta-mercaptoetanol permite identificar se uma determinada proteína apresenta ou não mais de uma subunidade. A focalização isoelétrica é um tipo de eletroforese que utiliza um gel com um gradiente de pH que permite conhecer o ponto isoelétrico de uma proteína.

### PRÓXIMA AULA

Na próxima aula iniciaremos um estudo sobre a biofísica das radiações ionizantes. Neste capítulo iremos conhecer as propriedades físicas de algumas radiações ionizantes.



## REFERÊNCIAS

- HENEINE, I. F. **Biofísica Básica**. Ed. Atheneu, 2006.
- HENEINE, I. F. **Eletroforese em Medicina**. Um texto para a prática médica. Da metodologia ao resultado. Ed. Lemi S.A. 1995.
- NAOUM, P. C. **Eletroforese, técnicas e interpretação**. 2. ed. v. 1, São Paulo: Editora Santos, 1999.
- SILVA-JÚNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas**. Guia teórico-prático. Ed. Interciência, 2001.