

UM APARELHO DE BAIXO CUSTO E MÉTODO PARA REALIZAR MICROELETROFORESE*

José Eduardo de OLIVEIRA**
Geraldo S. RODRIGUES***
Carlos Renato CORSO****

RESUMO: Este trabalho apresenta um aparelho de baixo custo e método para realizar microeletroforese. A temperatura, o pH e a força iônica podem ser controlados numa ampla faixa. O aparelho difere dos anteriormente descritos por dois aspectos principais: o uso de uma Câmara de Neubauer dupla espelhada, como câmara de medição e a utilização de pontes salinas de agar, separando os eletrodos da câmara de medição.

UNITERMOS: Microeletroforese; mobilidade eletroforética; eletroforese de células; eletroforese de partículas.

INTRODUÇÃO

As partículas que possuem grupos ionizáveis, apresentam quando em solução aquosa, a tendência de adquirir cargas elétricas superficiais que, podem interagir com outros íons existentes na solução, dando origem à dupla camada elétrica. Aplicando-se um campo elétrico tangencialmente a uma superfície nessas condições, ela tenderá a se mover numa direção preferencial, resultando no fenô-

* Trabalho apresentado na Seção de Biofísica Molecular do X Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica, Cidade Universitária-USP, São Paulo, 1985.

** Departamento de Química Orgânica — Instituto de Química-UNESP — 14800 — Araraquara-SP.

*** Bolsista do CNPq.

**** Departamento de Bioquímica — Instituto de Biociências-UNESP — 13500 — Rio Claro-SP.

meno conhecido como eletroforese de partículas, ou microeletroforese, que permite determinar a mobilidade eletroforética (MEF) da partícula.¹

Como a eletroforese baseia-se na migração de partículas em função de suas cargas superficiais, uma de suas principais aplicações é a investigação de processos biológicos relacionados a mudanças nas características celulares, pois, não exige modificações definitivas nas suas composições ou estruturas. A porção periférica da célula é seu órgão de comunicação com o exterior e, pequenas mudanças em sua estrutura molecular, expressam, na maioria das vezes, diferenciações, transformações, enfim, alterações, que podem mudar a troca de informações entre a célula e o meio ambiente.^{2, 3}

Nos experimentos envolvendo eletroforese de partículas, é necessário que o aparelho e o método utilizados, permitam controlar alguns fatores que influenciam a carga superficial e, portanto, a MEF.

A determinação do ponto isoelétrico depende de medições feitas a diferentes pH mantidos rigorosamente constantes.^{4, 5}

Estudos de floculação e adsorção exigem medições feitas numa ampla faixa de pH e força iônica rigorosamente controlados.⁶

Verificações de efeitos causados por tratamentos específicos ou de diferenças individuais em populações requerem um controle preciso de pH, força iônica e temperatura durante as medições.^{3, 7}

O emprego de soluções orgânicas ou tampões como eletrólitos, têm sido uma prática comum, para evitar que a eletrólise cause tanto o aquecimento excessivo, quanto alterações de pH, durante as medições da MEF, porém, esses solutos tendem a alterar as características das superfícies celulares, influenciando nos resultados.

O presente trabalho apresenta um aparelho de baixo custo e método para determinar a MEF de células suspensas em solução, com controle de temperatura, pH e força iônica, numa ampla faixa. O aparelho em questão, difere de outros já descritos, em dois aspectos principais:

1. O uso de uma Câmara de Neubauer, dupla espelhada, como câmara de medição.
2. A utilização de pontes salinas de agar, separando os eletrodos da câmara de medição.

CONSTRUÇÃO E OPERAÇÃO

A construção do aparelho é muito simples: consistiu na colagem de placas de vidro formando uma canaleta de 20cm de comprimento \times 0,5cm² de seção transversal, contendo uma câmara de Neubauer na parte mediana (câmara de medição). A canaleta foi perfurada nas extremidades para se comunicar com duas cubas de vidro de 50ml com tampas de rosca, onde foram inseridos eletrodos

laminares de negro de platina com 1cm², separados da câmara de medição por pontes salinas de KCl 2,5M em agar 3%, formando as câmaras dos eletrodos. A temperatura foi mantida constante, durante as medições, por meio de uma tubulação que atravessava toda a extensão do aparelho. O pH permaneceu constante, devido ao isolamento entre a câmara de medição e as câmaras de eletrodos, proporcionado pela ponte salina, permitindo a substituição dos tampões convencionais por soluções diluídas de cloreto de sódio. (Figs. 1 e 2).

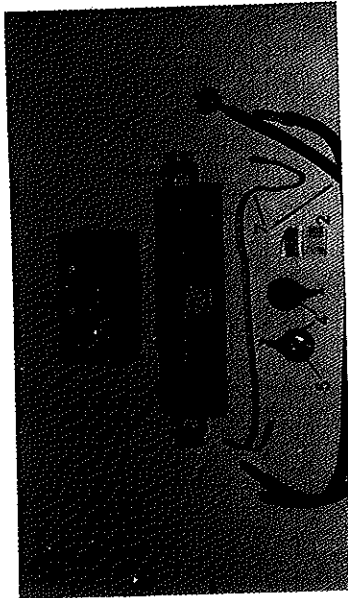


FIG. 1 — *Aparelho desmontado*

1. Canaleta com 20cm de comprimento \times 0,50cm² de seção transversal;
2. Câmara de Neubauer dupla espelhada;
3. Câmara dos eletrodos;
4. Tampa das câmaras dos eletrodos;
5. Eletrodos laminares de platina;
6. Ponte salina de KCl 2,5M em agar 3%;
7. Tubulações para refrigeração;
8. Dispositivo para inversão de corrente.

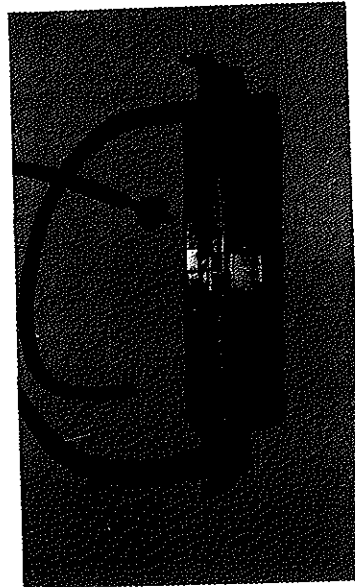


FIG. 2 — *Aparelho montado*

O aparelho foi montado sobre um microscópio marca Carl-Zeiss do Brasil equipado com objetiva 540/0,65 e ocular CPWL 10x/18 (Fig. 3) e ligado a um dispositivo para inversão de corrente fornecida por uma fonte para eletroforese marca Brasilele Eletrônica, Série 183 (Fig. 4).



FIG. 3 — Vista frontal do aparelho montado sobre o microscópio.

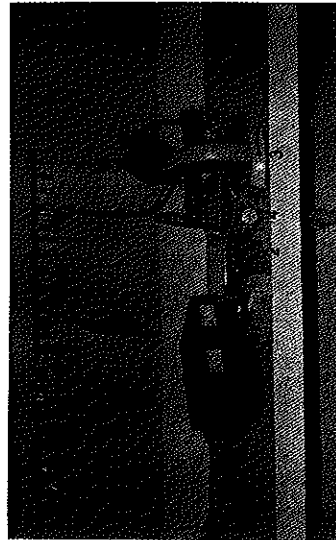


FIG. 4 — *Aparelho em condições de uso*

1. Fonte para eletroforese;
2. Dispositivo para inversão de corrente;
3. Aparelho montado sobre o microscópio;
4. Cronômetro para medição de tempo.

Amostras de suspensão celular foram introduzidas na câmara de medição e, após a aplicação de uma diferença de potencial entre os eletrodos, determinou-se o tempo necessário para as células percorrerem determinadas distâncias, em direções alternadas, usando como referencial, as aferições da Câmara de Neubauer.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E CALIBRAÇÃO DO APARELHO

Uma das exigências nos estudos de propriedades de superfícies celulares é a existência de material limpo e que apresente resultados reprodutíveis. As células devem, portanto, ser lavadas e ter sua integridade mantida, a partir de um procedimento padronizado que se aplica às mais variadas espécies celulares, desde esporos rígidos a eritrócitos.

Para tanto, centrifugamos, ressuspendemos, por duas vezes, as células, utilizando a mesma solução de eletrólito usada nas medições. As células foram armazenadas nessa solução.

O aparelho foi calibrado com eritrócitos humanos, lavados e diluídos na proporção 0,1% v/v de sangue, em cloreto de sódio 0,145M ou tampão fosfato 0,172M, a pH = 7,4. As medições foram realizadas com uma diferença de potencial de 3,13 V/cm.

A MEF das células foi calculada através da seguinte expressão.¹

$$MEF = d/t.V/D, \text{ onde}$$

d (μm) = distância percorrida pela célula durante o tempo t

t (s) = tempo necessário para a célula percorrer a distância d

D (cm) = distância entre os eletrodos

V (volt) = diferença de potencial entre os eletrodos.

Os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas 1 e 2 e estão em boa concordância com os da literatura.

TABELA 1 — MEF de eritrócitos humanos a pH = 7,4 em NaCl 0,145 M e 25°C.

Autor	MEF
Bangham et alii (1958) ^a	1,07
Brody (1954) ^a	1,07
Furchgott & Ponder (1941) ^a	1,10
Este trabalho	1,1 ^b

^a Fonte: Ref. (8)

^b = média de 07 determinações.

TABELA 2 — MEF de eritrócitos humanos a pH = 7,4 em tampão fosfato 0.172 M e 25°C.

Autor	MEF
Bangham et alii (1958) ^a	1,28
Abramson (1929) ^a	1,30
Hartmann et alii (1952) ^a	1,27
Loveday & James (1957) ^a	1,31
Brody (1954) ^a	1,28
Este trabalho	1,3 ^b

^a Fonte: Ref. (8)^b = média de 07 determinações.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa concedida a G.S.R. e ao CPE-UNESP pelo auxílio financeiro do projeto.

OLIVEIRA, J.E. de et alii — A low cost apparatus and method for performing microelectrophoresis. *Ecl. Quim.*, São Paulo, 11/12:83-88, 1986/87.

ABSTRACT: This paper presents a low cost apparatus and method for performing microelectrophoresis, with a broad range of controlled temperature, pH, ionic strength. The apparatus has two main features that distinguish it from others previously reported: the use of a double mirror Neubauer Chamber as the measuring one, and the use of salt bridges, for separating the measuring Chamber from the electrode Chambers.

KEY-WORDS: Microelectrophoresis; electrophoretic mobility; cell electrophoresis; particle electrophoresis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SHAW, J.D. — *Introdução à química dos colóides e de superfícies*. Tradução de J.H. MAAR. Edgard Blucher e EDUSP, São Paulo, 1975.
2. JAMES, A.M. — *Chem. Soc. Reviews*, 8, 389 (1979).
3. HANNIG, K. — *J. Chromatography*, 159, 183 (1978).
4. FUHRMANN, G.F.; BOEHM, C. & THEUVENET, A.P. — *Biochimica et Biophysica Acta*, 433, 583 (1976).
5. SILVA FILHO, F.C.; ELIAS, C.A. & SOUZA, W. — *J. Protozool.*, 29, 551 (1982).
6. HUNTER, K.A. & LISS, P.S. — *Nature*, 282, 823 (1979).
7. PIMENTA, P.F.P. & SOUZA, W. — *Histochemistry*, 74, 569 (1982).
8. BANGHAM, A.D.; HEARD, D.H.; FLEMANS, R. & SEAMAN, G.U.F. — *Nature*, 182, 642 (1958).

Recebido para publicação em 20.10.87.