

B.3.2 Eletroforese

A eletroforese é considerada a principal técnica de separação molecular num laboratório atual de biologia celular. Trata-se de uma poderosa técnica, razoavelmente simples e de baixo custo, pelo que se tornou muito utilizada. A eletroforese aplica-se em bioquímica na separação de compostos com carga elétrica (aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos) que depende do pH do meio em que se encontram. Esta técnica é muito útil na área forense, já que se usa para estabelecer relações de parentesco (teste de paternidade, por exemplo), para encontrar pessoas desaparecidas e para identificar criminosos e suas vítimas através de partículas dos respetivos tecidos ou fluidos (saliva, sangue, cabelo, pele...) em locais de crime.

3.2.1. O princípio da eletroforese

A eletroforese é o movimento de partículas dispersas num fluido sob a influência de um campo elétrico uniforme. Os iões positivos migram para um eléctrodo negativo e os iões negativos migram para um eléctrodo positivo (Fig 13).

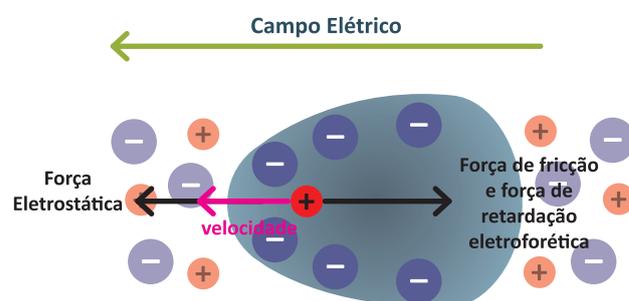


Figura 13 – Esquema de equilíbrio de forças em eletroforese.

As partículas coloidais suspensas têm carga elétrica superficial, fortemente dependente das espécies adsorvidas à sua superfície. Um campo elétrico externo exerce uma força eletrostática sobre estas partículas coloidais. Durante a eletroforese, a força, provocada pelo campo elétrico externo, opõe-se a forças de fricção entre a partícula e o fluido. Quando se igualam, a partícula coloidal que já estava em movimento, continua o movimento com velocidade constante. A velocidade de migração é constante e depende da massa e da carga da partícula, ou seja, de um equilíbrio de forças que também tem em conta o retardamento por fricção entre a amostra e o meio circundante (Fig. 13).

No fim da separação, as proteínas podem ser detetadas como bandas localizadas em diferentes posições do fluido. Este pode ser constituído por diferentes materiais, incluindo papel, acetato de celulose ou géis feitos de poliacrilamida (polímero sintético), agarose (também conhecido por ágar-ágar) ou amido (polímeros naturais). O avanço da frente pode seguir-se por observação com radiações UV, assim como a revelação do **eletroforama**. A figura 14 ilustra alguns aspetos técnicos da eletroforese.

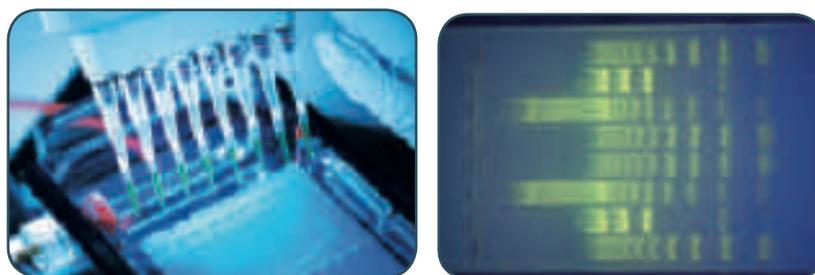


Figura 14 – Colocação de amostras de ADN em gel de agarose com uma pipeta multicanal (A); eletroforama revelado por radiações UV (B).

3.2.2 O ADN e a identificação genética

As técnicas da engenharia genética permitem identificar pessoas pela análise das suas moléculas de ADN (ácido desoxirribonucleico, DNA em inglês), a substância que constitui os genes. Com exceção dos gémeos verdadeiros, cada pessoa possui um conjunto de genes e, portanto, de moléculas de ADN, único.

O processo mais simples para caracterizar o ADN consiste em cortar as suas moléculas utilizando as chamadas enzimas de restrição e analisando, em seguida, o tamanho dos fragmentos que se formaram. Uma enzima de restrição corta a molécula de ADN em pontos específicos, somente onde ocorre determinada sequência de bases nitrogenadas. Como cada pessoa tem sequências típicas de bases nitrogenadas, o número e o tamanho dos fragmentos obtidos pelo corte enzimático permitem caracterizar o seu ADN.

O tamanho dos fragmentos obtidos, após o corte enzimático, é determinado pela técnica de eletroforese. A mistura de fragmentos de ADN é aplicada numa camada de gel e submetida a um campo elétrico. Nessas condições, os fragmentos movem-se com velocidades proporcionais ao seu tamanho, os menores mais rapidamente que os maiores. Quando se desliga o campo elétrico, fragmentos com tamanhos iguais ficam na mesma posição do gel, formando uma faixa. O padrão de faixas que se obtém é característico para cada pessoa, correspondendo à sua «impressão digital» genética. Trata-se de um eletroforama.

As relações de parentesco podem ser determinadas por técnicas de eletroforese. A figura 15 mostra as partes mais importantes para identificar ADN, obtidas por eletroforese de ADN de uma família: mãe, pai e quatro filhos A, B, C e D.

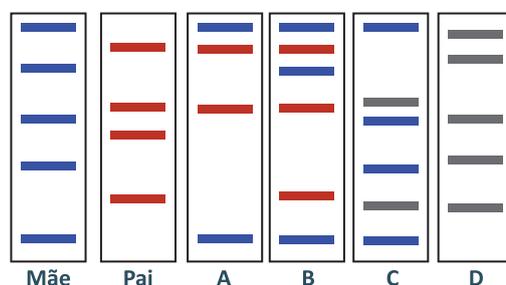


Figura 15 – Eletroforamas de mãe, pai e quatro filhos.

Algumas bandas maternas (azuis) e paternas (vermelhas) surgem no eletroforama dos filhos A e B. Já C tem bandas azuis da mãe e não tem bandas vermelhas do pai; o seu ADN paterno não é do pai de A e de B, mas é de outro indivíduo. O filho D poderia ser adotivo, já que tanto o seu ADN materno quanto o paterno são de outras pessoas diferentes de mãe e pai identificados nos eletroforamas (Fig. 15).

Atividade



Consultar os sítios da Internet para ver a realização de uma eletroforese de gel.

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>

<http://www.dnalc.org/resources/animations/gelectrophoresis.html>

B.3.3 Separação e identificação de componentes de uma mistura

A cromatografia em papel é a técnica de cromatografia mais básica. Para se obter os melhores resultados é necessário ter em conta determinados procedimentos que se descrevem a seguir, detalhadamente.

1. O papel a usar deve ser poroso. Existe papel próprio para cromatografia, mas pode usar-se papel de filtro. O papel não deve ser vincado. Dever ser cortado (e não rasgado!) em tiras ou retângulos. Depois, a cerca de 1 cm da extremidade inferior do papel, deve marcar-se levemente com um lápis a **linha de base** (Fig. 16).

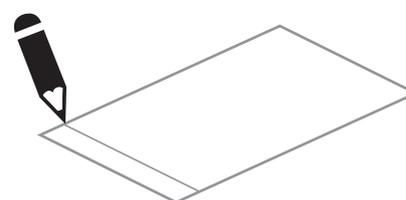


Figura 16 – Marcação da linha de base.

2. As amostras em estudo devem ser aplicadas sobre a linha de base. Se a amostra for sólida, deve ser previamente dissolvida, de modo a obter uma solução muito concentrada.

Aplica-se uma pequena gota de amostra com um tubo capilar (tubo de vidro muito fino). Não havendo tubo capilar pode usar-se um palito, ou uma palhinha (oca) muito fina. Deixa-se secar a gota e repete-se a aplicação até obter uma mancha forte. As manchas devem ficar com distância igual entre si e das extremidades da linha de base

3. A água, o álcool etílico e a acetona são muito usados como eluentes, pois têm afinidade para espécies químicas hidrofílicas. Existem muitos outros eluentes, por exemplo para separar espécies hidrofóbicas, como o hexano. As misturas de líquidos permitem ajustar a afinidade do eluente para determinadas espécies químicas.

4. O eluente é colocado no fundo da **câmara cromatográfica**, isto é, no recipiente onde se vai desenvolver a cromatografia. Depois, coloca-se o papel, de modo que a linha de base não fique mergulhada no eluente. A câmara cromatográfica deve ser sempre tapada, para que a cromatografia decorra num ambiente saturado pelo vapor de eluente, que se vai evaporando (Fig. 17).

O eluente começa então a subir no papel, arrastando com ele parte dos componentes da amostra que foi colocada na linha de base. Quando a **frente do solvente** alcança a extremidade superior do papel, retira-se o **cromatograma** (resultado final da cromatografia), marca-se com um lápis a frente de solvente e seca-se.

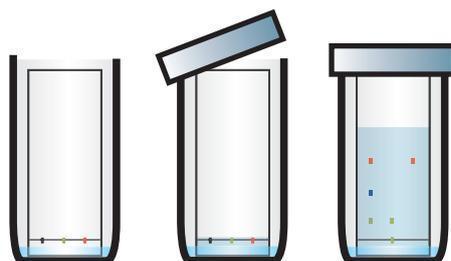


Figura 17 – Evolução da cromatografia: eluição.

Atividade Laboratorial

Separação e identificação de pigmentos em tintas

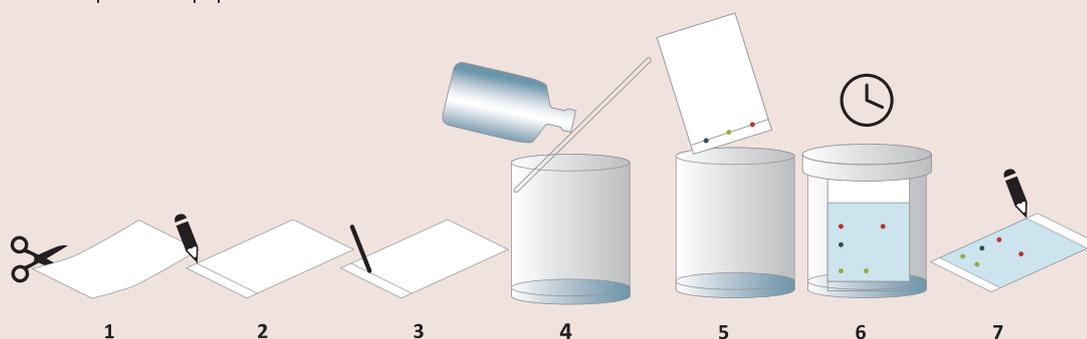


Objetivo: Separar componentes de várias tintas pretas por cromatografia; comparar os cromatogramas obtidos para verificar se as tintas têm a mesma composição.

Material	Consumíveis
- Câmara cromatográfica com tampa ou copo de precipitação e vidro de relógio - Lápis - Papel para cromatografia ou papel de filtro - Tesoura	- Canetas de tinta preta diferentes - Eluente (água e etanol 4:1) - Papel absorvente

Procedimento

1. Corta o papel para obteres um retângulo que caiba na câmara cromatográfica.
2. Traça a lápis a linha de base a 1,5 cm da extremidade do papel.
3. Utiliza três canetas de tinta preta diferentes para aplicar pequenos pontos de tinta na linha de base. Identifica-os a lápis com as letras A, B e C.
4. Coloca o eluente na câmara cromatográfica até cerca de 1 cm de altura.
5. Coloca o papel dentro da câmara de modo que a linha de base não mergulhe no eluente.
6. Deixa subir a frente de solvente até que ocorra separação dos componentes da tinta (no mínimo durante 20 minutos ou até que a frente do solvente fique a 1 cm da parte superior do papel).
7. Retira o cromatograma da câmara, marca a posição da frente de solvente com o lápis e seca o cromatograma com um pouco de papel absorvente.

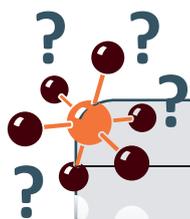


Interpretação

1. Compara o tamanho, a cor, a forma e a posição de cada uma das manchas.
2. Contorna cada mancha com o lápis e marca o seu centro.
3. Calcula o fator de retenção, R_f , de cada uma das manchas.

Discussão

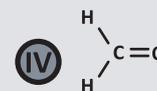
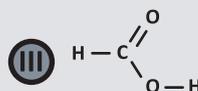
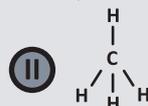
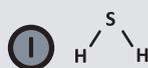
1. Pode afirmar-se que a tinta de diferentes canetas tem a mesma composição qualitativa?
2. Pode tirar-se alguma conclusão relativamente à composição quantitativa das tintas?
3. Compara os resultados do teu grupo com os resultados de outros grupos, para responderes às seguintes perguntas:
 - A mesma caneta deu origem a cromatogramas idênticos?
 - Os fatores de retenção dos componentes são idênticos?



Mais Questões*



1. Considera as seguintes fórmulas de compostos:



- a) Indica, justificando, em qual ou quais dos compostos haverá ligações por pontes de hidrogénio.
b) Indica em qual ou quais dos compostos predominarão ligações do tipo dipolo permanente-dipolo permanente.

2. Selecciona a alternativa que te permite completar corretamente a frase: *À temperatura de 25°C e à pressão de 1 atm, a substância H₂S é gasosa, enquanto a substância H₂O pode existir no estado líquido, porque...*

- (A) ...a massa molar de H₂O é inferior à massa molar de H₂S.
(B) ...o ângulo de ligação em H₂O é superior ao ângulo de ligação em H₂S.
(C) ...as forças intermoleculares em H₂O são mais intensas do que em H₂S.
(D) ...as moléculas de H₂S são maiores que as moléculas de H₂O.

Exame nacional, Portugal - Adaptado

3. Considera as fórmulas seguintes: I - CH₃COOH II - Na₂SO₄ III - CH₄ IV - Br₂ V - I₂

- a) Indica um composto que estabelece ligações de hidrogénio com a água.
b) Indica um composto iónico que se dissolve em água formando ligação ião-dipolo.
c) Indica uma substância que seja sólida, à temperatura ambiente, devido a forças de dispersão de London.

4. Considera os compostos etano, propano e propanol. Indica, justificando, qual deles terá maior ponto de ebulição.

5. A propanona, o etanol e o buteno são compostos com massas moleculares semelhantes, e cujos pontos de ebulição, à pressão normal, são, respectivamente, 56 °C, 78 °C e 0 °C. Justifica esta diferença em função da estrutura destes compostos.

Exame nacional, Portugal - Adaptado

6. Considera as substâncias cujas fórmulas moleculares são H₂, I₂ e HI.

- a) Em quais destas substâncias as ligações intermoleculares apenas se devem a forças de dispersão de London?
b) Qual destas substâncias será mais solúvel em água?

7. Considera a informação da tabela seguinte:

Substância	Fórmula molecular	Ponto de fusão a 1 atm / °C	Ponto de ebulição a 1 atm / °C
Iodo	I ₂	114	184
Cloro	Cl ₂	- 102	- 35
Bromo	Br ₂	-7,3	59

- a) Indica os estados físicos das substâncias elementares cloro, bromo e iodo, à temperatura de 25 °C e a 1 atm.
b) As ligações intermoleculares nas três substâncias são do tipo ...
(A) ... dipolo permanente - dipolo induzido. (B) ... forças de dispersão de London.
(C) ... pontes de hidrogénio. (D) ... dipolo permanente - dipolo permanente.
c) Ordena as substâncias cloro, bromo e iodo por ordem crescente de intensidade das respetivas interações intermoleculares.

8. Considera os alcanos de cadeia não ramificada, de fórmulas moleculares: I - C₄H₁₀ II - C₅H₁₂ III - C₆H₁₄
Faz a correspondência com os seguintes valores de pontos de ebulição: + 36 °C ; + 81 °C ; - 0,5 °C

9. Explica com base em ligações intermoleculares a elevada solubilidade do iodo em tetracloreto de carbono e a sua pequena solubilidade em água.

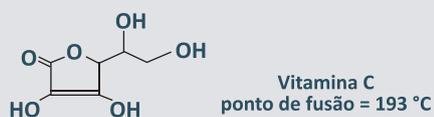
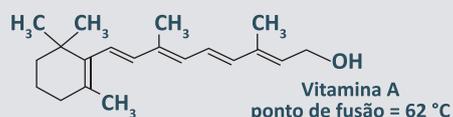
10. O metanol, CH₃OH, é um líquido muito solúvel em água. Justifica esta afirmação.

11. Considera as substâncias representadas pelas fórmulas seguintes: I - CH₃-CH₃ II - CH₃-CH₂-OH III - CH₃-O-CH₃

As forças intermoleculares predominantes em cada uma dessas substâncias são, respetivamente ...

- (A) ... ligações de hidrogénio; de London; dipolo-dipolo. (B) ... de London; dipolo-dipolo; ligação de hidrogénio.
(C) ... de London; ligação de hidrogénio; dipolo-dipolo. (D) ... dipolo-dipolo; ligação de hidrogénio; de London.

12. Uma das propriedades que determina a maior ou menor concentração de uma vitamina na urina é a sua solubilidade em água.



- a) Qual das vitaminas representadas é mais facilmente eliminada na urina? Justifica.
b) O ponto de fusão da vitamina C é superior ao da vitamina A. Indica uma justificação para este facto.

Fuvest-SP, Brasil - Adaptado

13. Considera as interações entre moléculas representadas:

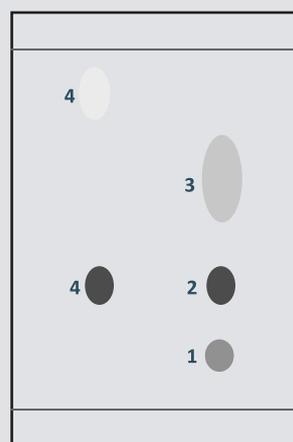
I - CCl₄ I₂ II - HBr HI III - CH₃OH H₂O

As forças intermoleculares predominantes em cada caso são, respectivamente ...

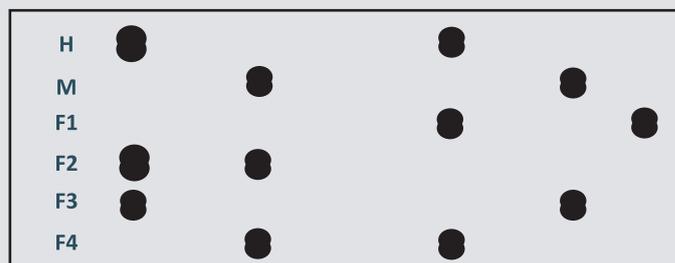
- (A) ... dipolo induzido, dipolos permanentes, pontes de hidrogénio.
(B) ... dipolo induzido, pontes de hidrogénio, dipolos permanentes.
(C) ... pontes de hidrogénio, dipolos induzidos, dipolos permanentes.
(D) ... pontes de hidrogénio, dipolos permanentes, dipolo induzido.

14. A figura mostra o resultado de uma cromatografia em camada fina (TLC), de aminoácidos. Usou-se uma fina camada de alumina colocada sobre uma placa de vidro e, como eluente, uma mistura de butanol, amoníaco e água nas proporções 9:2:3.

- a) Quantas amostras foram originalmente usadas nesta cromatografia? Quantos aminoácidos foram detetados?
b) As diferentes amostras poderão ter algum aminoácido em comum? Justifica.
c) Que volumes de butanol, amoníaco e água se devem misturar para preparar 200 mL de eluente para realizar esta cromatografia?
d) Calcula o fator de retenção, R_f, para cada um dos componentes identificados.



15. Um homem (H) recusa a paternidade de quatro filhos (F1, F2, F3 e F4) de uma mulher (M). Para resolver o caso, foram solicitados exames de ADN e o resultado está representado na figura ao lado.



- a) Como se chama a técnica analítica que está na base destes testes?
b) Qual das amostras tem o fragmento molecular que percorreu maior distância?
c) Que conclusão se pode tirar quanto à paternidade e maternidade dos quatro filhos?

***Nota: Nas questões de escolha múltipla, deves selecionar a opção correta, exceto se te for pedido outro tipo de resposta.**