

PRÁTICA DE ELETROFORESE COM MATERIAIS ALTERNATIVOS NA POSIÇÃO VERTICAL

Kellyane Macêdo Martins¹; Marcelo Campelo Dantas².

¹*Faculdade de Educação de Crateús/Universidade Estadual do Ceará. kelly.ane.m@hotmail.com*

²*Universidade Estadual do Ceará. campelodantas@hotmail.com*

Práticas experimentais alternativas de fácil acesso são empregadas cada vez mais nas escolas e universidades que não dispõem de recursos financeiros adequados. Uma prática que faz parte do cotidiano dos alunos é a eletroforese, por ser divulgada em programas de televisão de investigação criminal, bem como nos testes de paternidade. Desta forma, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma técnica de eletroforese vertical caseira de baixo custo. A preparação do equipamento constou do uso de materiais simples, como recipientes plásticos, gel de amido de milho ou gelatina, ácido desoxirribonucleico (DNA), como material biológico, e de uma pequena fonte de energia. Conseguiram-se resultados significativos quando comparados a outros que transcorriam na posição horizontal. Destacam-se como pontos positivos a boa visualização da corrida do material e menor interferência da solução tampão junto à amostra. Alguns outros testes deverão ser implementados para configurar a prática em todo o cenário brasileiro.

Palavras-Chave: Práticas experimentais; gel de amido de milho; baixo custo.

Introdução

A eletroforese segundo Oliveira *et al.* (2015, p.1130) é uma técnica laboratorial que faz uso da corrente elétrica para promover a separação de moléculas orgânicas como ácidos desoxirribonucleicos (DNA) e proteínas. O princípio para separação de DNA se baseia na carga negativa global de uma das fitas, que em solução, podem ser separadas aplicando-se certa voltagem. Ao final do processo as cadeias de DNA estarão próximas ao catodo (positivo), que atrai, devido à polaridade, moléculas de carga negativa.

A técnica é utilizada para diversos fins, como, na área de fiscalização de alimentos de origem animal, na realização de exames de diagnósticos de doenças na medicina, na realização do teste de paternidade, em crimes em que podem ser encontrados fragmentos de DNA extraídos de cabelo, sangue, saliva e outros materiais biológicos para identificação do criminoso, dentre outros (EMBRAPA,2001). Como mencionaram Martinez e Paiva (2008) a realização da prática se tornava inviável para professores de ensino médio desprovidos de recursos laboratoriais e/ou até mesmo para professores do ensino superior. Atualmente o custo dos equipamentos necessários para a realização do experimento varia de três a cinco mil reais. Desta maneira, conseguiram formalizar uma prática caseira de baixo custo onde a eletroforese transcorria na horizontal, com uso de materiais alternativos como uma cuba de plástico e gel de amido de milho.

Na educação é sempre necessária a criação de novas metodologias para inovar e melhorar o processo de ensino-aprendizagem. Neste intuito O trabalho foi modulado de acordo com o trabalho de Martinez e Paiva (2008), em que realizaram uma proposta prática relacionada à técnica de eletroforese caseira de baixo custo.

A atividade experimental tem caráter investigativo, na qual cada passo deve ser observado com características diferentes, sendo estas tratadas de forma lógica, levando o aluno a refletir e a discutir os parâmetros do experimento. Pode-se ainda modificá-lo e, se necessário, interligá-los ao experimento como um todo, sempre inter-relacionando a algum fato do seu cotidiano. Isso é o método científico, não apenas uma “receita de bolo” em que você adiciona os ingredientes sem maior reflexão, mas uma discussão proativa da função de cada produto adicionado (BRASIL, 1999).

Para Russel (1994) a teoria com a prática deixa a aprendizagem mais sólida. A ideia central, então, deve ser não apenas a de repassar às pessoas habilidades práticas, mas especialmente em treiná-las a perceber o valor do conhecimento por meio prático. Há muito é discutida no meio acadêmico pedagógico a utilização da arma experimental como ferramenta de preparo intelectual do aluno. Este instrumento irá inspirar uma devoção legítima de seu espírito à prática investigativa científica.

Por se tratar de um experimento não acessível às escolas de nível médio no Brasil, e na maior parte dos outros países, devido ao custo dos materiais utilizados e do próprio equipamento, os alunos só adquirem um conhecimento teórico, por vezes sendo muito superficial. Desta forma, o trabalho teve como objetivo principal criar um método de eletroforese caseira vertical de baixo custo para execução de aulas práticas, em que o aluno consiga interagir com o experimento sendo capaz de executar a própria fabricação do equipamento e assim, adquira senso crítico aprimorado.

Metodologia

Montagem da cuba eletroforética

Na montagem da cuba eletroforética foi utilizado um recipiente plástico de vasilhame de enxaguante bucal pequeno retangular (8,0 cm de altura, 5,0 cm de comprimento e 2,0 cm de espessura) sendo retirada a parte superior (gargalo). Foram colocados dois pregos inox pequenos de 2,5 cm, ligados aos fios de cobre de uma fonte de energia (impressoras, notebooks, telefones, dentre outras). O primeiro ficou preso, com resina epóxi, no fundo da vasilha e, o segundo, na parte superior, exercendo papéis de cátodo e ânodo, respectivamente (Fig.1). Para o recipiente plástico do gel de corrida foi usado um frasco de pastilhas (4,5 cm de altura, 2,5 cm de comprimento e 1,2 cm de largura). A tampa foi retirada e foram feitos três orifícios no fundo (Fig. 2), para que o gel tivesse contato com a solução tampão e a corrente elétrica.

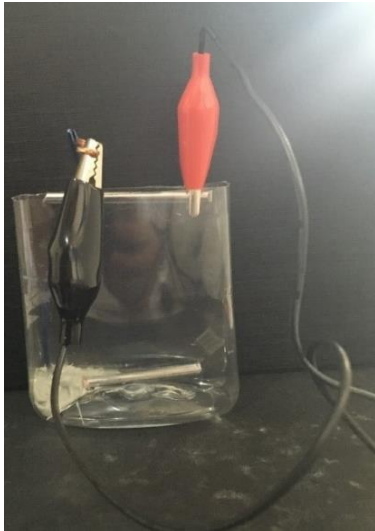


Figura 1 - Preparação da cuba maior com eletrodos ligados ao aço inoxidável.



Figura 2 - Orifícios da cuba menor, para que o gel entre em contato com a solução tampão.

Preparação do gel de suporte

Em um béquer foi dissolvido 3 g do pó de gelatina incolor de 24 g (encontrada em supermercados). Foi adicionada uma alíquota de 9 mL da solução tampão (preparada com a dissolução de 3,8 gramas de Borato de sódio em 1000 mL de água). Em seguida o béquer foi levado a aquecimento, com o uso de lamparina a álcool (mas podendo ser usados, por exemplo, fogão, chapa aquecedora ou qualquer outra fonte de calor) e agitação em movimentos circulares usando colher, até começar a borbulhar indicando que a mistura está homogênea. Logo, retira-se do aquecimento e adiciona-se 15 ml de solução tampão à gelatina com agitação até ficar uniforme novamente. Esperou-se esfriar cerca de 10 minutos para ser despejada na cuba menor. Foi realizado o procedimento de se colocar uma fita fixadora (gomada) embaixo do recipiente, vedando os orifícios para que o gel não saia enquanto não solidificado por completo. Nesse momento em que foi despejada a gelatina no recipiente, colocou-se uma peça de plástico (recortada de um mesmo recipiente plástico) encostada na parede, para criar um espaço para passagem da solução tampão por toda a cuba menor. Em seguida, foi posta no congelador para mais rápida solidificação (cerca de 30 min.). Para a preparação dos poços foram colocados dois palitos de madeira com uma circunferência de 6,28 mm (Ex: palito de churrasco) que foram suspensos por um suporte de canudos plásticos sobrepostos à uma base de sustentação que é a cuba menor obtendo a função de pente.

Preparação da fonte de energia

Foi utilizada uma fonte de telefone celular (Fig.3) com retirada do *plug* de conexão para separação dos fios com uso de estilete. Foram em seguida desencapados, cerca de 2,0 cm, para que os fios de cobre ficassem à mostra. A cada fio foi acoplado um “bico de jacaré”, utilizados como cátodo e ânodo. Verificou-se que a tensão da corrente era de 14V.



Figura 3 - Fonte de energia, reutilizada de um telefone fixo

Procedimento da corrida do DNA

Como material biológico foi utilizado cebola (*Allium cepa*) para extração. Foram utilizados filamentos de DNA também extraídos com materiais alternativos como demonstrado por Loreto e Sepel (2003); Galhardo (2009). O tampão foi despejado na cuba maior até cobrir com uma fina lâmina o gel com os poços e o prego inoxidável da parte superior. Uma pequena alíquota (cerca de 1,0 ml) do DNA dissolvido foi aquecida a 100°C em 3,0 ml de solução tampão Borato de Sódio por um minuto. Após resfriamento da amostra foi adicionado açúcar, para facilitar a precipitação do DNA no gel e evitar a suspensão do material genético, e ainda corante alimentício rosa (uma gota), para visualização do material na corrida.

Resultados e discussão

Após muitas aulas práticas seguindo o método de Martinez e Paiva (2008) de eletroforese caseira, verificou-se que haviam algumas dificuldades relacionadas à execução da prática, tais como oxidação dos pregos que transmitiam a corrente elétrica à solução tampão; a não visualização das bandas após horas de corrida, o material genético ficando apenas como uma mancha escura sobre o gel de amido; a dissolução do colóide pela corrente elétrica com deposição de massa por sobre o teste, dentre outras características negativas. Todos os procedimentos metodológicos foram seguidos tal qual exige o artigo base. De certo que em algumas práticas houve êxito, contudo, sempre com algum empecilho no desenvolvimento.

Seguindo o pensamento de Pozo e Crespo (2009) em que, os alunos não conseguem, por exemplo, adquirir habilidades pertinentes na interpretação de dados para elaboração de um simples gráfico, ou então observar uma reação química sem interpretar o que intrinsecamente ocorre e, portanto, não conseguem explicá-las nem aplicá-las em novas situações. Esse é um déficit muito comum.

Tal qual lembra Carretero (1993), além dessa falta de interesse que permeia a maior parte dos alunos, estes assumem atitudes impróprias com respeito ao método científico, assumindo posições passivas, esperando respostas em vez de dá-las. Não são capazes de fazer eles mesmos as perguntas, considerando os experimentos como meras demonstrações e a ciência como um conhecimento neutro, desligado de suas repercussões sociais.

Experimentos em que o próprio aluno pode interagir, participando de todos os passos, incluindo a montagem do próprio equipamento prático, faz com que se sinta apropriado de todo o contexto e conteúdo estudado. Os testes do experimento proposto, realizados nos laboratórios de química e biologia da Faculdade de Educação de Crateús (FAEC), abrangeram alunos do Curso de Licenciaturas Plenas em Ciências Biológicas e Química da disciplina de Biologia Molecular. Pôde-se observar que conseguiram entender e demonstrar a assimilação de conteúdo em seus relatórios, bem como em participação em sala de aula junto ao professor ministrante.

As moléculas de DNA têm carga negativa devido aos grupos fosfato em seus esqueletos de açúcar-fosfato, assim elas começam a se mover através da matriz de gel, para o polo positivo. Quando a energia é ligada e a corrente passa através do gel, diz-se que o material está correndo(NAOUM,2012). Vale salientar que em alguns experimentos foram utilizadas, como material genético, as proteínas, extraídas da levedura de cerveja, com êxito.

Primeiramente foi pensado do porquê de não se fazer uma eletroforese na posição vertical, pois em toda a literatura só havia exemplos de experimentos caseiros na horizontal (MARTINEZ; PAIVA, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Alertou-se para o fato da gravidade ser uma aliada para a migração mais rápida do DNA através do gel.

Para que a migração não se efetivasse por falta de carga suficiente advinda da pequena fonte elétrica, então se optou por fazer o experimento em recipientes menores onde se teria certeza que a carga, mesmo pequena, teria contato direto com toda a solução tampão e também com gel onde estavam as amostras. Lembrando que para alguns testes foram utilizados cubas maiores, esses que não se obteve êxito, pois as cargas dispostas não foram suficiente para que a corrida fosse realizada, e o uso de cargas maiores desencadeia a dissolução do gel.

Também foi usado o gel de amido de milho como indicado por Martinez e Paiva (2008), sendo evidente que ambos os géis de amido de milho e de gelatina incolor foram resistentes o suficiente, em todos os testes, não ocorrendo dissolução por conta da corrente elétrica nos polos superior e inferior.

Após essa verificação era importante saber se a gravidade, por si só, iria influenciar na descida da amostra após introdução nos poços. Como constatado, após testes de mais de três horas, não houve deslocamento para parte inferior do gel em nenhum instante. Todas as características iniciais foram mantidas, só havendo deslocamento após a fonte ser ligada.

Foi verificado também para que o ácido nucleico migrasse, este deveria passar por um processo de degradação molecular. Foi escolhido o aquecimento a partir de 100°C. O procedimento de usar bases ou ácidos fortes, para fazer essa ruptura da molécula, não foi eficaz, pois havia perda de amostra em contato com a solução tampão que possui pH 8,1 de acordo com verificação em pHmetro, ocorrendo a neutralização. Ao mesmo tempo em que, se por algum motivo, a neutralização não ocorresse a contento, a acidez ou alcalinidade poderiam degradar o gel facilmente. Como constatado nos primeiros testes realizados.

A grande dificuldade inicial foi imaginar como a solução tampão ficaria em contato com o gel, já que este estaria completamente cercado pelas laterais com as paredes do recipiente de plástico. Assim, como artifício, foi estabelecido que na parte inferior houvesse três orifícios para que o gel pudesse ter contato com o tampão. Da mesma forma, para imprimir um maior contato, além daqueles do tampão da parte superior e inferior, foi realizado a introdução de uma peça plástica nas

mesmas dimensões da parede lateral. Após resfriamento a peça foi retirada para que se estabelecesse um espaço entre o gel e a parede lateral do plástico e, assim, preenchê-lo com a solução tampão.

Desta forma, uma fina película de tampão ficou em contato direto com o gel para garantir a neutralização de cargas do material genético. Medidas cautelares foram empregadas no preparo dos poços no gel que não podiam ter contato direto com a superfície lateral do recipiente menor onde esses ficam inseridos. Impedindo assim, que porventura o material biológico migrasse atraído pela carga elétrica pela lateral e não através do gel. Desta forma, os orifícios foram feitos na parte central superior do gel e com no mínimo 1,0 cm de profundidade com o uso de palitos de madeira, para que mesmo com o açúcar, que agiu como precipitante, não houvesse a possibilidade da amostra escapar diluída ao tampão.

No segundo teste já foi possível se visualizar a corrida do material, por mais que problemas, como eram de se esperar, tenham ocorrido. A preocupação com a oxidação dos pregos era uma constante, já que era o que mais prejudicava no experimento na corrida horizontal. Foi verificado que a oxidação em sua maior parte se dava entre o fio de cobre da fonte que ficava ligado ao prego. Assim, o prego de ferro foi substituído por inox o que evitou aspecto escurecido demasiado durante a corrida, mas não o impedimento da origem de uma borra esverdeada proveniente da oxidação do cobre, ou seja, indicativo de interferentes de formação de um complexo de Cobre com íon boráx ou até mesmo com a cadeia de aminoácido da gelatina. Também cor alaranjada encontrada no experimento de eletroforese é um indicativo de interferentes de formação de um complexo de ferro em reação com o íon boráx ou a cadeia de aminoácidos da gelatina.

Como há um aquecimento da solução tampão foi necessário completar o volume total, por algumas vezes, para que a resistência não ficasse descoberta na sua parte superior durante o processo da corrida que durou em média, em cada experimento, cerca de três horas com a fonte de energia de uma antiga impressora já existente no laboratório. Assim a corrida pôde ser visualizada na forma tradicional com o uso de pregos, o que causa muitos interferentes dificultando assim a visualização da corrida (Fig.4).



Figura 4 - Corrida eletroforética com interferentes

De início não houve o cuidado de se conferir a voltagem da primeira fonte (impressora) já existente no laboratório. Após a conferência percebeu-se que a voltagem estava desregulada, o que pode ter contribuído para formação de interferentes.

Verificou-se uma maior quantidade de interferentes com o uso de pregos. Assim, optou-se para o uso apenas de fios de cobre como eletrodos (sem os pregos) que propiciaram uma melhor visualização da corrida. Envolto ao fio de cobre, após a corrida, surgiu uma crosta azulada, devido à oxidação do cobre (Fig.5). Ressaltando que a cuba que estava preenchida pelo gel foi anexada à cuba maior com o uso de um grampo que não ficou em contato direto com os eletrodos.

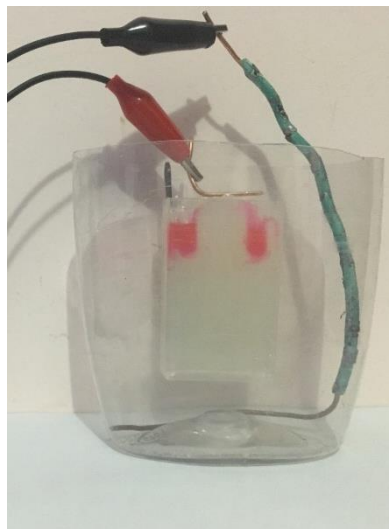


Figura 5 - Eletrodos apenas com o cobre, e cuba menor afixada a cuba maior com um grampo.

Não se pode deixar os jacarés em contato com a solução tampão, caso contrário isso acarretará em uma maior quantidade de interferentes, pois há a oxidação do ferro com o cobre.

Desta maneira pode-se observar que o experimento se mostrou promissor em relação à corrida vertical nos quesitos de visualização da amostra e de menos interferências que o apresentado por experimentos alternativos já seguidos na literatura (Fig.6).

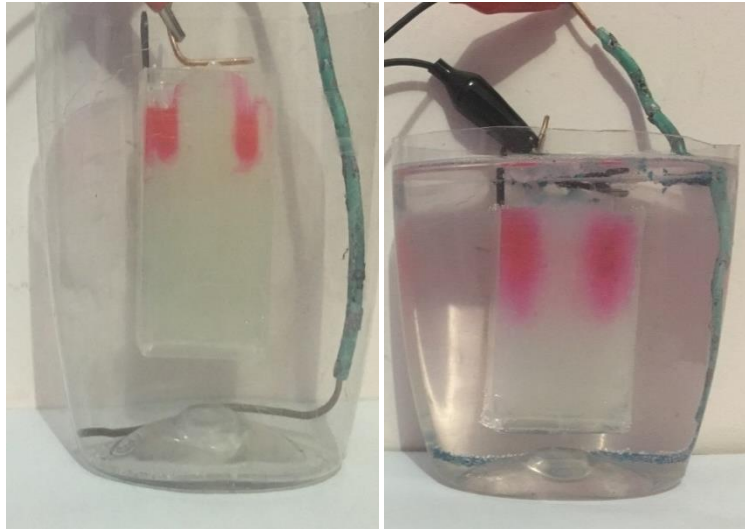


Figura 6- Representação da corrida antes da aplicação de corrente elétrica, e após 2 horas de aplicação de corrente demonstrando a corrida eletroforética.

Conclusões

A prática alternativa de eletroforese caseira vertical se mostrou eficiente como ferramenta de ensino de baixo custo e de fácil execução, podendo ser aplicada em aulas experimentais para auxiliar no entendimento do processo de migração de material biológico através de cargas.

É importante esclarecer que alguns ajustes deverão ser executados e testados para aperfeiçoamento da prática.

Referências

BRASIL.; MEC.; Secretaria da Educação Média e Tecnológica. O papel da educação na sociedade tecnológica. **Parâmetros curriculares nacionais:** ensino médio (1ª parte). Brasília: MEC/Secretaria da Educação Média e Tecnológica, 1999. 7-139.p.

Carretero, M. (1993) **Constructivismo Y educación** . Madrid: Edelvives. También Buenos Aires: Aique.

EMBRAPA TRIGO (Passo Fundo-rs) (Org.). **A TÉCNICA DE ELETROFORESE: IMPORTÂNCIA E APLICAÇÕES EM ANÁLISES GENÉTICAS**. 2001. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm>. Acesso em: 24 jun. 2017.

GALHARDO, E. **Extraindo DNA de morango**. Disponível em: <http://www2.assis.unesp.br/egalhard/Dna_2012.htm> .Acesso em: 25 mar. 2018.

LEE, Jhon D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5. ed. Inglesa: Ed. Edgard Blucher, 1999. 527 p.

Loreto, E. L. S. e Sepel, L. M. N. (2003) **Atividades Experimentais e Didáticas de Biologia Molecular e Celular**. 2a Ed., Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto. SP.

MARTINEZ, Emanuel Ricardo Monteiro; PAIVA, Luiz Ricardo de Souza. **ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS: UMA PRÁTICA PARA O ENSINO DE GENÉTICA**. **Genética na Escola**, Botucatu/sp, p.43-48, 2008. Semestral. Disponível em: <http://docs.wixstatic.com/ugd/b703be_6c9b3459eb3944babcc728b65b49ba06.pdf>. Acesso em: 25 maio 2018.

NAOUM, P. C. **Eletroforese: Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas,**

Lipoproteínas e DNA. São Paulo: Editora Santos. 2012, 301p.

OLIVEIRA, Evelyn de *et al.* Eletroforese: Conceitos e aplicações. **Enciclopédia Biofera: centro científico conhecer**, Goiania-go, v. 11, n. 22, p.1129-1149, 2015. Semestral. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015c/agrarias/Eletroforese.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2017.

OLIVEIRA, Renato Ventresqui et al. Construção de fonte e cuba de eletroforese horizontal e sua aplicação em aulas práticas de bioquímica. **Revista Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular**, Triângulo Mineiro/mg, n. 01, p.23-27, 01 2012. Semestral. Disponível em: <<http://bioquimica.org.br/revista/ojs/index.php/REB/article/view/170>>. Acesso em: 25 maio 2018.

POZO, J. I.; CRESPO, M. A. G. **A aprendizagem e o ensino de ciências: do conhecimento cotidiano ao conhecimento científico**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

RUSSELL, J.B. **Química Geral**. 2. ed. São Paulo, 1994. 731. p.