



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**BIOLOGIA SINTÉTICA APLICADA À  
DEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS**

**LUCAS DANIEL OVELAR VARGAS**

Foz do Iguaçu  
2024



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

## **BIOLOGIA SINTÉTICA APLICADA À DEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS**

**LUCAS DANIEL OVELAR VARGAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida  
e da Natureza da Universidade Federal da Integração  
Latino-Americana, como requisito parcial  
obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Prof. Cristian Antonio  
Rojas

Foz do Iguaçu  
2024  
LUCAS DANIEL OVELAR VARGAS

# **BIOLOGIA SINTÉTICA APLICADA À DEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas  
UNILA

---

Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos  
UNILA

---

Reinaldo Santos Shimabuku Junior  
Itaipu Binacional

Foz do Iguaçu, 10 de outubro de 2024.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Lucas Daniel Ovelar Vargas

Curso: Biotecnologia

	Tipo de Documento
(...x..) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(...x..) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....)

Título do trabalho acadêmico: BIOLOGIA SINTÉTICA APLICADA À DEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS

Nome do orientador(a): Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas

Data da Defesa: 10/10/2024

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 10 de outubro de 2024.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável

## RESUMO

A crescente poluição causada pelo acúmulo de plásticos, especialmente o PET (polietileno tereftalato), representa um desafio ambiental significativo. Este trabalho aborda a necessidade urgente de soluções biotecnológicas para a degradação de plásticos, utilizando circuitos genéticos projetados para expressar enzimas capazes de degradar esses materiais. O objetivo deste TCC foi desenvolver um circuito genético capaz de expressar a enzima Fast-PETase, conhecida por sua capacidade de degradar o PET, em bactérias *Escherichia coli*. Durante o desenvolvimento do projeto, foi construído um circuito genético com a Fast-PETase utilizando técnicas de biologia sintética. A validação deste circuito foi realizada através de PCR de colônia, confirmando o sucesso da montagem e a presença do gene da enzima Fast-PETase no plasmídeo de expressão, inserido nas células bacterianas *Escherichia coli DH5α*. Esta etapa é fundamental para garantir que a bactéria possa produzir a enzima, que posteriormente será testada para sua capacidade de degradar plásticos. O trabalho também destacou a importância da reutilização de partes genéticas previamente disponíveis, otimizando recursos e reduzindo custos. A validação de 13 Protocolos Operacionais Padrão (POPs) ao longo do processo garantiu a reprodutibilidade e a confiabilidade dos experimentos realizados. Embora o foco principal tenha sido a construção do circuito genético, as próximas etapas do projeto envolvem testar a atividade enzimática da Fast-PETase para confirmar sua eficiência na degradação de PET. Este trabalho representa um passo importante no desenvolvimento de soluções biotecnológicas para o problema global dos resíduos plásticos, contribuindo para avanços no campo da biologia sintética.

**Palavras-chave:** Biologia sintética, Circuitos genéticos, Fast-PETase, Degradação de plásticos, PET.

## RESUMEN

La creciente contaminación causada por la acumulación de plásticos, especialmente el PET (tereftalato de polietileno), representa un desafío ambiental significativo. Este trabajo aborda la necesidad urgente de soluciones biotecnológicas para la degradación de plásticos, utilizando circuitos genéticos diseñados para expresar enzimas capaces de degradar estos materiales. El objetivo de este TFG fue desarrollar un circuito genético capaz de expresar la enzima Fast-PETase, conocida por su capacidad para degradar el PET, en bacterias *Escherichia coli*. Durante el desarrollo del proyecto, se construyó un circuito genético con la Fast-PETase utilizando técnicas de biología sintética. La validación de este circuito se realizó mediante PCR de colonia, confirmando el éxito del ensamblaje y la presencia del gen de la enzima Fast-PETase en el plásmido de expresión, insertado en las células bacterianas *Escherichia coli DH5α*. Esta etapa es fundamental para garantizar que la bacteria pueda producir la enzima, que posteriormente será probada para su capacidad de degradar plásticos. El trabajo también destacó la importancia de reutilizar partes genéticas previamente disponibles, optimizando recursos y reduciendo costos. La validación de 13 Protocolos Operativos Estándar (POE) a lo largo del proceso garantizó la reproducibilidad y confiabilidad de los experimentos realizados. Aunque el enfoque principal fue la construcción del circuito genético, las próximas etapas del proyecto incluyen probar la actividad enzimática de la Fast-PETase para confirmar su eficiencia en la degradación del PET. Este trabajo representa un paso importante en el desarrollo de soluciones biotecnológicas para el problema global de los residuos plásticos, contribuyendo a los avances en el campo de la biología sintética.

**Palabras clave:** Biología sintética, Circuitos genéticos, Fast-PETase, Degradación de plásticos, PET.

## ABSTRACT

The growing pollution caused by the accumulation of plastics, especially PET (polyethylene terephthalate), represents a significant environmental challenge. This work addresses the urgent need for biotechnological solutions for plastic degradation, using genetic circuits designed to express enzymes capable of breaking down these materials. The goal of this thesis was to develop a genetic circuit capable of expressing the Fast-PETase enzyme, known for its ability to degrade PET, in *Escherichia coli* bacteria. During the development of the project, a genetic circuit with Fast-PETase was built using synthetic biology techniques. The validation of this circuit was carried out through colony PCR, confirming the successful assembly and the presence of the Fast-PETase gene in the expression plasmid inserted into the *Escherichia coli DH5α* bacterial cells. This step is crucial to ensure that the bacteria can produce the enzyme, which will later be tested for its ability to degrade plastics. The work also highlighted the importance of reusing previously available genetic parts, optimizing resources, and reducing costs. The validation of 13 Standard Operating Protocols (SOPs) throughout the process ensured the reproducibility and reliability of the experiments conducted. While the primary focus was on constructing the genetic circuit, the next steps involve testing the enzymatic activity of Fast-PETase to confirm its efficiency in PET degradation. This work represents an important step in the development of biotechnological solutions to the global plastic waste problem, contributing to advances in the field of synthetic biology.

**Keywords:** Synthetic biology, Genetic circuits, Fast-PETase, Plastic degradation, PET.

## RÉSUMÉ

La pollution croissante causée par l'accumulation de plastiques, en particulier le PET (polyéthylène téréphtalate), représente un défi environnemental majeur. Ce travail aborde la nécessité urgente de solutions biotechnologiques pour la dégradation des plastiques, en utilisant des circuits génétiques conçus pour exprimer des enzymes capables de dégrader ces matériaux. L'objectif de ce mémoire était de développer un circuit génétique capable d'exprimer l'enzyme Fast-PETase, connue pour sa capacité à dégrader le PET, chez les bactéries *Escherichia coli*. Au cours du développement du projet, un circuit génétique avec la Fast-PETase a été construit à l'aide de techniques de biologie synthétique. La validation de ce circuit a été réalisée par PCR de colonie, confirmant le succès de l'assemblage et la présence du gène de la Fast-PETase dans le plasmide d'expression inséré dans les cellules bactériennes *Escherichia coli DH5α*. Cette étape est essentielle pour garantir que la bactérie puisse produire l'enzyme, qui sera ensuite testée pour sa capacité à dégrader les plastiques. Le travail a également souligné l'importance de la réutilisation des parties génétiques disponibles, optimisant les ressources et réduisant les coûts. La validation de 13 Protocoles Opérationnels Standard (SOP) tout au long du processus a assuré la reproductibilité et la fiabilité des expériences réalisées. Bien que l'objectif principal ait été la construction du circuit génétique, les prochaines étapes consistent à tester l'activité enzymatique de la Fast-PETase pour confirmer son efficacité dans la dégradation du PET. Ce travail représente une étape importante dans le développement de solutions biotechnologiques au problème mondial des déchets plastiques, contribuant aux avancées dans le domaine de la biologie synthétique.

**Mots-clés:** Biologie synthétique, Circuits génétiques, Fast-PETase, Dégradation des plastiques, PET.

# Índice de Figuras

Figura 1. Exposição a microplásticos e nanoplásticos.....	14
Figura 2: Via metabólica da degradação do PET por hidrólise enzimática.....	17
Figura 3: Comparação da fenda de ligação do substrato entre Cutinase e PETase.....	18
Figura 4: A estrutura monomérica em diagrama de fitas.....	19
Figura 5: a) Etapa de geração de incisões. b) Etapa de digestão terminal.....	22
Figura 6: Mutações chave.....	23
Figura 7: Representação do gene da "Fast PETase".....	24
Figura 8: Representação da proteína quimérica.....	26
Figura 9: fluxograma dos experimentos laboratoriais.....	31
Figura 11: Esquema do cassete de expressão mCherry do projeto BioPank.....	32
Figura 12: Plasmídeo G0_mCherry_pBBR1Mcs-2 montado em pBBR1Mcs-2.....	34
Figura 13: Circuitos genéticos projetados para este projeto.....	35
Figura 14: G0_pBBR1Mcs-2 LINEARIZADO.....	36
Figura 15: E3. G0+F-PETase FWD, primer para linearizar G0_mCherry_pBBR1Mcs-2.....	36
Figura 16: E345. G0+F-PETase REV, primer para linearizar G0_mCherry_pBBR1Mcs-2.....	36
Figura 17: G0 pBBR1MCS-2 + F-PETase.....	38
Figura 18: G0 pBBR1MCS-2 + F-PETase_Link_MHETase_SP20.....	39
Figura 19: E5. G0 pBBR1MCS-2 + F-PETase_F2A_mCherry.....	40
Figura 20: Resultado da extração no nanodrop, com o plasmídeo G0.....	42
Figura 21: Resultado da corrida de eletroforese.....	43
Figura 22: Resultado da corrida de eletroforese.....	44
Figura 23: Resultado da corrida de eletroforese dos produtos de PCR.....	45
Figura 24: Resultado da corrida de eletroforese dos produtos de PCR.....	45
Figura 25: Cálculo com NEBioCalculator de quantos ng será necessário de vetor.....	46
Figura 26: Cálculo com NEBioCalculator quantos ng será necessário de inserto.....	46
Figura 27: Execução de eletroforese do resultado da PCR de colônia.....	48
Figura 28: a)Inóculo das linhas 2 e 6 no tempo 0. b)Inóculo das linhas 2 e 6 após 48h.....	48
Figura 29: Resultado da leitura em triplicata da extração no nanodrop.....	49
Figura 30: Execução de eletroforese da minipreparação da figura 29.....	49
Figura 31: Execução de eletroforese do resultado da PCR de colônia.....	51
Figura 32: Execução de eletroforese da linearização de G0 em 2 de fevereiro de 2024.....	52
Figura 33: PCR in silico do plasmídeo G0 em pBBR1MCS-1, no software SnapGene (a) e Benchling (b).....	53
Figura 34: Diferença entre o G0 linearizado sem purificação e purificado.....	55
Figura 35: análise morfológica entre as colônias transformadas e não transformadas de E. coli DH5α.....	55
Figura 36: Micrografias eletrônicas de varredura (SEM) mostrando a degradação de filmes de PCL.....	57
Figura 37: Colônias bacterianas e zonas claras em placas de LB-agar com emulsão de PCL.....	57

# Índice de Tabelas

Tabela 1: Tabela Comparativa de Enzimas Capazes de Degradar Plástico.....	19
Tabela 2: Atividade Hidrolítica Comparativa de Variantes de PETase.....	25
Tabela 3: Configuração do termociclador para a linearização do plasmídeo G0.....	42
Tabela 4: Quantidades utilizadas para realizar o gibson assembly na proporção de 1:3.....	47
Tabela 5: Configuração do termociclador para PCR de colônia para o G0+Fast-PETa.....	47
Tabela 6: Configuração do termociclador para a linearização do plasmídeo G0.....	54

# Índice

<b>Índice</b> .....	<b>11</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>13</b>
Microplásticos e nanoplásticos.....	13
Impacto na saúde humana.....	13
Métodos atuais de tratamento de plástico.....	15
Reciclagem Mecânica e Química.....	16
Reciclagem Biotecnológica.....	16
Degradação enzimática de PET.....	16
Estrutura da PETase.....	17
Comparação estrutural de IsPETase com outras enzimas degradantes de PET.....	18
Mecanismo de degradação de PETase.....	21
FAST-PETase: uma inovação na degradação enzimática de PET.....	23
Melhorias em sites ativos e estrutura.....	24
Avaliação da atividade hidrolítica.....	24
Proteínas fusionadas: Linkers.....	25
Biologia Sintética e Projeto de Circuitos Biológicos.....	26
Syn Fronteiras e Mhetyguá.....	28
<b>Objetivos</b> .....	<b>29</b>
Objetivo geral.....	29
Objetivos específicos.....	29
<b>Metodologia</b> .....	<b>30</b>
Seleção de chassi.....	30
Projeto in-silico do circuito genético.....	31
Sobre as construções genéticas do projeto BioPank.....	31
Desenho do circuito genético com Fast-PETase em Benchling.....	33
Validação de Primer usando a ferramenta OligoAnalyzer™.....	36
Validação de Primer usando NEBuilder® Assembly Tool.....	36
Construções genéticas.....	37
Construção 1.....	37
Construção 2.....	38
Construção 3.....	39
Experimentos de laboratório.....	40
Preparação de soluções estoque para atividades de biologia molecular.....	40
Preparação do meio de cultura LB (Luria Bertani).....	40
Reativação de Escherichia coli como plasmídeo G0 de facadas ou culturas preservadas.....	40
Preparação de soluções para extração de plasmídeos utilizando Miniprep Alkaline Lysis.....	40
Extração de Plasmídeo por Lise Alcalina Miniprep.....	41
Linearização do plasmídeo G0 usando o kit Q5 High-Fidelity 2X Master Mix.....	41
Eletroforese em Gel de Agarose.....	42
Extração de plasmídeo linearizado em Gel usando o Monarch® DNA Gel Extraction Kit.....	43

Montagem do G0 Linearizado e das inserções de DNA do NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit.....	45
PCR de Colônia Utilizando o Kit Q5 High-Fidelity 2X Master Mix.....	47
Uma vez concluída a montagem gibson e transformada em um E. coliDH5um, foi deixado crescer por 8 dias em estufa a 37°C. Então A PCR de colônia foi realizada para verificar a presença do plasmídeo montado nas células transformadas. As reações de PCR foram preparadas usando o kit Q5 High-Fidelity 2X Master Mix e executadas em um termociclador (POP 12).....	47
Cultura de inóculo para realizar Miniprep.....	48
Foi realizado o inóculo das colônias positivas para PCR de colônia, a partir das linhas 2 e 6, sendo a linha 6 uma linha mais fraca, o que pode indicar menor concentração de plasmídeos (POP 04).....	48
Extração de Plasmídeo por Lise Alcalina Miniprep.....	49
Fonte: Autor.....	49
<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>50</b>
Impacto do TCC no ecossistema da Biologia Sintética.....	50
O impacto desta TCC vai além dos resultados experimentais individuais. Ao servir de ponte entre projetos anteriores e futuros, este trabalho garante a continuidade das pesquisas em biologia sintética dentro da UNILA. Além disso, reforça a importância da colaboração interdisciplinar e do desenvolvimento de capacidades locais em biotecnologia, o que é crucial para a sustentabilidade a longo prazo da investigação nesta área.....	50
Projeto e montagem de Circuitos Genéticos.....	50
Reutilização de Recursos Genéticos.....	51
Validação de Protocolos Operacionais Padrão (SOPs).....	52
Próximas etapas: expressão genética e prova de conceito.....	57
<b>Conclusões.....</b>	<b>59</b>
<b>Referências.....</b>	<b>61</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>64</b>

# Introdução

## Microplásticos e nanoplásticos

A crescente preocupação com a poluição ambiental destacou recentemente o impacto dos microplásticos e nanoplásticos nos ecossistemas e na saúde humana. Os microplásticos são partículas de plástico com tamanho inferior a 5 mm, enquanto os nanoplásticos são ainda menores, com dimensões inferiores a 1  $\mu\text{m}$ . Essas partículas podem ser originadas tanto da fragmentação de objetos plásticos maiores quanto de produtos projetados para conter partículas pequenas, como certos cosméticos e produtos de limpeza (SAPEA, 2019).

A difusão de microplásticos e nanoplásticos no meio ambiente levou à sua detecção em uma variedade de matrizes, incluindo ar, água e solo. Estudos recentes mostraram a presença destas partículas mesmo em regiões remotas como o Ártico e a Antártica (Materic et al., 2021). A sua presença no ar é particularmente preocupante devido à sua capacidade de serem inalados e depositados nos pulmões, o que pode ter sérias implicações para a saúde respiratória humana (Facciola et al., 2021).

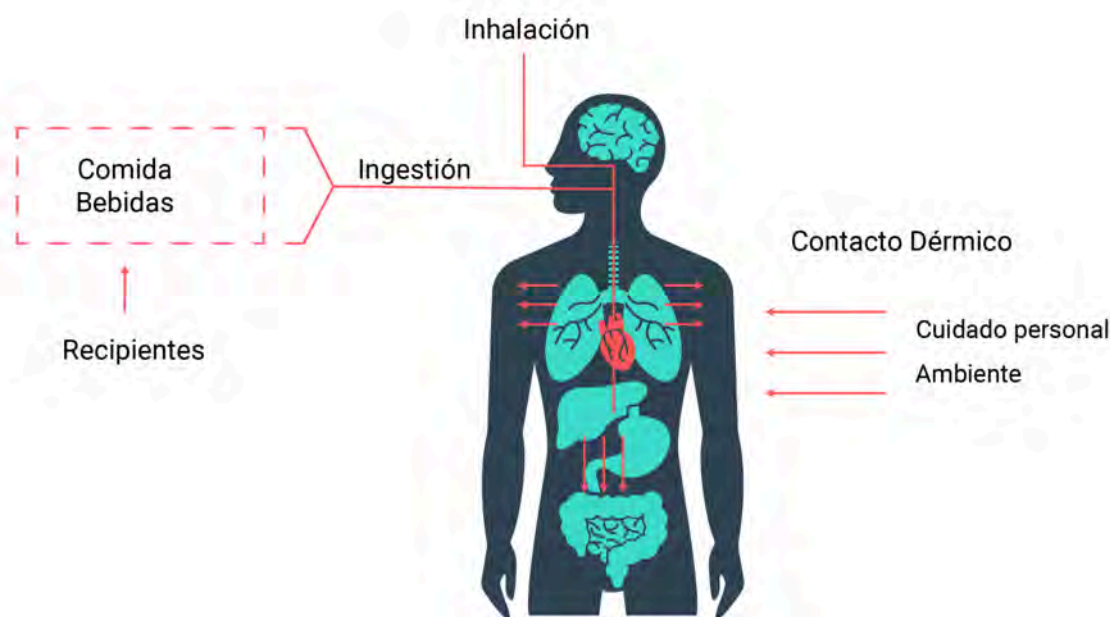
A investigação revelou que os nanoplásticos, devido à sua elevada relação superfície-volume e à sua capacidade de permeabilidade biológica, podem ser internalizados e acumular-se em células de mamíferos, o que aumenta o risco de toxicidade. Em particular, os nanoplásticos de tereftalato de polietileno (PET), amplamente utilizados em embalagens de alimentos e têxteis, têm sido menos estudados em comparação com outros tipos de plásticos. No entanto, estudos recentes indicaram que os nanoplásticos PET podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e causar danos ao DNA em células epiteliais humanas (Alzaben et al., 2023).

Além da exposição por inalação, a ingestão de microplásticos e nanoplásticos através de alimentos e bebidas é outra via significativa de exposição humana. Estudos encontraram partículas de plástico numa vasta gama de produtos alimentares, desde água engarrafada até marisco e produtos processados (Yee et al., 2021). A contaminação de alimentos e bebidas representa um risco direto para a saúde humana, pois as partículas ingeridas podem atravessar as barreiras intestinais e entrar no sistema circulatório, acumulando-se potencialmente em órgãos e tecidos (Liu et al., 2019).

## Impacto na saúde humana

A exposição humana a microplásticos e nanoplásticos tem gerado preocupação crescente devido aos seus potenciais efeitos adversos à saúde. Esses minúsculos fragmentos de plástico podem entrar no corpo humano por diversas vias, incluindo inalação, ingestão e contato dérmico (Figura 1). Uma vez dentro do corpo, seu pequeno tamanho e capacidade de transportar contaminantes químicos podem desencadear uma série de respostas biológicas que podem ser tóxicas.

Figura 1. Exposição a microplásticos e nanoplásticos



Fonte: Autor

Os microplásticos presentes no ar podem ser inalados, representando um risco significativo para a saúde respiratória. Estudos demonstraram que partículas de plástico podem depositar-se nos pulmões, causando inflamação e stress oxidativo, o que pode levar ao desenvolvimento de doenças respiratórias crônicas, como asma e bronquite (Wang et al., 2023). Além disso, a inalação de microplásticos pode provocar uma resposta imunitária, desencadeando a produção de citocinas inflamatórias e outros mediadores do sistema imunitário.

A ingestão de microplásticos através de alimentos e bebidas é outra importante via de exposição. Os microplásticos foram encontrados numa variedade de produtos alimentares, incluindo peixe, marisco, sal, açúcar e água engarrafada. Uma vez ingeridos, os microplásticos podem atravessar a barreira intestinal e entrar no sistema circulatório, o que pode levar à sua acumulação em órgãos vitais como o fígado, os rins e o cérebro (Sun & Wang, 2023). A presença destas partículas no sistema digestivo pode causar danos celulares, inflamação e alterar a função metabólica.

O contato dérmico é outra via de exposição aos microplásticos que tem suscitado preocupação. Esse tipo de exposição ocorre quando a pele entra em contato direto com produtos que contêm microplásticos, como cosméticos, produtos de higiene pessoal e têxteis. A penetração dos microplásticos através da pele depende de vários fatores, incluindo o tamanho das partículas e a sua composição química. Estudos sugeriram que partículas muito pequenas (nanoplásticos) poderiam penetrar nas camadas superficiais da pele, causando inflamação ou respostas imunológicas locais (Smith et al., 2021). Além disso, o uso de roupas e têxteis sintéticos pode contribuir para a exposição dérmica, podendo levar a efeitos adversos ainda não totalmente compreendidos.

A exposição crônica a microplásticos pode estar associada a uma série de condições adversas de saúde. A inflamação crônica induzida por estas partículas pode contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e cancro. Além disso, os microplásticos podem afetar o sistema endócrino, alterando a produção e regulação de hormônios, o que pode ter efeitos adversos no desenvolvimento e na reprodução humana (Sun & Wang, 2023).

A crescente preocupação com a presença de microplásticos e nanoplásticos no ambiente levou a um reconhecimento global da necessidade de abordar o problema do plástico em múltiplas frentes. Embora a investigação tenha realçado os riscos significativos que estes pequenos fragmentos de plástico representam para a saúde humana e os ecossistemas, é também essencial considerar as estratégias atualmente empregues para mitigar o seu impacto.

Neste contexto, os atuais métodos de tratamento de plásticos desempenham um papel crucial na redução da acumulação de resíduos plásticos e, portanto, na redução da geração de microplásticos e nanoplásticos. Estes métodos, que incluem abordagens mecânicas e químicas, bem como técnicas biotecnológicas emergentes, procuram oferecer soluções para gerir o plástico em fim de vida de uma forma mais sustentável e eficiente. A implementação e melhoria contínua destes métodos é essencial para mitigar os efeitos negativos que os plásticos e seus derivados têm no ambiente e na saúde pública.

## Métodos atuais de tratamento de plástico

Os plásticos são materiais essenciais em nosso dia a dia devido às suas propriedades desejáveis, como leveza, durabilidade, baixo custo e facilidade de processamento em diversas formas. No entanto, a não degradabilidade, outrora considerada uma grande vantagem dos plásticos, tem sido reconsiderada como uma das principais causas de problemas ambientais, especialmente devido à acumulação de resíduos plásticos em aterros sanitários e nos oceanos. A produção de plástico tem aumentado continuamente e estima-se que a quantidade de resíduos plásticos acumulados atingirá 33 mil milhões de toneladas até 2050 (Joo et al., 2018). Os plásticos tiveram um impacto negativo no meio ambiente devido à má gestão dos resíduos pós-consumo. De todos os plásticos produzidos entre 1950 e 2015, estima-se que 12% foram incinerados, apenas 9% foram reciclados e o restante foi descartado em aterros ou outros ambientes naturais, onde podem levar centenas de anos para se decompor (Geyer et al. ., 2017).

O tereftalato de polietileno (PET), um polímero sintético derivado do petróleo, é amplamente utilizado em embalagens de alimentos e bebidas, têxteis e outros produtos de consumo. A produção global anual de PET ultrapassou 30 milhões de toneladas métricas em 2019, com uma taxa de crescimento de mercado esperada de 4% (Geyer, 2020). No entanto, a reciclagem de resíduos de PET continua limitada pelas suas propriedades de resistência e estabilidade, o que por sua vez dificulta a sua degradação, contribuindo significativamente para a acumulação de resíduos plásticos no ambiente. Um relatório do Serviço Nacional de

Parques dos EUA indica que as garrafas PET requerem aproximadamente 450 anos para se decomporem completamente (Joo et al., 2018).

Para resolver este problema, vários métodos de degradação química foram desenvolvidos, tais como glicólise, metanólise, hidrólise, aminólise e amonólise. No entanto, estes métodos geralmente requerem altas temperaturas e muitas vezes geram poluentes ambientais adicionais (Joo et al., 2018). Alternativamente, a degradação biocatalítica foi proposta como um método ambientalmente correto. Os microrganismos podem degradar plásticos com ligações éster por hidrólise enzimática através da colonização das superfícies dos materiais. O grau de biodegradabilidade dos plásticos depende das suas propriedades químicas e físicas (Joo et al., 2018).

## Reciclagem Mecânica e Química

A reciclagem mecânica envolve a coleta, triagem e processamento de plásticos para reutilização. No entanto, a degradação das propriedades do material durante a reciclagem e a contaminação por aditivos limitam a sua eficácia. Por outro lado, a reciclagem química decompõe os plásticos nos seus monômeros básicos, que podem ser reutilizados para produzir novos plásticos. Este método inclui processos como glicólise, hidrólise e metanólise, que, embora eficazes, geralmente requerem altas temperaturas e geram contaminantes adicionais (Achilias et al., 2011).

## Reciclagem Biotecnológica

A despolimerização biotecnológica de PET e a repolimerização de monômeros recuperados estão emergindo como soluções promissoras. Esta abordagem envolve a utilização de enzimas e microrganismos para decompor o PET nos seus monômeros constituintes, que podem então ser reutilizados para criar produtos de maior valor. A tecnologia de *upcycling* biológico, material ou produto projetado para retornar ao ciclo biológico, interagindo de forma benéfica com a biosfera, integra a despolimerização microbiana do PET seguida pela repolimerização de monômeros derivados do PET em produtos de valor agregado (Kim et al., 2022).

Tradicionalmente, a reciclagem de PET tem se baseado principalmente na reciclagem física ou downcycling, onde os resíduos de PET são reformados fisicamente ou mecanicamente e quimicamente despolimerizados em ácido tereftálico (TPA) e etilenoglicol (EG), que são então repolimerizados em PET reciclado ou usados para produzir outros produtos. No entanto, este método é limitado e não tão viável economicamente no longo prazo devido aos altos custos e à qualidade inferior do PET reciclado em comparação com aquele produzido a partir de monômeros à base de petróleo (Garcia-Manyes & Beedle, 2017).

## Degradação enzimática de PET

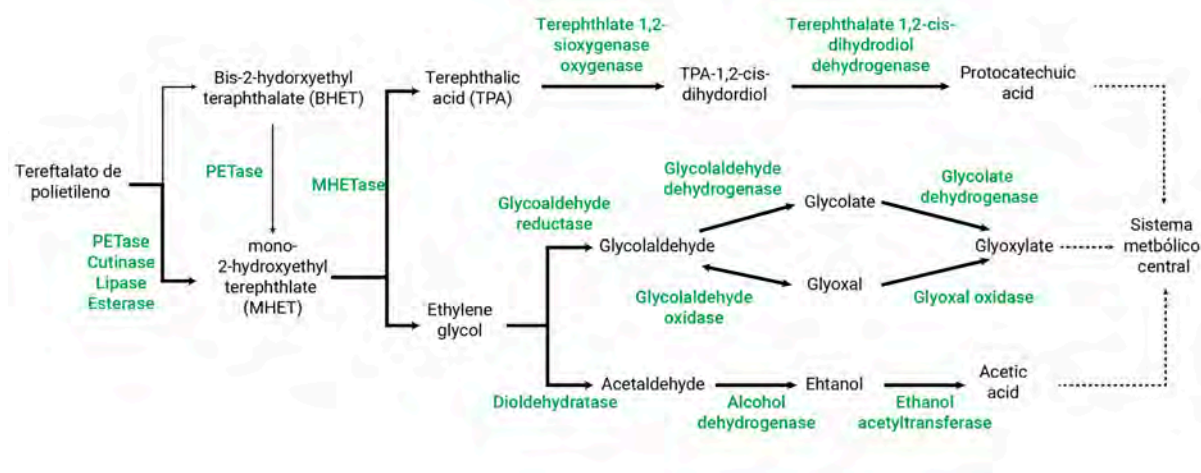
O tereftalato de polietileno (PET) é um dos polímeros mais resistentes e difíceis de degradar devido à sua estrutura química estável. No entanto, certos microrganismos e enzimas têm a

capacidade de hidrolisar as ligações éster do PET, decompondo-o nos seus monômeros constituintes, como o ácido tereftálico (TPA) e o etilenoglicol (EG) (Figura 2).

Para resolver este problema, foram identificadas várias enzimas capazes de degradar o PET. Estes incluem hidrolases bacterianas, como cutinases, lipases, carboxilesterases e esterases, que podem degradar o PET em graus variados (Joo et al., 2018). Entre as enzimas degradadoras de PET mais conhecidas estão TfH e TfH BTA-2. *Thermobifida fusca*, TfCut1 e TfCut2 também de *T. fusca*, cutinase *Saccharomonospora viridis*, HiC de *Thermomyces insolens* e lipase B *Candida antártica*. Embora estas enzimas apresentem atividade de degradação do PET, a sua eficiência é geralmente baixa para aplicações industriais (Joo et al., 2018). Para melhorar a atividade enzimática, diversas estratégias têm sido adotadas, como a mutagênese direcionada do sítio ativo e a introdução de íons metálicos ou ligações dissulfeto para melhorar a estabilidade térmica das enzimas.

Em 2016, Yoshida e colegas descobriram duas enzimas específicas para a degradação de filmes PET (Figura 2), chamadas IsPETase e IsMHETase, da cepa *Ideonella sakaiensis* 201-F6. A isPETase apresenta alta atividade mesmo em PET de alta cristalinidade e possui sítios ativos mais amplos em comparação com outras hidrolases de PET. A IsMHETase, por sua vez, apresenta especificidade exclusiva para MHET e não hidrolisa PET, BHET ou outros ésteres aromáticos e alifáticos (Yoshida et al., 2016; Palm et al., 2019).

Figura 2: Via metabólica de degradação do PET por hidrólise enzimática.



Fonte: Autor

## Estrutura da PETase

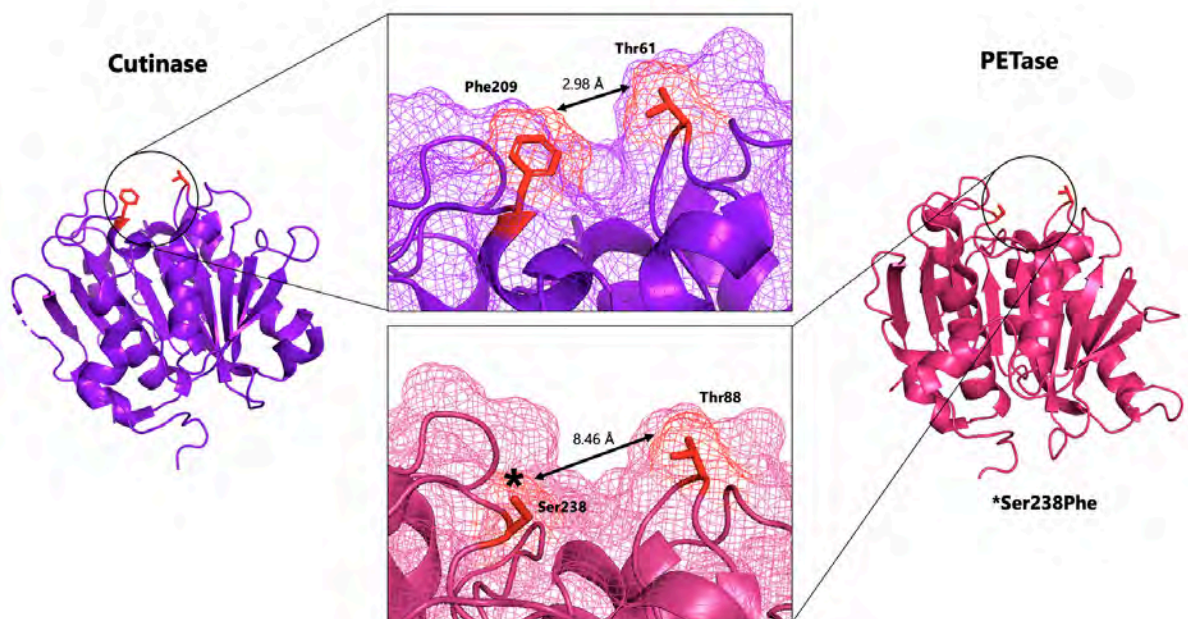
*Ideonella sakaiensis* PETase (IsPETase) é uma enzima que tem atraído grande interesse devido à sua capacidade de degradar eficientemente o tereftalato de polietileno (PET) em temperaturas moderadas. A estrutura da IsPETase (Figura 3) foi resolvida por cristalografia de raios X com uma resolução de 1,5 Å, revelando uma dobra típica de  $\alpha/\beta$ -hidrolase com um núcleo central de folhas  $\beta$  rodeadas por hélices  $\alpha$ . Essa dobra é comum na superfamília da serina hidrolase (Joo et al., 2018).

O sítio ativo da IsPETase contém uma tríade catalítica composta pelos resíduos Ser160, His237 e Asp206. Esses resíduos são cruciais para a atividade enzimática, atuando em conjunto para facilitar a hidrólise do PET. Ser160 atua como nucleófilo, atacando o carbono carbonílico da ligação éster do PET, enquanto His237 e Asp206 auxiliam na formação do estado de transição e estabilização do intermediário tetraédrico (Joo et al., 2018).

## Comparação estrutural de IsPETase com outras enzimas degradantes de PET

Uma das diferenças mais notáveis entre a IsPETase e outras enzimas que degradam PET é a conformação do sítio ativo (Figura 3). A tríade catalítica Ser160-His237-Asp206 em IsPETase é otimizada para hidrólise de PET, facilitando a formação de um intermediário tetraédrico estável durante a reação. Em contraste, embora cutinases e lipases possuam uma tríade catalítica semelhante, o seu arranjo espacial e acessibilidade ao substrato não são tão adequados para a degradação do PET (Joo et al., 2018)

Figura 3: Comparação da fenda de ligação do substrato entre Cutinase e PETase em relação à estrutura geral, que contém a dobra estrutural de  $\alpha/\beta$ -hidrolase. \*Marca a mutação Ser238Phe que causou o estreitamento do canal na PETase, mas não diminuiu a atividade da enzima.

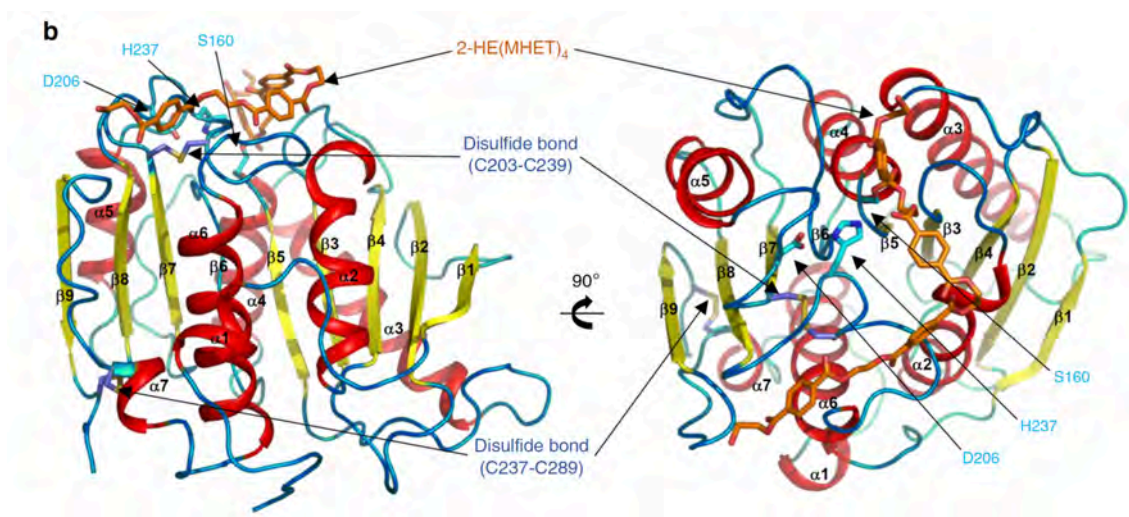


Fonte: Barclay, A. (2023).

As diferenças na superfície de ligação do substrato também apresentam diferenças, uma vez que a IsPETase é mais acessível e possui uma estrutura mais aberta em comparação às quitinases e lipases (Figura 4). Esta superfície inclui um sítio de ligação que pode acomodar até quatro unidades MHET, facilitando a interação com longas cadeias de PET e

melhorando a eficiência da degradação (Joo et al., 2018). A presença de resíduos hidrofóbicos nesta superfície também contribui para uma maior afinidade pelo PET.

Figura 4: A estrutura monomérica em um diagrama de fita. Os três resíduos Ser160, Asp206 e His237, que formam a tríade catalítica, são mostrados como bastões ciano, e as duas ligações dissulfeto são representadas como bastões lilases claros. A molécula simulada 2-HE(MHET)<sub>4</sub> no sítio ativo é mostrada como um bastão laranja. A figura à direita é girada 90° horizontalmente em comparação com a figura à esquerda.



Fonte: João, S. (2018).

Outra característica distintiva da IsPETase é a presença de duas ligações dissulfeto, uma das quais é exclusiva desta enzima. Estas ligações dissulfeto aumentam a estabilidade térmica da IsPETase, permitindo-lhe manter a sua atividade a temperaturas mais elevadas. Cutinases e lipases, por outro lado, normalmente apresentam menor estabilidade térmica devido à ausência dessas ligações adicionais (Joo et al., 2018).

A análise filogenética das enzimas que degradam o PET mostra que a IsPETase pertence a um grupo distinto de enzimas que evoluíram especificamente para interagir com o PET. As diferenças nas sequências e estruturas de aminoácidos entre a IsPETase e outras enzimas que degradam o PET (Tabela 1) sugerem que a IsPETase desenvolveu adaptações únicas que lhe permitem degradar o PET de forma mais eficiente (Kim et al., 2022).

Tabela 1: Tabela Comparativa de Enzimas Capazes de Degradar Plástico

Classificação	Difícil	Microrganismo	Número de acesso	Condições ideais	Substrato	Referência
enzimas fúngicas	FSC	<i>Fusarium solani pisi</i>	1CEX	30-60°C	PET (7%, 35%)	Ronkvist et al., 2009
	HiC	<i>Thermomyces insolens</i>	4OAA	30-85°C	PET (7%, 35%)	Ronkvist et al., 2009
	Lipase	<i>Aspergillus oryzae</i> CCUG 33812	-	30°C, pH 5,5-6,0	Fibra PET	Wang et al., 2008

enzimas de bactérias	BhrPETase	<i>Bacillus subtilis</i> HR29	GBD22443	37°C, pH 7,0	PET amorfo	Xi et al., 2021
	BsEstB	<i>Bacillus subtilis</i>	ADH43200.1	40-45°C	Bis(benzoiloxietil) TPA	Ribitsch et al., 2011
	BTA-1, BTA-2	<i>Thermobifida fusca</i> DSM43793	AJ810119.1	55°C, pH 7,0	Garrafa PET comercial	Muller et al., 2005
	Cbotu_EstA, Cbotu_EstB	<i>Clostridium botulinum</i> ATCC3502	KP859619, KP859620	50°C, pH 7,0	Filme PET	Biundo et al., 2018
	Cortar1, Cortar2	<i>Thermobifida fusca</i> NRRL B-8184	JN129499.1, JN129500.1	55°C, pH 8,0	PET	Hegde e Veeranki, 2013
	Cortar 190	<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK1901	BAO42836.1	60-65°C, pH 6,0-8,5	PET amorfo	Kawai et al., 2014
	DuraPETase	<i>Ideonella sakaiensis</i>	-	37°C, pH 9,0	Filme PET (30%)	Cui et al., 2019
	Est1	<i>Thermobifida alba</i> AHK119	BAI99230.2	50°C, pH 8,0	Filme PET	Hu et al., 2010
	Est119	<i>Thermobifida alba</i> AHK119	BAK48590.1	50°C, pH 6,0	PET	Thumarat et al., 2012
	Lipasa (1JFR)	<i>Streptomyces esfoliatus</i>	AAB51445	30°C, pH 6,0-7,5	-	Wei et al., 1998
	Despolimerase PBS	<i>Acidovorax delafieldii</i> BS-3	-	30-37°C	-	Uchida et al., 2002
	PE-H	<i>Pseudomonas estusnigri</i> VGXO14T	6SBN	30°C	Filme PET amorfo	Bollinger et al., 2020
	PETase, MHETase	<i>Ideonella sakaiensis</i> 201-F6	GAP38373.1, GAP38911	25-30°C, pH 7,0-9,0	Filme PET de baixa cristalinidade (1,9%), PET amorfo	Yoshida et al., 2016
	PMC	<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	50°C, pH 8,0	Filme PET de baixa cristalinidade	Ronkvist et al., 2009
	SM14est	<i>Streptomyces</i> sp. SM14	BK010828	28°C, pH 7,0	BHET	Almeida et al., 2019
	Tcur0390	<i>Thermomonospora curvata</i> DSM43183	ACY95991.1	50°C	Nanopartículas PET	Wei et al., 2014
	Tcur1278	<i>Thermomonospora curvata</i> DSM43183	ACY96861.1	50-60°C	Nanopartículas PET	Wei et al., 2014
	TfAXE	<i>Thermobifida fusca</i> NTU22	ADM47605.1	60°C, pH 7,5	torna-se	Lusty Beech et al., 2022

	TfCut1, TfCut2	<i>Thermobifida fusca</i> KW3	CBY05529.1, CBY05530.1	55-65°C	Filme PET de baixa cristalinidade	Herrero Acero et al., 2011
	TfH	<i>Thermobifida fusca</i> DSM43793	KR092133.1	55-70°C, pH 6,0-7,0	PET (10%)	Muller et al., 2005
	Tfu_0882, Tfu_0883	<i>Thermobifida fusca</i> YX	AAZ54920.1, AAZ54921.1	55-65°C, pH 8,0	butirato de p-nitrofenila	Chen et al., 2008
	Tha_Cut1	<i>Thermobifida alba</i> DSM43185	ADV92525.1	50°C	Bis(benzoiloxietil) TPA, PET (37%)	Ribitsch et al., 2012
	Thc_Cut1, Thc_Cut2	<i>Thermobifida celulosilica</i> DSM44535	ADV92526.1, ADV92527.1	50°C, pH 7,0	Bis(benzoiloxietil) TPA, PET (37%)	Herrero Acero et al., 2011
	Thf42_Cut1	<i>Thermobifida fusca</i> DSM44342	ADV92528.1	50°C	Bis(benzoiloxietil) TPA, PET (37%)	Herrero Acero et al., 2011
	Thh_Est	<i>Thermobifida halotolerans</i> DSM44931	AFA45122.1	50°C	Bis(benzoiloxietil) TPA	Ribitsch et al., 2012
Enzimas metagenômicas	CCB	Composto de folhas e galhos	AEV21261.1	50-70°C, pH 8,0	Filme PET amorfo	Sulaiman et al., 2012
	PET12	<i>Schlegelella brevitalea</i>	A0A0G3BI90	50°C	Nanopartículas PET	Danso et al., 2018
	PET2	Bactérias não cultivadas	7ECB_A, 7EC8_B, 7EC8_A	70°C, pH 8,0-9,0	Nanopartículas PET	Danso et al., 2018
	PET5	<i>Oleispira antártica</i> RB-8	R4YKL9	50°C	Nanopartículas PET	Danso et al., 2018
	PET6	<i>Vibrio gazogenes</i>	UPI0003945E1F	50°C, pH 8,0-9,0	Nanopartículas PET	Danso et al., 2018
	Ple200, Ple201	Consórcio microbiano marinho	MF592405, DQ294206	30°C, pH 7,0	Adipato-co-tereftalato de polibutileno	Meyer-Cifuentes et al., 2020

Fonte: Kim et al., 2022.

## Mecanismo de degradação de PETase

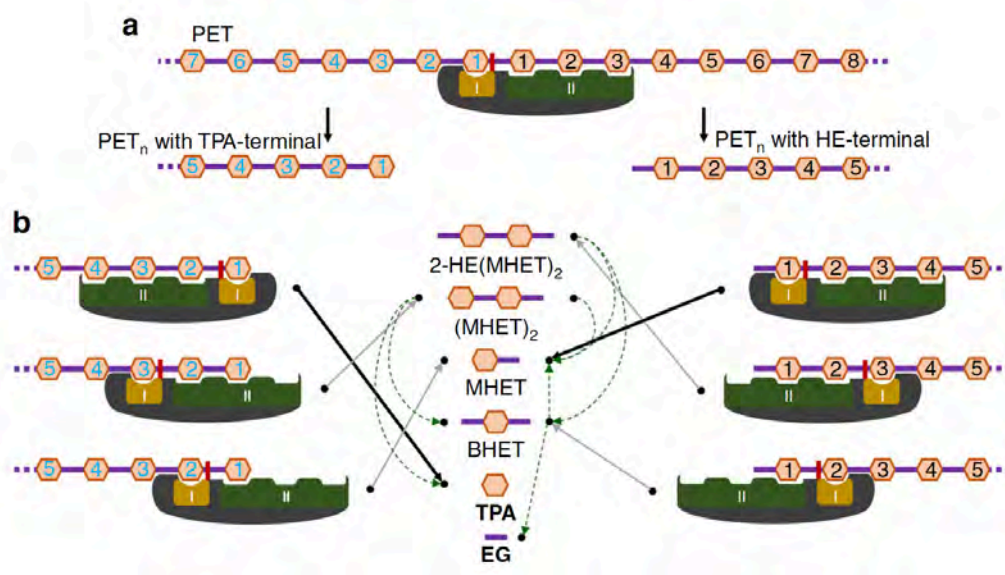
O mecanismo de degradação da IsPETase envolve uma série de etapas bem coordenadas que permitem a hidrólise do tereftalato de polietileno (PET) em monômeros menores e reutilizáveis (Figura 5). Os processos envolvidos são descritos detalhadamente abaixo:

1. **Colagem de substrato:** A isPETase se liga à superfície do PET usando sua superfície hidrofóbica que possui um sítio de ligação em forma de fenda. Esta fenda

é grande o suficiente para acomodar várias unidades de mono(2-hidroxietil) tereftalato (MHET), que são os produtos intermediários da degradação do PET.

2. **Formação do Complexo Enzima-Substrato:** Uma vez que o PET se liga à IsPETase, o resíduo Ser160 no sítio ativo da enzima atua como um nucleófilo que ataca o carbono carbonílico da ligação éster no PET, formando um intermediário acil-enzima.
3. **Hidrólise da Ligação Éster:** O intermediário acil-enzima é decomposto pela ação da tríade catalítica (Ser160, His237, Asp206), resultando na clivagem da ligação éster e na liberação de produtos intermediários, principalmente MHET.
4. **Lançamento do produto:** Produtos de degradação, incluindo MHET, ácido tereftálico (TPA) e etilenoglicol (EG), são liberados da enzima, permitindo que a IsPETase esteja disponível para outro ciclo catalítico.

Figura 5: a) Etapa de geração de entalhe. b) Etapa de digestão terminal.



Fonte: João, S. (2018).

Na etapa de geração de entalhe as porções TPA e EG do polímero PET são apresentadas com hexágonos laranja e linhas roxas, respectivamente. IsPETase é mostrado com um diagrama cinza escuro. Os subsites I e II da IsPETase são mostrados como diagramas laranja e verde e são rotulados como I e II, respectivamente. O resíduo catalítico Ser160 é mostrado como um retângulo vermelho. Polímeros PET<sub>n</sub> com terminais TPA e HE são rotulados. As porções de TPA destes polímeros PET<sub>n</sub> são rotuladas com os números 1, 2, 3, 4 e 5 de cada terminal. Na etapa de digestão terminal cada reação enzimática na etapa terminal da digestão é mostrada em um diagrama. Os produtos resultantes das reações enzimáticas estão indicados com setas pretas. As linhas pontilhadas verdes claras indicam os caminhos que os produtos poliméricos PET seguem para a próxima reação. São mostrados seis compostos relacionados ao PET: 2-HE(MHET)<sub>2</sub>, (MHET)<sub>2</sub>, MHET, TPA, BHET e EG, que são produtos resultantes da etapa terminal de digestão. Os produtos de degradação final (MHET, TPA e EG) estão rotulados em negrito.

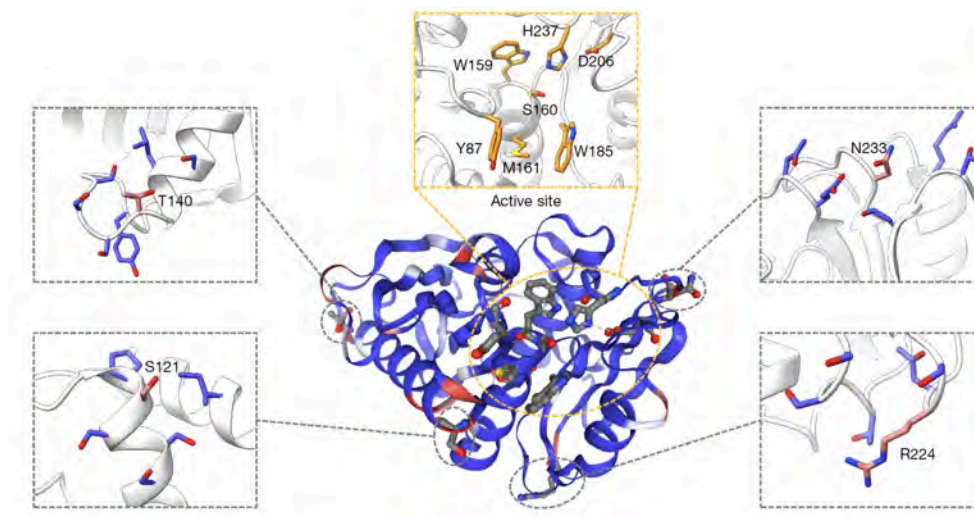
# FAST-PETase: uma inovação na degradação enzimática de PET

FAST-PETase (PETase Funcional, Ativa, Estável e Tolerante) é uma enzima projetada para melhorar a degradação do tereftalato de polietileno (Lu, H. 2022). Esta enzima foi desenvolvida utilizando técnicas avançadas de engenharia genética e aprendizado de máquina, uma espécie de algoritmo de inteligência artificial, com o objetivo de superar as limitações das hidrolases PET existentes em termos de estabilidade térmica, atividade catalítica e capacidade de decomposição de plásticos pós-consumo não tratados.

Para desenvolver o FAST-PETase, o algoritmo MutCompute, baseado em redes neurais convolucionais tridimensionais, foi utilizado para prever mutações que pudessem estabilizar a estrutura da PETase e melhorar sua atividade. Este algoritmo avalia os microambientes químicos locais dos aminoácidos e sugere alterações que podem aumentar a estabilidade térmica e a afinidade do substrato.

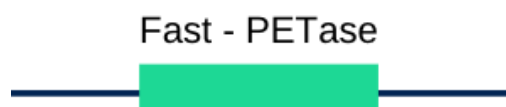
As principais mutações identificadas foram S121E, T140D, R224Q e N233K (Figura 6). Estas mutações foram selecionadas pela sua capacidade de melhorar a interação da enzima com o substrato PET e aumentar a estabilidade estrutural da enzima (Lu, H. 2022).

Figura 6: Mutações-chave. A estrutura da proteína WT PETase é apresentada usando a saída do MutCompute. A cada resíduo de aminoácido foi atribuída uma distribuição de probabilidade que reflete a congruência química (mostrada em vermelho para os desfavorecidos e em azul para os favorecidos) com microambientes químicos vizinhos. Microambientes locais próximos ao sítio ativo e os principais resíduos de aminoácidos desfavorecidos (S121, T140, R224, N233) são mostrados em painéis ampliados e destacados como bastões rosa. Os resíduos do sítio ativo são mostrados como bastões laranja.



Fonte: Lu, H. (2022).

Figura 7: Representação do gene “Fast PETase”, que faz parte do circuito genético desenhado neste trabalho.



Fonte: Autor

## Melhorias em sites ativos e estrutura

**Ser121Glu (S121E):** A mutação S121E introduziu um resíduo de glutamato em vez de serina na posição 121. Esta mudança permitiu a formação de uma rede de ligações de hidrogênio mediada por água com os resíduos His186 e Asn172. A presença destas ligações de hidrogênio adicionais estabiliza a conformação do sítio ativo, melhorando assim a afinidade da enzima pelo substrato e a sua atividade catalítica a temperaturas mais elevadas (Lu, H. 2022).

**Thr140Asp (T140D):** A substituição da treonina pelo aspartato na posição 140 (T140D) introduziu um resíduo carregado negativamente que estabiliza o sítio ativo através de interações eletrostáticas adicionais. Esta mutação também contribui para a estabilização da tríade catalítica, melhorando a eficiência da hidrólise da ligação éster no PET (Lu, H. 2022).

**Arg224Gln (R224Q):** A mutação R224Q substitui uma arginina por uma glutamina, resultando na formação de uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila do resíduo Ser192. Esta ligação de hidrogênio adicional estabiliza a conformação do sítio ativo e aumenta a afinidade da enzima pelos monômeros PET, melhorando a atividade catalítica geral (Lu, H. 2022).

**Asn233Lys (N233K):** A substituição da asparagina por lisina na posição 233 (N233K) resulta na formação de uma ponte salina com o resíduo Glu204. Esta ponte salina intramolecular é crucial para a estabilidade térmica da enzima, permitindo que a FAST-PETase mantenha a sua atividade a temperaturas mais elevadas do que a PETase original (Lu, H. 2022).

## Avaliação da atividade hidrolítica

Para avaliar a eficácia da FAST-PETase, foram realizados testes de atividade hidrolítica em diferentes temperaturas (30-60°C) utilizando produtos PET pós-consumo. Os resultados mostraram que a FAST-PETase tinha atividade significativamente maior em comparação com as variantes de PETase anteriormente conhecidas, ThermoPETase e DuraPETase.

Especificamente, a FAST-PETase mostrou um aumento de 38 vezes na atividade a 50°C, liberando monômeros PET 33,8 mM em 96 horas. Esta melhoria na atividade se deve a mutações que aumentam a estabilidade térmica e a interação com o substrato.

Tabela 2: Atividade Hidrolítica Comparativa de Variantes de PETase

variante	Principais mutações	Atividade a 50°C (mM de monômeros liberados)	Estabilidade Térmica
PETASA WT	-	0,9	Baixo
TermoPETase	Vários (por exemplo, T201S)	12.3	Moderado
DuraPETase	Vários (e.g., D186H)	8.4	Moderado
RÁPIDA-PETase	S121E, T140D, R224Q, N233K	33,8	Alto

Fonte: Autor

## Proteínas fusionadas: Linkers

Ao fundir diferentes domínios proteicos ou unir proteínas, podem ser criadas moléculas quiméricas com propriedades melhoradas ou novas funções. Os ligantes, sequências de aminoácidos que conectam domínios proteicos, desempenham um papel crucial nessas construções, proporcionando flexibilidade e estabilidade estrutural. Existem vários tipos de linkers, cada um com características específicas:

1. **Ligantes Flexíveis:** Geralmente compostos por glicina e serina, esses ligantes proporcionam flexibilidade entre os domínios proteicos, permitindo a liberdade de movimento necessária para a função enzimática.
2. **Linkers Rígidos:** Compostos por sequências repetitivas de alanina ou prolina, esses ligantes mantêm uma conformação mais fixa, o que pode ser benéfico para manter a proximidade e a orientação específica entre domínios.
3. **Ligantes Desintegráveis:** Contêm sequências específicas que podem ser reconhecidas e cortadas por proteases, permitindo a separação controlada dos domínios fundidos sob condições específicas.

Para melhorar a eficiência da despolimerização do PET, este trabalho de conclusão de curso propõe o desenvolvimento de proteínas quiméricas que fundem a PETase com outra enzima complementar, como a MHETase, utilizando um linker flexível. A fusão de PETase e MHETase poderia permitir um processo de despolimerização mais eficiente, uma vez que estas enzimas trabalham sinergicamente para converter PET nos seus monômeros constituintes.

Figura 8: Representação da proteína quimérica, utilizando Fast PETase, o ligante e MHETase, que faz parte do circuito genético desenhado neste trabalho.



Fonte: Autor

## Biologia Sintética e Projeto de Circuitos Biológicos

A biologia sintética (SynBio) é um campo interdisciplinar que combina princípios de biologia e engenharia para projetar e construir novas funções e sistemas biológicos. Através da manipulação genética e da implementação de circuitos genéticos sintéticos, a biologia sintética procura criar organismos com capacidades novas ou melhoradas. As aplicações da biologia sintética incluem a produção de biocombustíveis, o desenvolvimento de novos medicamentos, a criação de biossensores e a biorremediação de ambientes contaminados.

Uma das principais ferramentas da biologia sintética é a automação do projeto genético, que permite aos cientistas projetar, modelar e analisar circuitos genéticos *in silico* antes de construí-los em laboratório. Esta metodologia economiza tempo e recursos e abre o campo para uma comunidade interdisciplinar mais ampla (Buecherl & Myers, 2022).

Nesse sentido, o desenho de circuitos biológicos envolve a criação de redes de genes que desempenham funções específicas dentro de uma célula. Esses circuitos podem operar no nível transcricional, controlando a expressão gênica, ou no nível pós-transcricional, usando interações metabólicas ou proteicas (SLUSARCZYK; LIN; WEISS, 2012)..

Um circuito genético é uma sequência de DNA projetada que regula a atividade de genes dentro de uma célula, de maneira similar a um circuito eletrônico que controla o fluxo de corrente elétrica. Ele é composto por várias "partes biológicas" que interagem entre si para realizar uma função específica. Assim como em um circuito eletrônico, onde resistores, capacitores e transistores são combinados para realizar tarefas como amplificação ou interrupção de sinais, um circuito genético combina elementos como promotores, operadores, genes codificadores e terminadores para controlar a expressão gênica e o comportamento celular (SLUSARCZYK; LIN; WEISS, 2012).

Esses circuitos podem ser programados para responder a estímulos ambientais, ativar ou desativar genes, e até produzir moléculas de interesse como proteínas ou metabólitos. No nível transcricional, o circuito controla quando e onde os genes são ativados ou desativados, enquanto no nível pós-transcricional, ele pode modular a estabilidade do RNA mensageiro ou a eficiência da tradução de proteínas. Assim, o design de circuitos genéticos em biologia sintética é uma forma poderosa de programar o comportamento celular para resolver problemas específicos, desde a degradação de plásticos até a produção de substâncias terapêuticas (SLUSARCZYK; LIN; WEISS, 2012)..

O projeto de circuitos genéticos em biologia sintética baseia-se no uso de várias partes biológicas que são montadas para criar sistemas funcionais dentro das células. Essas

partes biológicas são essenciais para a construção de circuitos que podem realizar tarefas específicas, como regulação da expressão gênica, sinalização celular e produção de metabólitos. Abaixo estão algumas das partes biológicas mais comuns usadas no projeto de circuitos genéticos (SLUSARCZYK; LIN; WEISS, 2012)..

## Promotores

Promotores são sequências de DNA que iniciam a transcrição de um gene. São cruciais para o controle da expressão genética, pois determinam quando e onde um gene é ativado. Existem diferentes tipos de promotores:

1. **Promotores Constitutivos:** Esses promotores estão continuamente ativos, resultando em expressão genética constante. Eles são úteis quando é necessária a produção sustentada de uma proteína específica.
2. **Promotores Indutíveis:** Esses promotores podem ser ativados ou reprimidos em resposta a estímulos específicos, como a presença de um indutor químico. Eles permitem o controle preciso da expressão genética em resposta a mudanças ambientais .

## Operadores

Operadores são sequências de DNA às quais proteínas repressoras ou ativadoras se ligam para regular a transcrição. Os operadores trabalham em conjunto com os promotores para controlar a expressão de genes específicos. Por exemplo, no sistema operon lac, o operador lacO liga-se à proteína repressora LacI para inibir a transcrição na ausência de lactose.

## RBS (locais de ligação ao ribossomo)

Os locais de ligação ao ribossomo (RBS) são sequências de RNA que facilitam o início da tradução através do recrutamento de ribossomos. A eficiência de um RBS determina a quantidade de proteína produzida a partir de um mRNA transcrito. RBS forte pode aumentar a produção de proteínas, enquanto RBS fraco pode reduzi-la.

## Codificando Genes

Genes codificadores são sequências de DNA que codificam proteínas funcionais ou RNAs. No projeto de circuitos genéticos, os genes codificadores podem incluir:

1. **Genes Repórteres:** Esses genes codificam proteínas facilmente detectáveis, como a proteína vermelha (mCherry). Eles são usados para monitorar a atividade dos circuitos genéticos.
2. **Genes Funcionais:** Esses genes codificam proteínas que desempenham funções específicas dentro da célula, como enzimas metabólicas como Fast-PETase, proteínas estruturais ou fatores de transcrição.

## Terminadores

Terminadores são sequências de DNA que sinalizam o fim da transcrição. Eles garantem que a RNA polimerase pare no local correto, evitando a transcrição de sequências indesejadas. Terminadores eficientes são essenciais para a precisão e eficiência dos circuitos genéticos.

## Syn Fronteiras e Mhetyguá

Syn Fronteras é uma equipe de pesquisa em biologia sintética formada por estudantes da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) que conseguiu se estabelecer como referência na região da Tríplice Fronteira, que inclui Brasil, Argentina e Paraguai. Fundada em 2020, a Syn Fronteras nasceu com o propósito de promover a biologia sintética nesta região, envolvendo estudantes de diversas disciplinas e nacionalidades latino-americanas. Ao longo da sua existência, a equipe desenvolveu projetos inovadores que não só ganharam reconhecimento internacional, como também tiveram impacto direto na comunidade local.

A importância do Syn Fronteras reside na sua capacidade de integrar o conhecimento científico com a solução de problemas ambientais e de saúde pública, ao mesmo tempo que promove a educação e a sensibilização em biologia sintética. Em 2021, a equipe se destacou ao obter a medalha de ouro na competição internacional iGEM (International Genetically Engineered Machine), organizada pelo Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT), com o projeto BioPank, tornando-se a primeira e única vez que uma equipe do Sul do Brasil alcançou tal distinção.

O projeto BioPank teve como foco o problema da leishmaniose visceral, zoonose que atinge tanto animais quanto humanos na região de Foz do Iguaçu, considerada endêmica para esta doença. Com o objetivo de combater a leishmaniose visceral, a BioPank propôs o desenho e construção de uma bactéria geneticamente modificada capaz de interromper a transmissão do parasita dentro do seu vetor, o mosquito palha (*Lutzomyia longipalpis*), utilizando a técnica de paratransgênese. O BioPank lançou as bases para projetos futuros, gerando valiosos recursos genéticos e metodológicos. Esses recursos têm sido fundamentais para a continuidade das pesquisas posteriores da equipe Syn Fronteras, inclusive deste TCC, demonstrando a importância de preservar e reaproveitar os avanços alcançados.

Por outro lado, o projeto Mhetyguá representa um novo desafio assumido pela Syn Fronteras em 2022, que visa a degradação de plásticos em massas de água através da utilização de microalgas geneticamente modificadas. Este projeto teve como foco a engenharia de *Chlamydomonas reinhardtii* para expressar as enzimas PETase e MHETase, responsáveis pela degradação do tereftalato de polietileno (PET), um plástico amplamente utilizado e difícil de degradar naturalmente. O objetivo final de Mhetyguá é avaliar a viabilidade do uso dessas microalgas modificadas em lagoas de estabilização de estações de tratamento de águas residuais, como estratégia para mitigar a poluição por microplásticos.

Este Projeto de Conclusão de Curso (TCC) desempenha um papel crucial na conexão entre esses dois importantes projetos desenvolvidos pela Syn Fronteras: BioPank e Mhetyguá. A ligação se manifesta através da utilização do circuito de expressão originalmente desenhado para o projeto BioPank, que foi reaproveitado e adaptado para a expressão da enzima chave do projeto Mhetyguá, a Fast-PETase. Esta reutilização não só otimiza a utilização dos recursos já disponíveis, mas também sublinha a importância de manter a continuidade dos projetos de investigação.

# Objetivos

## Objetivo geral

- Projetar e montar circuitos genéticos em *Escherichia coli* para a produção de enzimas degradadoras de PET.

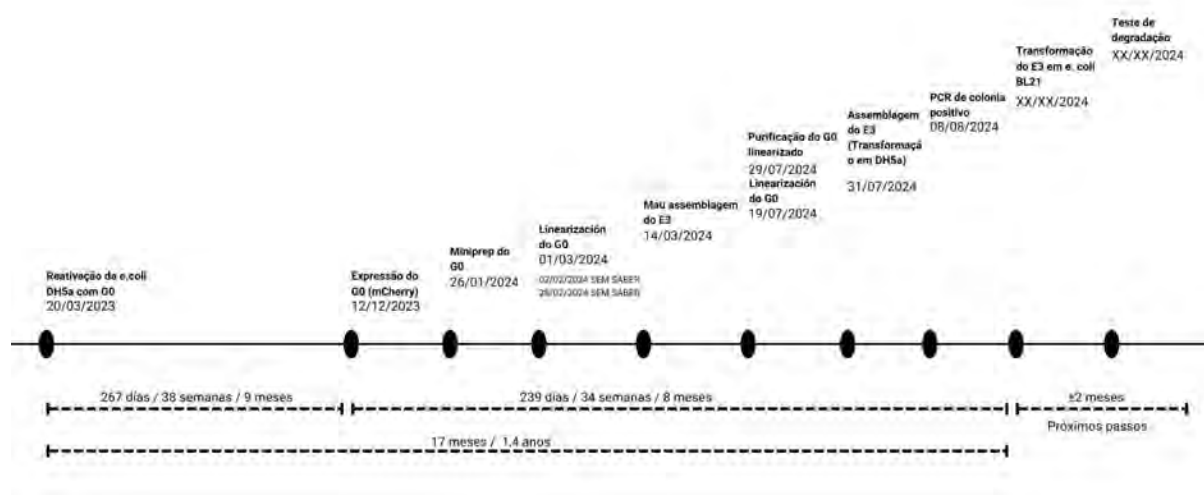
## Objetivos específicos

- Projetar e sintetizar primers específicos para a reutilização de plasmídeos existentes como base para a expressão de enzimas que degradam PET.
- Projetar e montar plasmídeos recombinantes contendo o gene Fast-PETase e MHETase.
- Transformar *Escherichia coli* com os plasmídeos construídos e selecionar colônias bem-sucedidas através da expressão de marcadores seletivos.
- Induzir a expressão de enzimas degradadoras de PET em *Escherichia coli* BL21 utilizando IPTG.
- Realizar testes de atividade enzimática em placas com policaprolactona, como validação do conceito relacionado à degradação do PET pelas enzimas selecionadas.
- Propor melhorias nos projetos de circuitos experimentais e genéticos para aumentar a eficiência de montagem, produção e secreção de enzimas degradadoras de PET em *Escherichia coli* e outros organismos modelo.
- Reutilizar recursos biológicos como G-Blocks e primers do projeto BioPank e Mhetyguá, garantindo que as partes biológicas existentes sejam efetivamente integradas em novos designs de circuitos genéticos.
- Utilizar este Trabalho de Conclusão de Curso como instrumento para manter ativos os projetos BioPank e Mhetyguá, documentando e sistematizando os avanços e resultados obtidos para garantir a continuidade e o desenvolvimento desses projetos.
- Fortalecer o ecossistema de biologia sintética da UNILA, promovendo o desenvolvimento de pesquisas relacionadas a esta área.

# Metodologia

Os pontos-chave do processo experimental (Figura 9) mostram os trabalhos realizados no laboratório para a construção e validação de circuitos genéticos destinados à degradação de plásticos. A linha do tempo destaca eventos importantes, como a reativação de células *E. coli* DH5α com o plasmídeo G0 em 20 de março de 2023, seguida por etapas cruciais como a expressão de *mCherry* em dezembro de 2023 e a miniprep realizada em janeiro de 2024. Posteriormente, são incluídos marcos importantes, como a linearização bem-sucedida do plasmídeo G0 em março e julho de 2024, bem como a montagem do circuito E3 em 31 de julho de 2024 e a validação por meio de PCR de colônia em agosto do mesmo ano. Além disso, são projetados passos futuros, como a transformação em *E. coli* BL21 e a avaliação da atividade enzimática por meio de testes de degradação de plásticos.

Figura 9: fluxograma dos experimentos laboratoriais



Fonte: Autor

É importante destacar que a figura x reflete apenas os processos experimentais realizados no laboratório. Não inclui as etapas *in silico* ou as análises computacionais, que também foram fundamentais ao longo de todo o período experimental. Isso ressalta o foco prático e as técnicas biológicas empregadas no desenvolvimento deste trabalho, evidenciando os tempos envolvidos e os marcos principais alcançados.

## Seleção de chassi

O chassi, definido como o organismo hospedeiro que abriga os componentes genéticos sintéticos, é essencial para garantir a funcionalidade do circuito genético. O chassi deve ser selecionado e otimizado para manter a estabilidade genética dos componentes inseridos, garantir a compatibilidade metabólica, adaptar-se a condições ambientais específicas e ser fácil de manipular geneticamente. (De Lorenzo, V. et al., 2020).

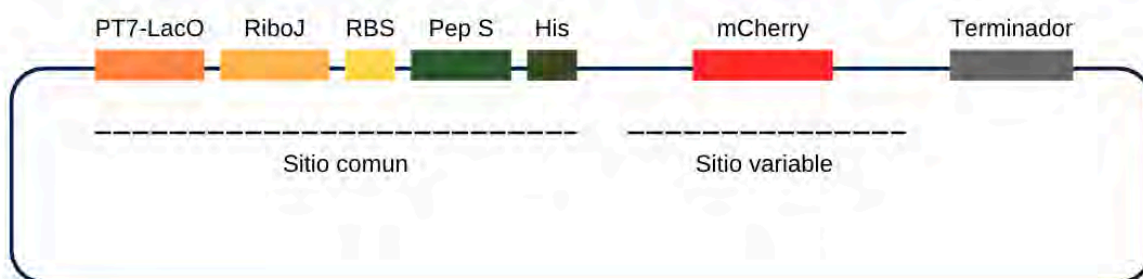
Neste trabalho selecionamos *Escherichia coli* (*E. coli*) como chassi principal devido às suas inúmeras vantagens. *E. coli* É um organismo de fácil cultivo e que cresce rapidamente em meios de cultura simples, permitindo a realização de experimentos de forma eficiente e econômica. Além disso, há uma grande variedade de ferramentas genéticas disponíveis para *E. coli*, incluindo vetores de expressão, sistemas de regulação genética e métodos de transformação eficientes. A biologia e a genética *E. coli* são bem caracterizados, facilitando o projeto e otimização de circuitos genéticos complexos. (Adams, BL et al., 2016).

## Projeto in-silico do circuito genético

### Sobre as construções genéticas do projeto BioPank

O circuito genético G0 (Figura 8) foi desenhado durante o projeto BioPank, tem a função de ser um circuito base para servir de modelo para outros circuitos, construído de forma que sejam mantidas as seguintes partes: promotor, RiboJ, peptídeo sinal RBS. Desta forma, o gene que codifica mCherry pode ser removido e outros genes de interesse podem ser colocados. No caso do projeto BioPank, foram colocados diferentes peptídeos antimicrobianos no lugar do mCherry, tendo assim um circuito modular.

Figura 11: Esquema do cassete de expressão mCherry do projeto BioPank



Fonte: Autor

O cassete de expressão mCherry do projeto BioPank é composto por:

**Promotor pT7 - LacO:** Como o projeto BioPank era uma prova de conceito e não a versão final do dispositivo, optou-se pela utilização do promotor PT7-LacO. Este promotor é conhecido por sua alta eficiência, é bem caracterizado e é induzível por IPTG (isopropil beta-D-1-tiogalactopiranosídeo).

**RiboJ:** RiboJ é uma ribozima que atua como isolante genético em sistemas bacterianos para a construção de circuitos genéticos sintéticos. Sua principal função é reduzir a dependência do contexto, evitando interações indesejadas entre partes genéticas adjacentes. Isto melhora a modularidade e a previsibilidade dos circuitos genéticos, tornando o comportamento de cada componente mais previsível e independente do

ambiente. Os pesquisadores estudaram o impacto do isolamento com RiboJ na expressão de um gene repórter controlado por diferentes promotores constitutivos em *Escherichia coli*, demonstrando que, dependendo da força do promotor, o isolamento com RiboJ pode aumentar significativamente a quantidade de proteínas e transcritos (Clifton et al., 2018).

**RBS:** O sítio de ligação ao ribossomo B0034 (RBS) é extensivamente caracterizado e tem um extenso histórico de uso no Registro de Partes Biológicas Padrão.

**Pep S:** O peptídeo sinal OmpA foi selecionado por sua funcionalidade em ambos *E. coli* como em *B. subtilis*, permitindo que os testes de expressão iniciais sejam realizados em *E. coli* antes de aplicar a estratégia final em *B. subtilis* (Pechsrichuang et al., 2016).

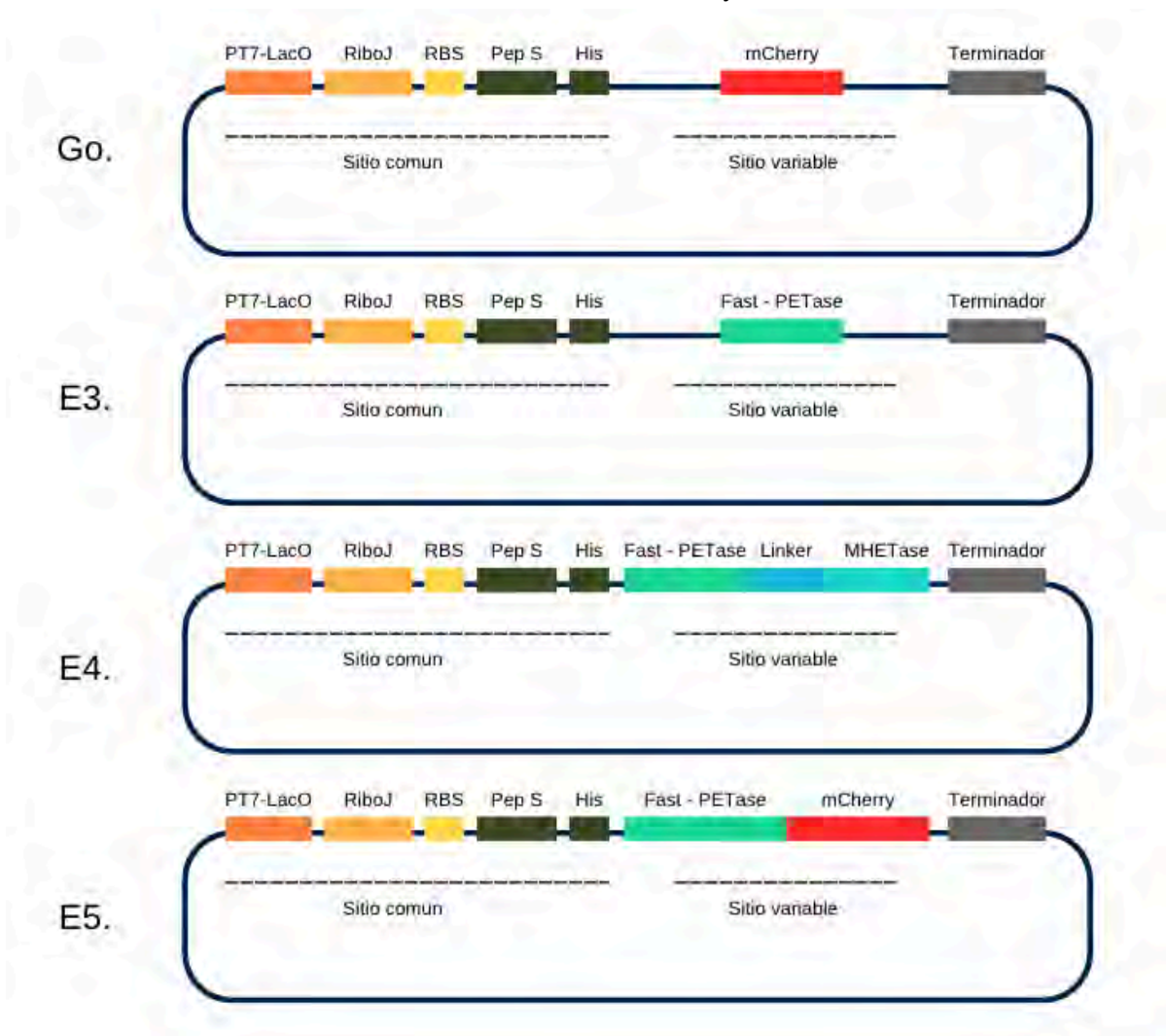
**Tag para purificação:** O marcador de polihistidina (His-Tag) é uma sequência de aminoácidos contendo histidina que é adicionada a uma proteína para facilitar sua purificação. A histidina tem afinidade específica por íons de níquel, e His-Tags são adicionados às sequências de proteínas para permitir seu isolamento e purificação usando resinas de níquel (Roshanak et al., 2023).

**mCherry:** mCherry é uma proteína vermelha fluorescente amplamente utilizada como marcador genético em estudos de biologia molecular. No contexto do projeto BioPank, o mCherry foi incluído como gene repórter para visualizar e confirmar a expressão dos circuitos genéticos projetados. A inclusão do mCherry foi essencial para validar experimentalmente os ensaios de expressão e garantir que o desenho do circuito funcionasse corretamente no ambiente biológico escolhido.

**Terminador:** Por fim, o terminador selecionado foi o terminador duplo B0015, que é bem caracterizado e amplamente utilizado na construção de circuitos genéticos.



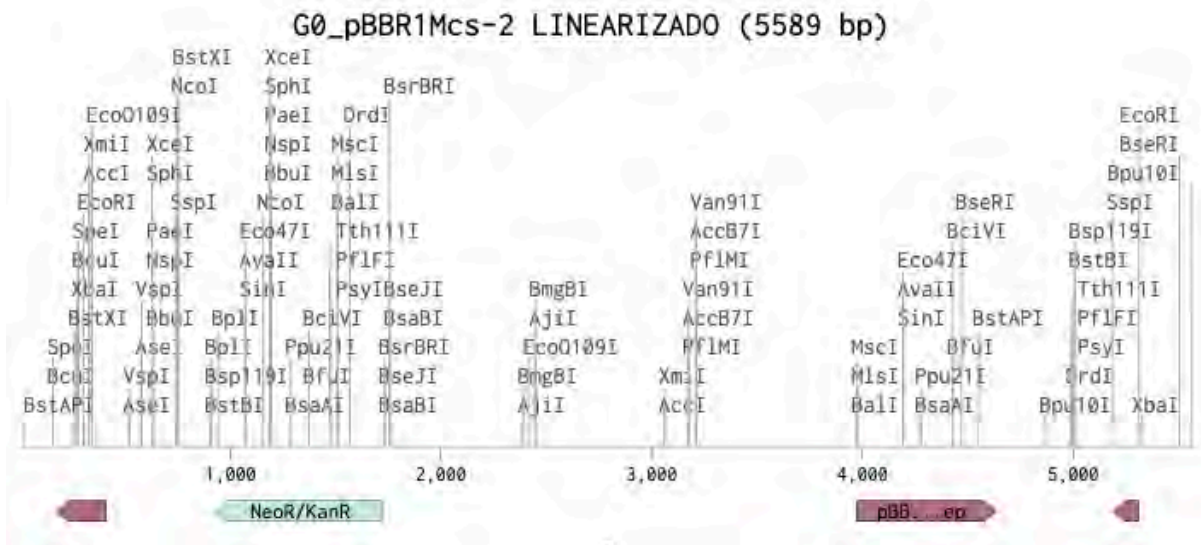
Figura 13: Circuitos genéticos desenhados para este projeto. G0 o cassete de expressão mais mCherry. E3 o cassete de expressão mais rápido da Petasa. E4 o cassete de expressão mais Fast-Petase, ligante e MHETase. E5 o cassete de expressão mais Fast-PETase e mCherry.



Fonte: Autor

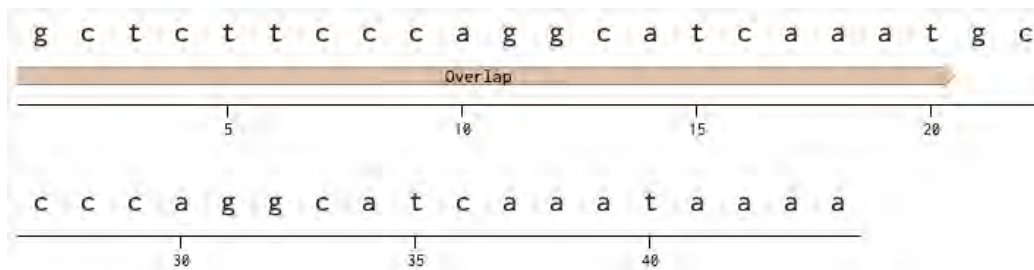
Para todas as construções foi utilizado o plasmídeo [G0\\_mCherry\\_pBBR1Mcs-2](#). Para isso, primeiramente é linearizado, obtendo-se o plasmídeo [G0\\_pBBR1Mcs-2 LINEARIZADO](#) sem o gene mCherry.

Figura 14: [G0\\_pBBR1Mcs-2 LINEARIZADO](#)



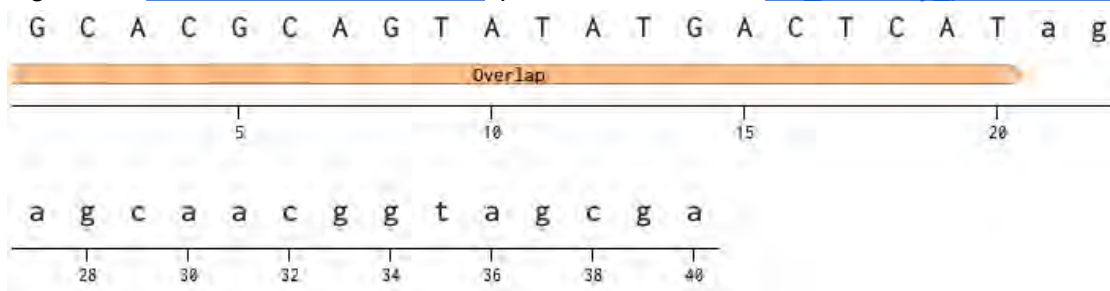
Fonte: Autor

Figura 15: [E3. G0+F-PETase FWD](#), primeiro a linearizar [G0\\_mCherry\\_pBBR1Mcs-2](#)



Fonte: Autor

Figura 16: [E345. G0+F-PETase REV](#), primeiro a linearizar [G0\\_mCherry\\_pBBR1Mcs-2](#)



Fonte: Autor

Para garantir que as construções genéticas projetadas fossem viáveis antes de realizar os experimentos no laboratório, foi necessário validar cada uma delas utilizando ferramentas in-silico. Essas validações computacionais permitiram verificar a correta linearização dos plasmídeos e a funcionalidade dos primers projetados, além de antecipar possíveis dificuldades experimentais. A seguir, detalho o processo de validação in-silico das construções genéticas.

## Validação de Primer usando a ferramenta OligoAnalyzer™

Para garantir a eficiência e especificidade dos primers desenhados para a amplificação de sequências específicas de DNA, foi utilizada a ferramenta OligoAnalyzer™. Este software permite analisar diversas propriedades dos oligonucleotídeos, fornecendo uma avaliação detalhada de sua adequação para reações de PCR.

### Procedimento

Inicialmente, as sequências de primers foram inseridas na interface OligoAnalyzer™. A ferramenta foi utilizada para avaliar diversos parâmetros críticos, como:

- **Temperatura de Melting (T<sub>m</sub>):** A T<sub>m</sub> de cada primer foi determinada, garantindo que as temperaturas de fusão dos primers direto e reverso fossem compatíveis, idealmente dentro de uma faixa de 2-5°C.
- **Formação de Dímeros e Estruturas Secundárias:** Foi examinada a possibilidade de formação de dímeros de primers (intermoleculares) e hairpins (estruturas intramoleculares), uma vez que estes podem interferir na eficiência da PCR.
- **Conteúdo do GC:** A porcentagem de bases guanina e citosina (conteúdo de GC) foi avaliada, garantindo que estava dentro da faixa ideal (40-60%) para garantir ligação específica e estável ao modelo de DNA.
- **Autocomplementaridade:** Foi analisada a tendência dos primers em formar estruturas autocomplementares, o que pode reduzir a eficiência da amplificação.

## Validação de Primer usando NEBuilder® Assembly Tool

Para garantir que os primers projetados gerarão sobreposições adequadas para posterior montagem do plasmídeo, foi utilizado o software NEBuilder® Assembly Tool. Esta ferramenta permite simular o processo de montagem do DNA in silico, proporcionando uma verificação crítica antes de realizar os experimentos em laboratório.

As sequências dos fragmentos de DNA e os primers desenhados foram inseridos na interface NEBuilder® Assembly Tool. O software realiza uma simulação da montagem dos fragmentos de DNA com base nos princípios da clonagem por recombinação homóloga. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

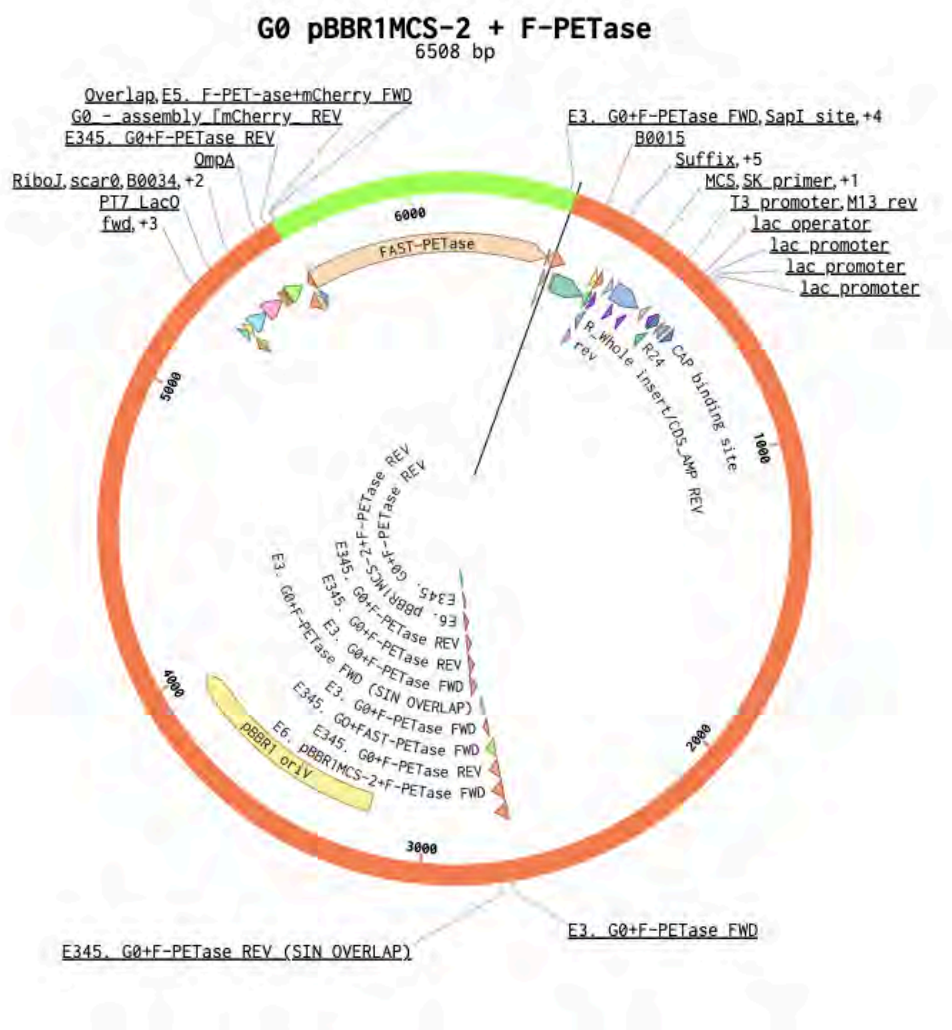
- **Comprimento da sobreposição:** Verificou-se que as sobreposições geradas pelos primers foram de 20 pares de bases.
- **Compatibilidade de sequência:** A compatibilidade das sequências sobrepostas foi analisada, garantindo que as bases eram complementares e permitiam hibridização específica.
- **Eficiência de montagem:** O software forneceu uma estimativa da eficiência da montagem, com base na qualidade e comprimento das sobreposições geradas.

# Construções genéticas

## Construção 1

O gene foi usado [E3 RÁPIDO-PETase](#) para inserir em [G0 pBBR1Mcs-2 LINEARIZADO](#) dando como resultado [G0 pBBR1MCS-2 + F-PETase](#)

Figura 17: [G0 pBBR1MCS-2 + F-PETase](#)



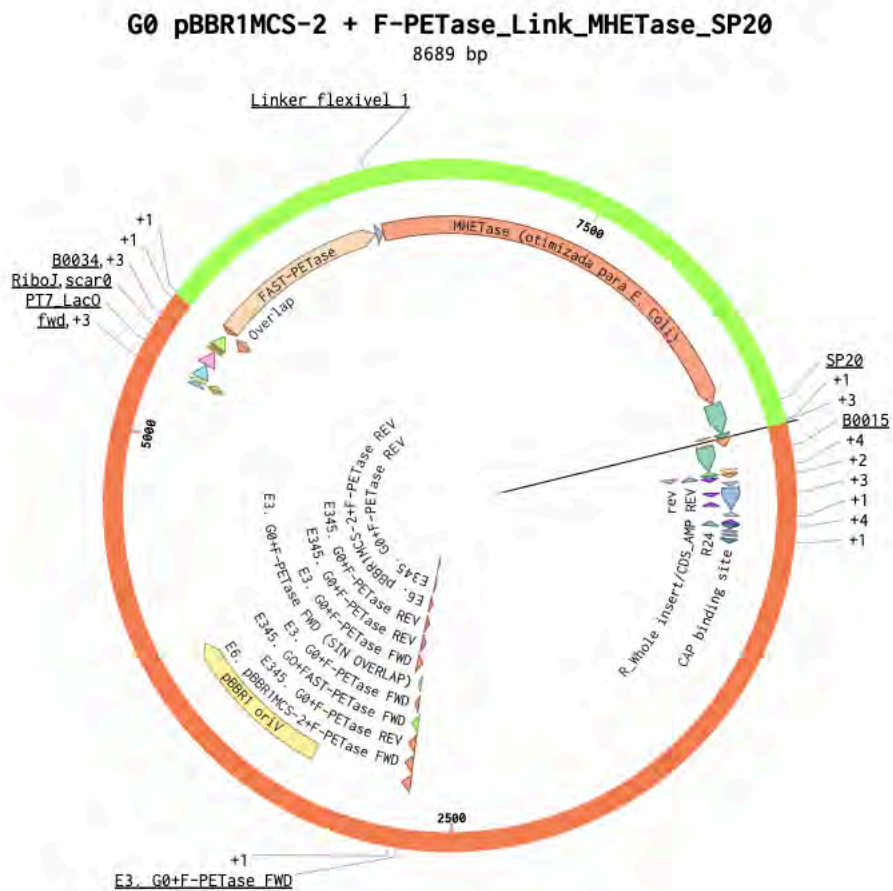
Fonte: Autor

## Construção 2

O circuito foi usado [E4.FAST-PETase\\_Linker\\_MHETase\\_sp20](#) que contém [E3 RÁPIDO-PETase](#), linker, MHETase e sp20, para inserir em [G0\\_pBBR1Mcs-2 LINEARIZADO](#) dando como resultado [G0 pBBR1MCS-2 + F-PETase\\_Link\\_MHETase\\_SP20](#). Esta é a maior construção em número de pares de bases, para ordenar a síntese ela teve que ser separada em três gBlocks

- [E41 FAST-PETase\\_Linker\\_MHETase](#)
- [E42 FAST-PETase\\_Linker\\_MHETase](#)
- [E43.FAST-PETase\\_Linker\\_MHETase\\_SP20](#)

Figura 18: [G0 pBBR1MCS-2 + F-PETase\\_Link\\_MHETase\\_SP20](#)



Fonte: Autor



## Experimentos de laboratório

Esta seção detalha os experimentos laboratoriais realizados durante o desenvolvimento deste projeto de conclusão de curso. Esses experimentos foram realizados com o objetivo de construir e avaliar circuitos genéticos utilizando técnicas de biologia molecular e ferramentas de biologia sintética. A seleção e preparação de soluções, meios de cultura, bem como a manipulação e transformação de *Escherichia coli* com os plasmídeos desenhados, constituíram a base experimental para a validação das construções genéticas propostas. Detalhes experimentais específicos, incluindo procedimentos passo a passo e condições exatas utilizadas em cada experimento, podem ser encontrados na seção “Anexos”, onde são apresentados os Protocolos Operacionais Padrão (POPs).

### **Preparação de soluções estoque para atividades de biologia molecular**

Para começar, foram preparadas diversas soluções estoque essenciais para atividades de biologia molecular, como Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, TE 10X e 1X, TBE 10X e 0,5X, Carregamento de corante e sacarose 1 M (POP 00).

### **Preparação do meio de cultura LB (Luria Bertani)**

O meio de cultura LB, tanto na forma líquida como sólida, foi preparado seguindo procedimentos padrão (POP 01). O meio sólido incluía ágar e foi esterilizado em autoclave. Caso fosse necessário adicionar antibióticos, eles eram incorporados após o meio ter esfriado a uma temperatura que permitia o manuseio sem risco de decomposição do antibiótico.

### **Reativação de *Escherichia coli* como plasmídeo G0 de facadas ou culturas preservadas**

A reativação de *E. coli* foi feita a partir de culturas conservadas em glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O procedimento incluiu a transferência de uma pequena quantidade de cultura para meio líquido e sua incubação durante a noite a  $37^{\circ}\text{C}$  e 250 RPM para aumentar a concentração de oxigênio no cultivo. Posteriormente, foram feitas estrias em placas de Petri para obtenção de culturas isoladas (POP 02).

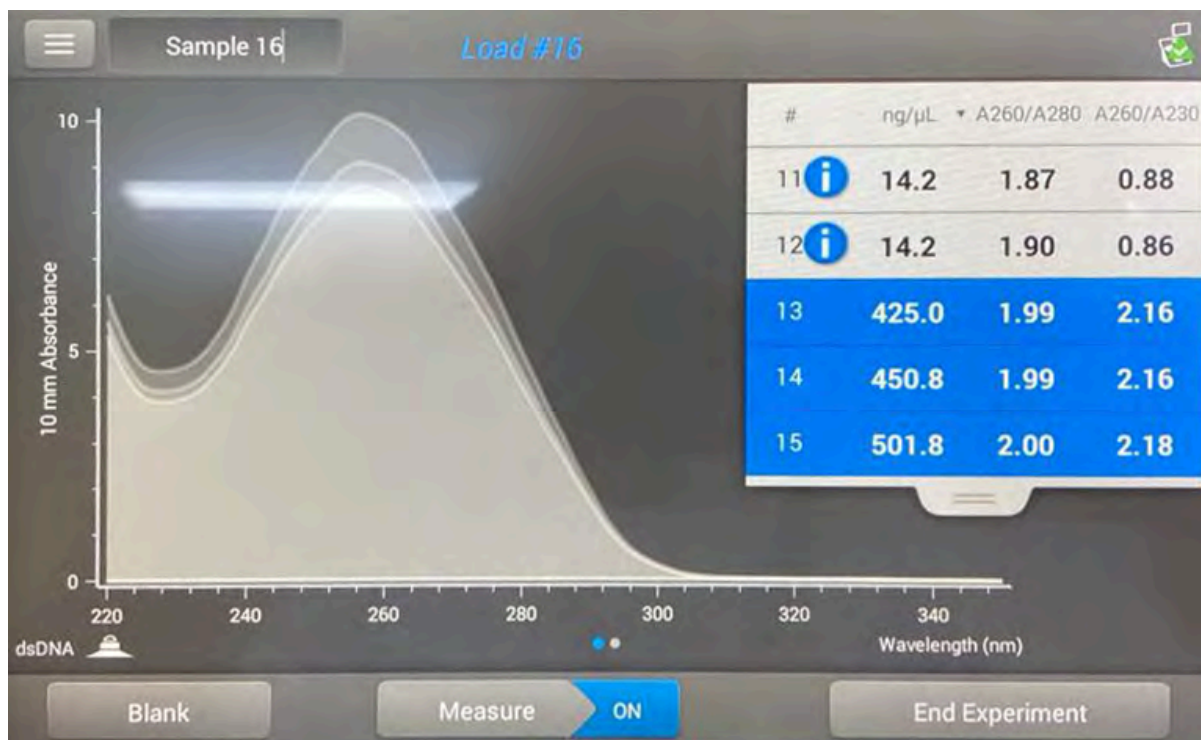
### **Preparação de soluções para extração de plasmídeos utilizando Miniprep Alkaline Lysis**

Para extração de plasmídeo foram preparadas soluções de GTE (glicose, Tris-HCl, EDTA), NaOH/SDS e acetato de sódio. Estas soluções foram utilizadas para lise celular, precipitação de proteínas e recuperação de DNA plasmídico por centrifugação (POP 03).

### **Extração de Plasmídeo por Lise Alcalina Miniprep**

A extração de plasmídeo foi realizada utilizando o protocolo de minipreparação de lise alcalina. 5ml de *E. coli* em meio LB e as células foram lisadas utilizando as soluções previamente preparadas. O DNA plasmídico foi precipitado com etanol absoluto e ressuspenso em tampão TE para posterior leitura (POP 04).

Figura 20: Resultado da extração no nanodrop, com o plasmídeo G0. A leitura foi feita em triplicata. Sendo elas as leituras 13, 14 e 15.



Fonte: Autor

Razões de Pureza: A260/A280: é um indicador da pureza da amostra de DNA ou RNA. Uma proporção de aproximadamente 1,8 é considerada pura para o DNA, enquanto uma proporção de aproximadamente 2,0 é considerada pura para o RNA. 260/A230: é outro indicador de pureza, principalmente em termos de contaminantes orgânicos e sais. Uma proporção de aproximadamente 2,0-2,2 é ideal.

### Linearização do plasmídeo G0 usando o kit Q5 High-Fidelity 2X Master Mix

O plasmídeo G0 foi linearizado usando o kit Q5 High-Fidelity 2X Master Mix. O procedimento incluiu a preparação de uma mistura reacional com primers específicos e o plasmídeo G0, seguida de PCR. Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose (POP 06).

Tabela 3: Configuração do termociclador para linearização do plasmídeo G0.

Etapa		Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial		98°C	5 minutos
Desnaturação	30 ciclos	98°C	10 segundos

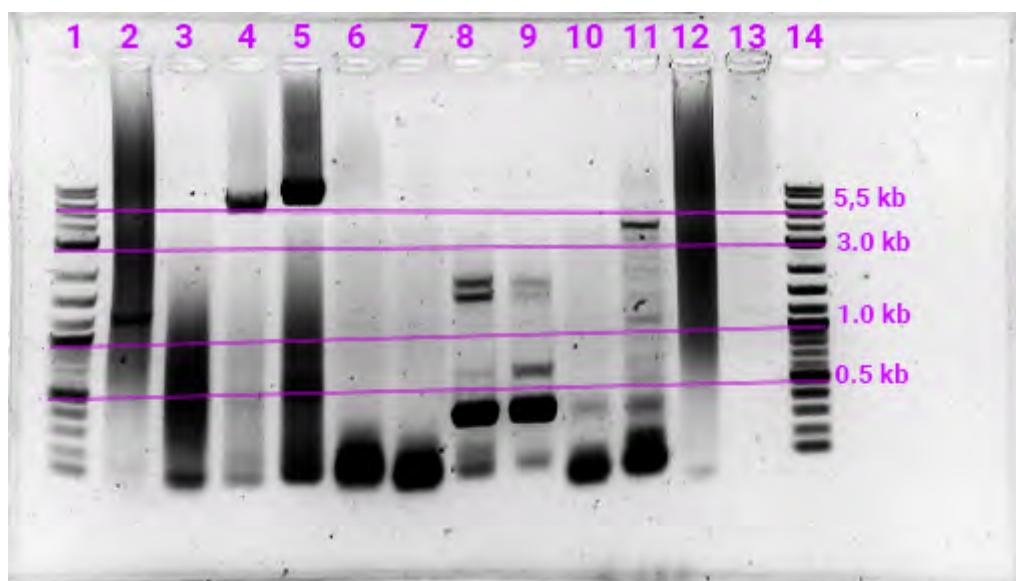
toque		65°C	30 segundos
Extensão		72°C	3 minutos
Extensão final		72°C	10 minutos
Final		4°C	∞

Fonte: Autor

### Eletroforese em Gel de Agarose

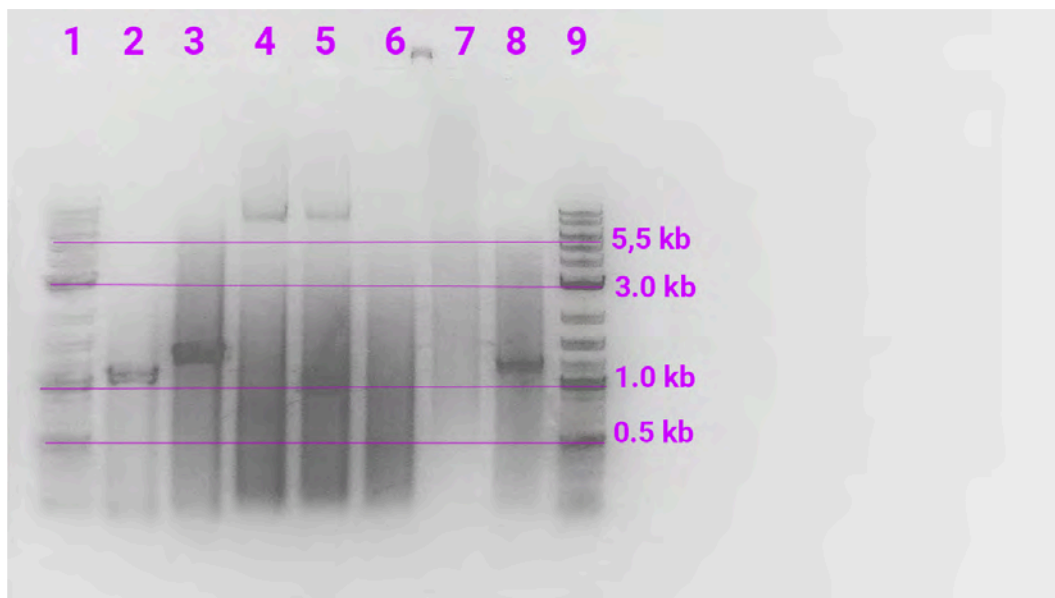
Eletroforese em gel de agarose foi utilizada para analisar os produtos de PCR. Um gel de agarose a 1,2% foi preparado com 0,5X TBE e as amostras foram carregadas juntamente com um marcador de DNA. A corrida foi realizada a 50V por 20-30 minutos e os resultados foram visualizados sob luz UV (POP 07).

Figura 21: Resultado da execução da eletroforese. Observando nas linhas 4 e 5 o plasmídeo G0 linearizou na altura de 5589 pb. Para melhor visualização a foto foi convertida em negativo com Photoshop.



Fonte: Autor

Figura 22: Resultado da execução da eletroforese. Observando nas linhas 4 e 5 o plasmídeo G0 linearizou em uma altura superior a 5589 pb, embora não seja tão preciso quanto o anterior, porém deu certa confiabilidade. Para melhor visualização a foto foi convertida em negativo com Photoshop.

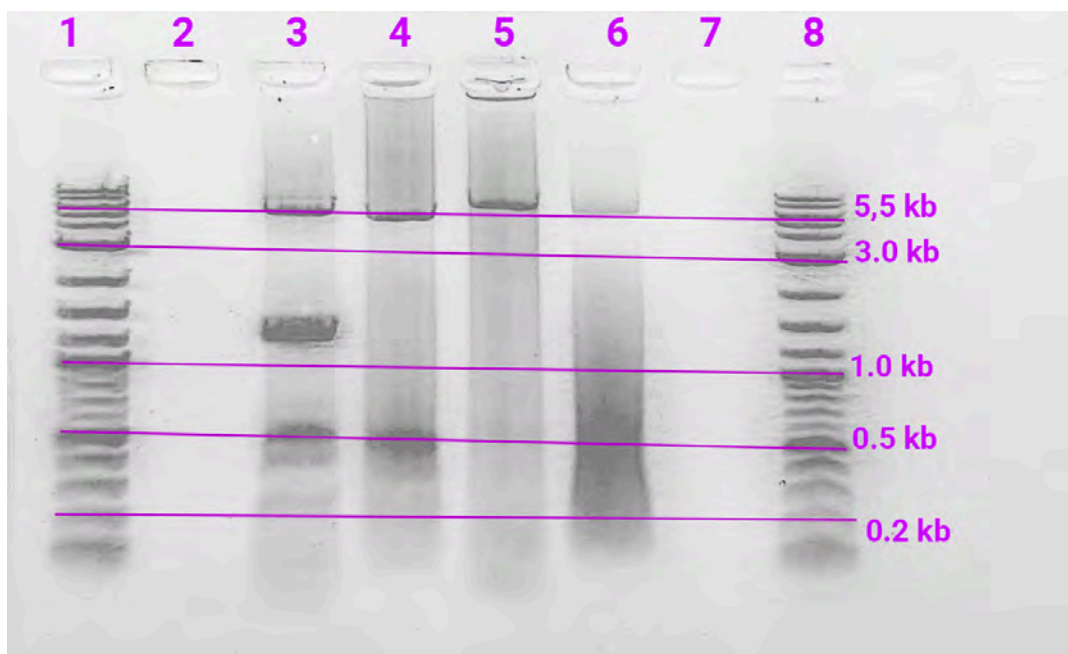


Fonte: Autor

### **Extração de plasmídeo linearizado em Gel usando o Monarch® DNA Gel Extraction Kit**

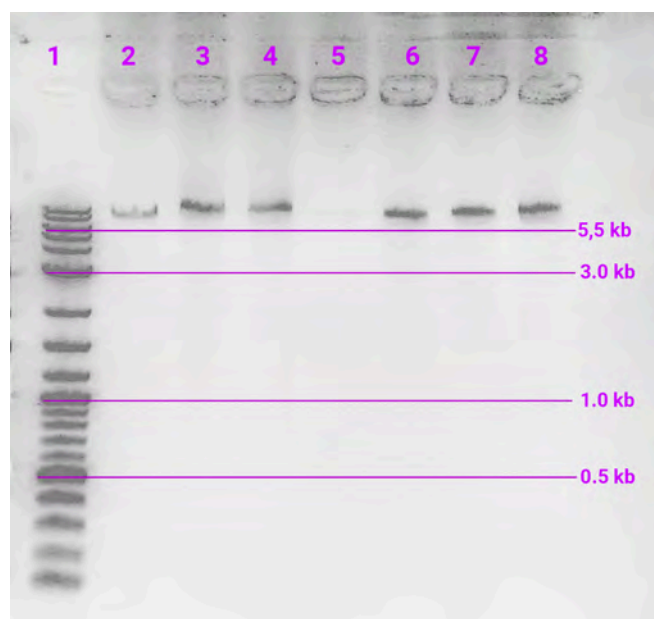
A extração de DNA de fragmentos de gel de agarose foi realizada utilizando o Monarch® DNA Gel Extraction Kit (NEB) para purificar o DNA após eletroforese. O procedimento consistiu em cortar cuidadosamente o fragmento de DNA desejado do gel de agarose e dissolvê-lo em tampão de dissolução específico. A mistura foi incubada a 50°C até o gel estar completamente dissolvido. O DNA dissolvido foi então carregado em uma coluna giratória, onde se ligou à matriz da coluna. Após duas lavagens com tampão de lavagem de ADN, o ADN purificado foi eluído com tampão de eluição aquecido a 50°C para melhorar o rendimento. O DNA purificado foi coletado em um volume mínimo para garantir alta concentração e armazenado a -20°C para uso posterior (POP 17).

Figura 23: Resultado da corrida de eletroforese dos produtos de PCR (G0 linearizado) antes da extração do gel. Observando nas linhas 3, 4, 5 e 6 o plasmídeo G0 linearizou na altura de 5589 pb. Com presença de manchas luminosas na altura de  $\pm 200$  pb correspondendo principalmente a primers.



Fonte: Autor.

Figura 24: Resultado da corrida de eletroforese dos produtos de PCR (Linearizado G0) após extração do gel. Observando nas linhas 2, 3, 4, 6, 7 e 8 o plasmídeo G0 linearizado e purificado na altura de  $\pm 5500$  pb, sem a presença de pontos brilhantes na altura de  $\pm 100$  pb correspondendo principalmente a primers.



Fonte: Autor

## Montagem do G0 Linearizado e das inserções de DNA do NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit

A montagem dos fragmentos de DNA de interesse, que é o gene que codifica a enzima Fast-PETase e o plasmídeo G0 linearizado, foi realizada utilizando o NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit. As reações de montagem foram incubadas a 50°C e armazenadas a -20°C antes da transformação em células competentes de E. coli (POP 08).

Figura 25: Cálculo com NEBioCalculator de quantos ng de vetor serão necessários, considerando que 27fmol é o ideal.

dsDNA: Mass to/from Moles Converter

This tool will convert dsDNA mass to moles of dsDNA, moles dsDNA ends, and number of DNA molecules and also moles of dsDNA to mass of dsDNA.

Mass → Moles   Moles → Mass   Tutorials

DNA sequence [optional]  
gctctcccaggcatcaaatgctctcccaggcat

DNA length  
5589 bp

DNA moles  
27 fmol

DNA mass  
92.96 ng

DNA Molecular Weight  
3442995.22 g/mol

Formula

mass of dsDNA (g) = moles of dsDNA (mol) x ((length of dsDNA (bp) x 615.96 g/mol/bp) + 36.04 g/mol)

Note: nucleic acid MW calculations were revised to assume deprotonated phosphate hydroxyls.

Fonte: Autor

Figura 26: Cálculo com NEBioCalculator de quantos ng de inserto serão necessários (Fast-PETase).

Ligation Calculator

This tool will calculate the mass of insert required at several molar insert:vector ratios in the range needed for typical ligation reactions.

Ligation   Tutorials

Insert DNA length  
919 bp

Vector DNA length  
5589 bp

Vector DNA mass  
92.96 ng

Required Insert DNA mass

- 15.29 ng (1:1)
- 30.57 ng (2:1)
- 45.86 ng (3:1)
- 76.43 ng (5:1)
- 107.0 ng (7:1)

Formula

required mass insert (g) = desired insert/vector molar ratio x mass of vector (g) x ratio of insert to vector lengths

Fonte: Autor.

Tabela 4: Quantidades utilizadas para realizar a montagem de gibson na proporção de 1:3 considerando mínimo de 0,03 pmoles e máximo de 0,2 pmoles de DNA total.

<b>ADN</b>	<b>Vetor</b>	<b>Inserir</b>
de	92,96 de	45,86 de
Proporção de 1:3 pmoles	0,027 pmole	0,081 pmole
<b>ADN total: 0,128 pmoles</b>		

Fonte: Autor

### PCR de Colônia Utilizando o Kit Q5 High-Fidelity 2X Master Mix

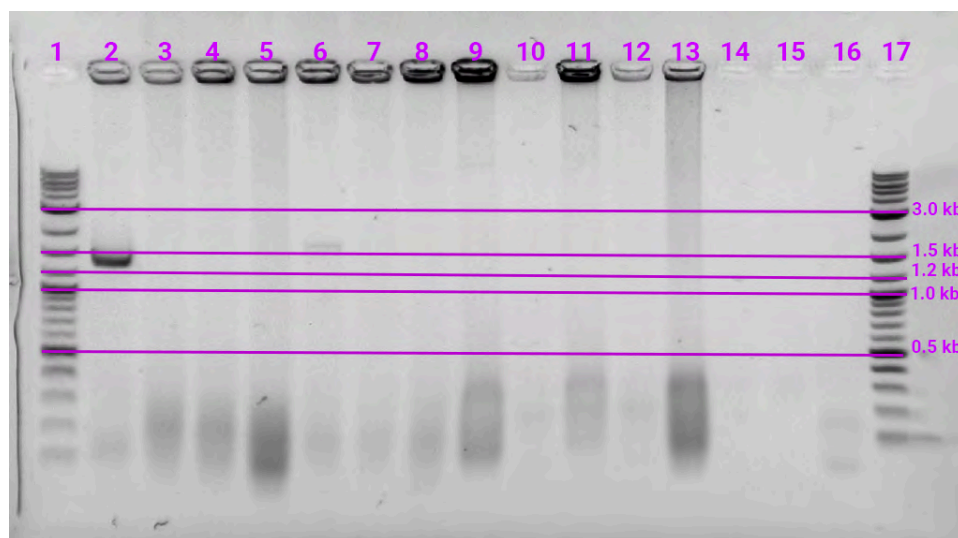
Uma vez concluída a montagem gibson e transformada em um *E. coliDH5um*, foi deixado crescer por 8 dias em estufa a 37°C. Então a PCR de colônia foi realizada para verificar a presença do plasmídeo montado nas células transformadas. As reações de PCR foram preparadas usando o kit Q5 High-Fidelity 2X Master Mix e executadas em um termociclador (POP 12).

Tabela 5: Configuração do termociclador para PCR de colônia para G0+Fast-PETase.

<b>Etapa</b>		<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Desnaturação inicial		98°C	5 minutos
Desnaturação	30 ciclos	98°C	10 segundos
toque		65°C	30 segundos
Extensão		72°C	30 segundos
Extensão final		72°C	2 minutos
Final		4°C	∞

Fonte: Autor

Figura 27: Execução de eletroforese do resultado da PCR de colônia, na qual o amplicon esperado na altura de  $\pm 1279$  pb é visto na linha 2 e na linha 6 (fraco). Demonstrando uma colônia positiva para o plasmídeo com Fast-PETase.

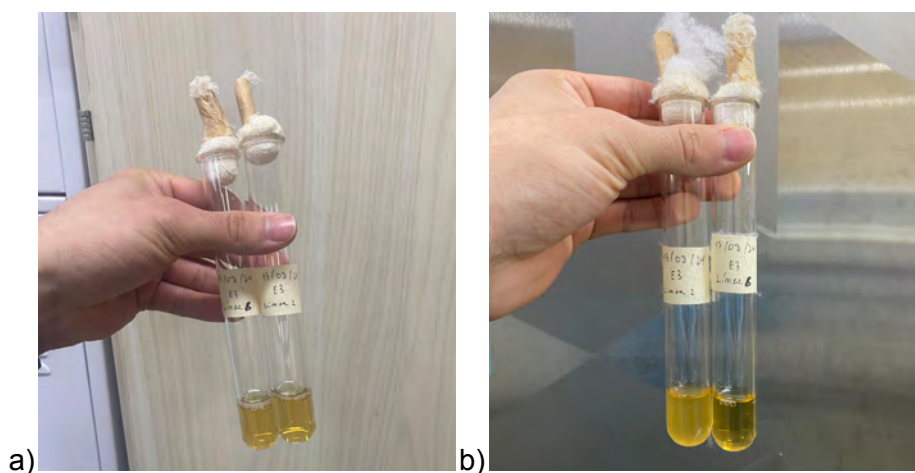


Fonte: Autor

### Cultura de inóculo para realizar Miniprep

Foi realizado o inóculo das colônias positivas para PCR de colônia, a partir das linhas 2 e 6, sendo a linha 6 uma linha mais fraca, o que pode indicar menor concentração de plasmídeos (POP 04).

Figura 28: a) Inóculo das linhas 2 e 6 no tempo 0. b) Inóculo das linhas 2 e 6 após 48 horas. Observa-se que o inóculo da linha 6 (direita) também é mais fraco, semelhante à banda anterior de PCR de colônia da linha 6, indicando menor presença de células.

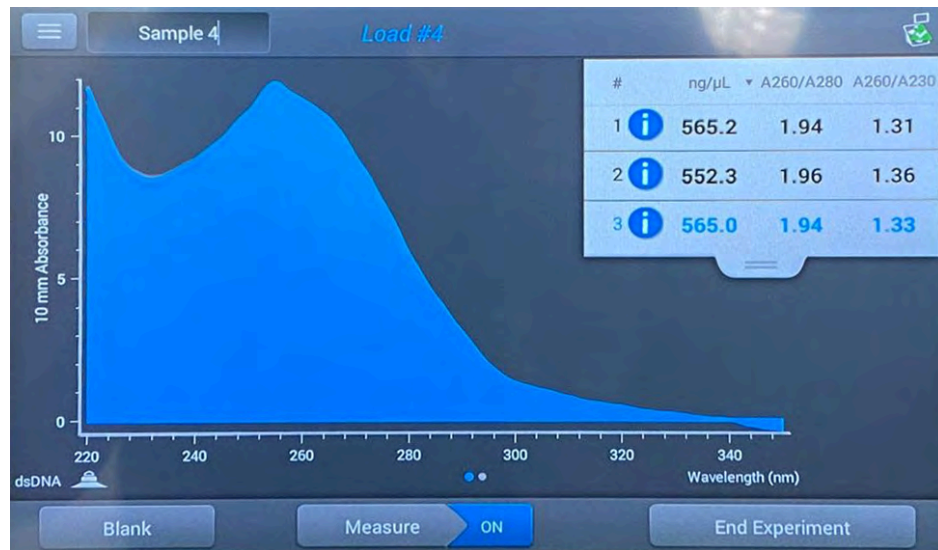


Fonte: Autor

## Extração de Plasmídeo por Lise Alcalina Miniprep

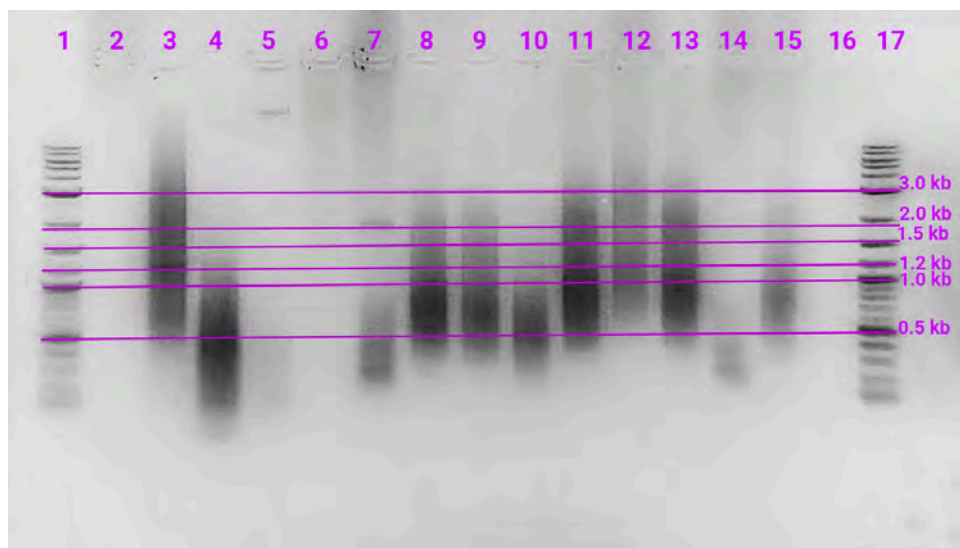
A extração do plasmídeo foi realizada a partir do inóculo 1 (tubo esquerdo na Figura 25.b) usando o protocolo de minipreparação de lise alcalina. 5 ml de *E. coli* foram cultivados em meio LB e as células foram lisadas utilizando as soluções previamente preparadas. O DNA plasmídico foi precipitado com etanol absoluto e ressuspensão em tampão TE para posterior leitura (POP 04).

Figura 29: Resultado da leitura em triplicata da extração no nanodrop, com o plasmídeo G0+Fast-PETase. Demonstrando aparentemente boa concentração de DNA, porém, com muita contaminação.



Fonte: Autor

Figura 30: Execução de eletroforese da minipreparação da figura 29 na qual um amplicon é visto na linha 7 a uma altura de  $\pm 2\text{kb}$  e não a uma altura de  $\pm 1279\text{ pb}$  como esperado.



Fonte: Autor.

## Resultados e discussão

Apesar de ter obtido resultados preliminares promissores na extração do plasmídeo G0+Fast-PETase utilizando miniprep de lise alcalina, as leituras subsequentes no Nanodrop, bem como a corrida de eletroforese, indicaram a presença de contaminação na amostra e uma discrepância no tamanho do amplicon observado, sugerindo a necessidade de otimizar alguns aspectos do processo. Estes resultados iniciais sublinham a importância de ajustar os protocolos utilizados e realizar uma análise mais detalhada do ADN extraído para garantir que o plasmídeo obtido cumpra os parâmetros esperados.

O projeto foi conduzido até a construção do circuito genético com sucesso, incluindo a validação da presença do gene da Fast-PETase por meio de PCR de colônia. As próximas etapas envolvem a transformação das células de *Escherichia coli* BL21 e a subsequente expressão da enzima Fast-PETase. Além disso, serão realizados ensaios para a validação da atividade enzimática da Fast-PETase, com testes de degradação utilizando policaprolactona e PET. Essas etapas serão essenciais para confirmar a eficiência da enzima na degradação de plásticos, consolidando os avanços alcançados até o momento.

## Impacto do TCC no ecossistema da Biologia Sintética

Este TCC tem servido como instrumento fundamental para manter ativos os projetos BioPank e Mhetyguá, duas iniciativas importantes da equipe Syn Fronteras. Esses projetos, que têm sido fundamentais para o avanço da pesquisa em biologia sintética na UNILA, encontraram neste TCC um meio para continuar desenvolvendo e aplicando o conhecimento e os recursos acumulados nos anos anteriores. Além disso, este trabalho contribuiu para fortalecer a comunidade de biologia sintética na UNILA, posicionando a universidade como referência regional nesta área emergente.

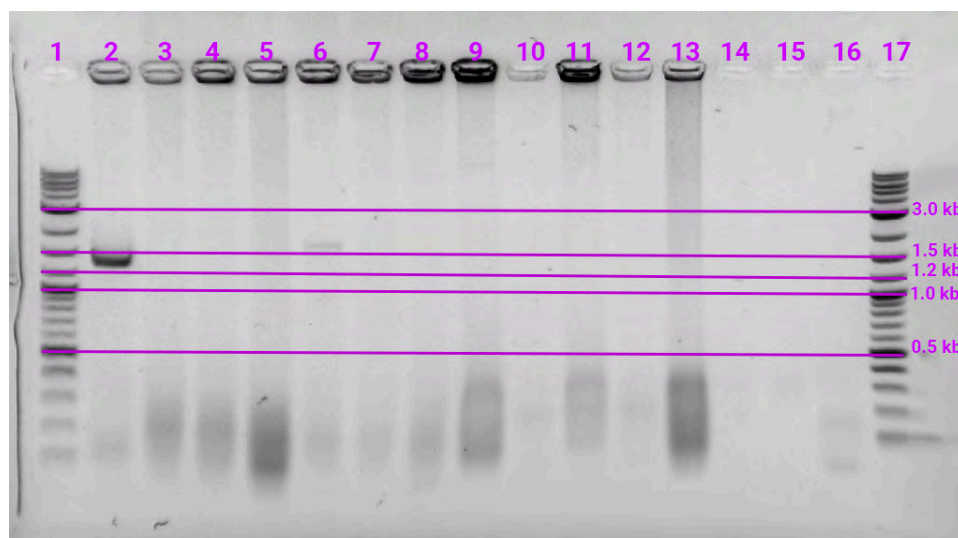
O impacto desta TCC vai além dos resultados experimentais individuais. Ao servir de ponte entre projetos anteriores e futuros, este trabalho garante a continuidade das pesquisas em biologia sintética dentro da UNILA. Além disso, reforça a importância da colaboração interdisciplinar e do desenvolvimento de capacidades locais em biotecnologia, o que é crucial para a sustentabilidade a longo prazo da investigação nesta área.

## Projeto e montagem de Circuitos Genéticos

Três circuitos genéticos (“E3. G0+Fast-PETase”, “E4. G0+Fast-PETase+Linker+MHETase” e “E5. G0+Fast-PETase+mCherry”) foram projetados usando a plataforma Benchling. Esse desenho envolveu não apenas a criação de sequências específicas para cada gene, mas também o planejamento das sequências sobrepostas necessárias para a técnica de Gibson Assembly, que permite a montagem eficiente de fragmentos de DNA. A escolha dos elementos genéticos, incluindo promotores, sítios de ligação ao ribossomo e terminadores, foi feita considerando a necessidade de expressão eficiente e controlada das enzimas (Figura 10).

O projeto bem-sucedido desses circuitos é essencial para avançar na produção de enzimas capazes de degradar plásticos como o PET (Figura 25).

Figura 31: Execução de eletroforese do resultado da PCR de colônia, na qual o amplicon esperado na altura de  $\pm 1279$  pb é visto na linha 2 e na linha 6 (fraco). Demonstrando uma colônia positiva para o plasmídeo com Fast-PETase.



Fonte: Autor

A construção destes circuitos através do Gibson Assembly não só demonstra a capacidade técnica de integrar múltiplas sequências genéticas, mas também destaca a versatilidade e eficácia desta técnica na biologia sintética moderna. A capacidade de montar com sucesso o circuito "E3. G0+Fast-PETase" valida a abordagem metodológica utilizada, enquanto a dificuldade encontrada no circuito "E4. G0+Fast-PETase+Linker+MHETase" sublinha a importância de contar com recursos adequados e organização do laboratório, o que reforça a necessidade de um espaço dedicado à biologia sintética na UNILA.

## Reutilização de Recursos Genéticos

Foram reaproveitadas partes genéticas ou gBlocks de projetos anteriores da equipe Syn Fronteras, especificamente dos projetos BioPank (2020/21) e Mhetyguá (2022/23). Estas peças genéticas incluem sequências já sintetizadas, o que permitiu reduzir os custos e o tempo de desenvolvimento do projeto atual. Esta reutilização é um exemplo de sustentabilidade na investigação, onde recursos limitados são otimizados para obter o máximo benefício.

A reutilização de gBlocks não só demonstra uma gestão eficiente de recursos no laboratório, mas também destaca a importância da colaboração contínua e da transferência de conhecimento entre projetos. Esta abordagem não só poupa tempo e dinheiro, mas também incentiva a criação de uma base sólida de ferramentas genéticas que podem ser aproveitadas por futuros investigadores. Além disso, ao reutilizar partes genéticas validadas, aumenta-se a probabilidade de sucesso nos experimentos atuais, o que é essencial para o avanço da pesquisa sobre biodegradação plástica.

## Validação de Protocolos Operacionais Padrão (SOPs)

Foram validados 13 Protocolos Operacionais Padrão (POPs), que vão desde a reativação celular até a montagem de circuitos genéticos. Esses POPs foram cuidadosamente avaliados para garantir a reprodutibilidade e eficiência de cada etapa. A validação incluiu otimização das condições experimentais, verificação da integridade do DNA e das proteínas e teste de funcionalidade em sistemas experimentais relevantes.

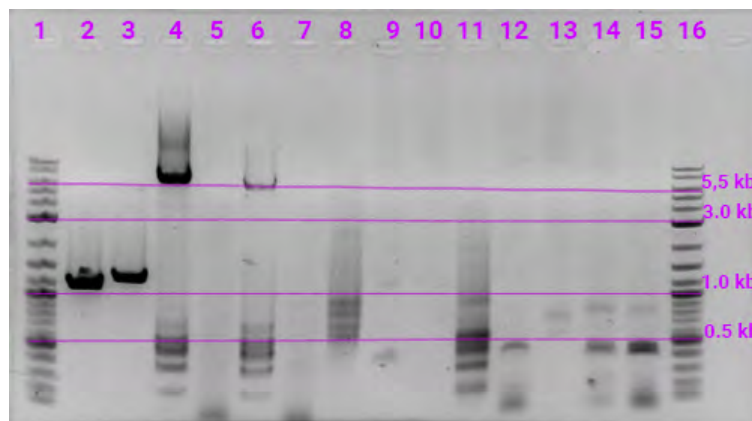
Ter POPs validados é crucial para garantir que os experimentos sejam reprodutíveis e que os resultados obtidos sejam confiáveis. Além disso, fortalece a infraestrutura metodológica do laboratório, beneficiando tanto o projeto atual quanto futuras pesquisas na área de biologia sintética. Abaixo estão alguns pontos-chave e aprendizados críticos obtidos durante o processo experimental:

### Erros na identificação do plasmídeo

No início do ano, tentei linearizar o plasmídeo G0 para usá-lo como cassete de expressão para Fast-PETase. No dia 2 de fevereiro de 2024 consegui obter uma banda de aproximadamente 5.500 pb, mas estava procurando erroneamente uma banda de 3.000 pb. Esse mal-entendido me levou a tentar diferentes estratégias, como uso de diversos primers, ajustes nas concentrações de gel e DNA, entre outros, tentando encontrar uma banda de  $\pm 3000$  pb.

Figura 32: Execução de eletroforese da linearização de G0 em 2 de fevereiro de 2024.

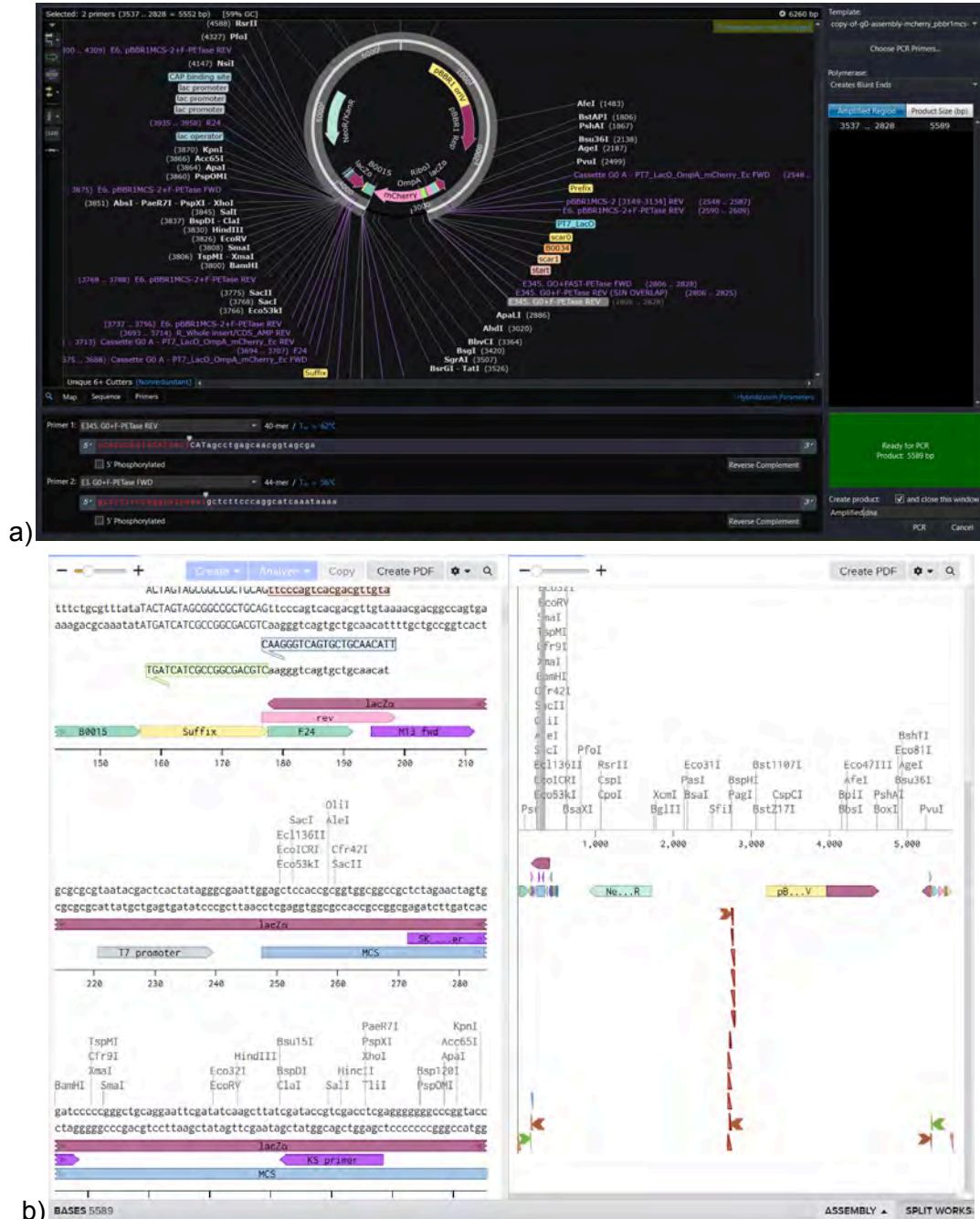
Vê-se nas linhas 4 e 7 que G0 foi linearizado corretamente na altura de  $\pm 5500$  pb, porém como ficou na altura de  $\pm 3000$  pb, naquela época eu dei essa execução como um resultado incorreto.



Fonte: Autor.

Após semanas de testes reprovados, me reuni com o professor Cristian, que sugeriu ajustes no protocolo de PCR, como redução da temperatura de recozimento, aumento do tempo de extensão e realização de controles adicionais. Apesar das mudanças, os resultados permaneceram inconclusivos. Finalmente, em 1º de março de 2024, observei que uma das bandas apresentava a intensidade correta para uma linearização bem-sucedida. Após uma análise mais aprofundada, descobri que o problema era que eu estava trabalhando com o plasmídeo pBBR1MCS-2 (5.500 pb) em vez do pUC19 (3.000 pb), como havia assumido inicialmente.

Figura 33: PCR in silico do plasmídeo G0 em pBBRMS-1, nos softwares SnapGene (a) e Benchling (b), demonstrando que o tamanho esperado de  $\pm 5500$  pb estava correto.



Fonte: Autor.

Este erro deveu-se à catalogação incorreta do plasmídeo, o que gerou semanas de confusão e atrasos. A lição aprendida foi que a correta identificação e rotulagem dos plasmídeos é essencial para evitar mal-entendidos experimentais.

### Importância da verificação de primers in silico

Uma das lições mais valiosas deste projeto foi a necessidade de testar primers in silico antes de realizar experimentos. Durante o projeto Mhetyguá utilizei os primers E345 REV e E345 FWD, acreditando que eles linearizariam corretamente o plasmídeo. Porém, no final descobri que, embora tivessem nomes semelhantes, não cumpriam a função esperada, o que levou a diversas tentativas fracassadas.

Esse mesmo erro ocorreu durante o PCR de colônia realizado entre 2 e 10 de abril de 2024. Embora tenha seguido à risca os protocolos, não obtive os resultados esperados. Só em 7 de agosto de 2024 é que descobri que o problema era usar a cartilha errada. Ao mudar o primer para E345.FWD PCRCol e E3. G0+F-PETase REV, obtive o produto de PCR esperado de 1279 pb. Este erro sublinha a importância de não confiar apenas na nomenclatura dos primers e de sempre realizar testes in silico prévios.

### Otimização do tempo de extensão em PCR para plasmídeos grandes

A linearização de plasmídeos grandes, como o pBBR1MCS-2 de aproximadamente 5500 pb, requer tempos de extensão adequados para garantir a amplificação correta. Nas minhas experiências, descobri que um tempo de extensão de 3 minutos por ciclo, combinado com uma extensão final de 10 minutos a 72°C, foi o mais eficiente. O uso de prazos de extensão mais curtos resultou em produtos incompletos ou indesejados. Esta configuração é crucial quando se trabalha com plasmídeos grandes para garantir que a polimerase completa a síntese de DNA.

Tabela 6: Configuração do termociclador para linearização do plasmídeo G0.

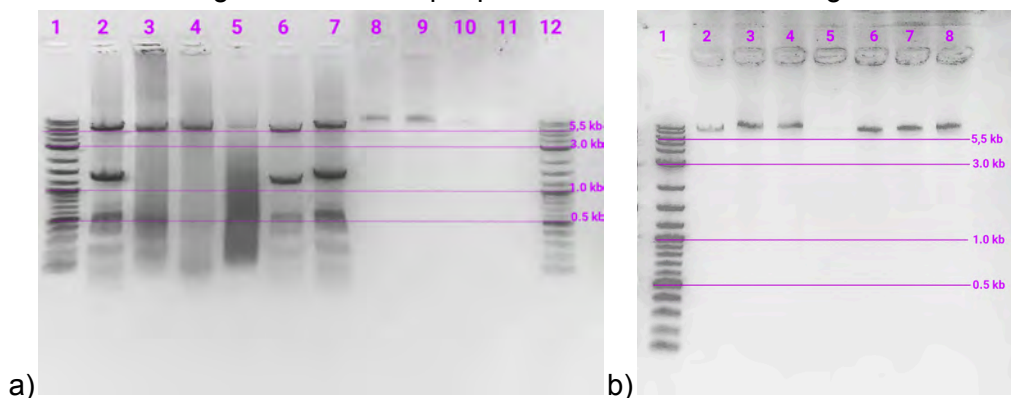
Etapa		Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial		98°C	5 minutos
Desnaturação	30 ciclos	98°C	10 segundos
toque		65°C	30 segundos
Extensão		72°C	3 minutos
Extensão final		72°C	10 minutos
Final		4°C	∞

Fonte: Autor

### Purificação do produto PCR para montagem

Antes de 22 de julho de 2024, eu costumava usar diretamente o produto de PCR sem purificação prévia, resultando em falhas nas montagens. Porém, após receber recomendações de Maria Astolfi e João Levandoski, implementei a purificação do produto PCR utilizando kits da NEB BioLabs e INVITROGEN. Esta purificação removeu resíduos de oligonucleotídeos e modelos indesejados, melhorando a eficiência da montagem.

Figura 34: Diferença entre G0 linearizado não purificado e purificado. a) gel run onde os produtos de PCR não purificados são vistos nas linhas 2 a 7, e os produtos de PCR purificados são vistos nas linhas 8 a 11, prontos para serem usados na montagem. b) corrida em gel onde os produtos de PCR purificados são vistos nas linhas 2 a 8, sem restos de oligonucleotídeos que possam interferir na montagem.



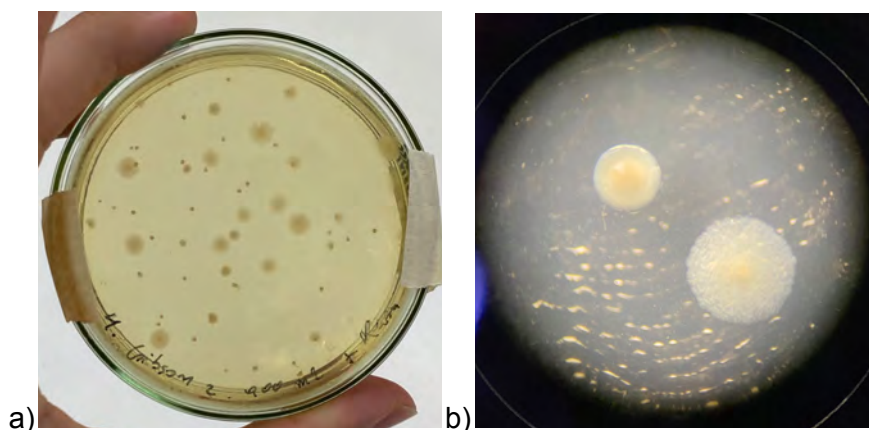
Fonte: Autor.

Um exemplo claro da importância desta etapa foi observado nos experimentos de 13 e 14 de março de 2024, onde a falta de purificação resultou em falhas nas montagens. Por outro lado, os experimentos subsequentes realizados nos dias 22, 23 e 25 de julho de 2024, com produtos purificados, tiveram sucesso.

### Morfologias de colônias bacterianas após transformação

No dia 8 de agosto de 2024 observei diferentes morfologias nas colônias de bactérias transformadas e não transformadas, o que me levou a investigar se essas diferenças estavam relacionadas à presença do plasmídeo. Realizei uma PCR de colônia e observei que as colônias menores continham o plasmídeo transformado, enquanto as maiores não.

Figura 35: análise morfológica entre colônias transformadas e não transformadas de e. coli DH5 $\alpha$ . a) foto da placa a olho nu. b) foto do estereoscópio vista em x40, onde a colônia da esquerda é vista menor e com circunferência mais definida, enquanto a da direita é vista de tamanho maior e com circunferência menos definida.



Fonte: Autor.

### **Contaminação nas placas e problemas com o antibiótico**

No dia 21 de agosto de 2024, todas as placas apresentaram sinais de contaminação, caracterizadas por um crescimento bacteriano descontrolado. Esse problema foi parcialmente atribuído ao uso de kanamicina em baixa concentração, que não foi suficiente para selecionar adequadamente as bactérias transformadas, permitindo o crescimento de colônias não desejadas. A kanamicina é essencial no protocolo para garantir a seleção das bactérias transformadas, pois o gene de resistência ao antibiótico foi introduzido no plasmídeo durante o processo de clonagem, conferindo às bactérias que receberam corretamente o plasmídeo a capacidade de sobreviver na presença de kanamicina. No entanto, quando a concentração do antibiótico é insuficiente, as bactérias não transformadas também podem sobreviver, resultando em falsos positivos e contaminação.

Além disso, técnicas assépticas rigorosas de inoculação e repicagem foram fundamentais para evitar contaminações cruzadas durante os experimentos. A esterilização adequada de materiais, o uso de fluxo laminar e a manipulação cuidadosa das amostras foram etapas críticas para garantir a validade dos resultados.

No dia 29 de agosto de 2024, ao utilizar outra kanamicina, observou-se um crescimento bacteriano significativamente menor, o que confirmou que a concentração correta do antibiótico é crucial para a eficiência do processo seletivo e para evitar contaminações.

### **Próximas etapas: expressão genética e prova de conceito**

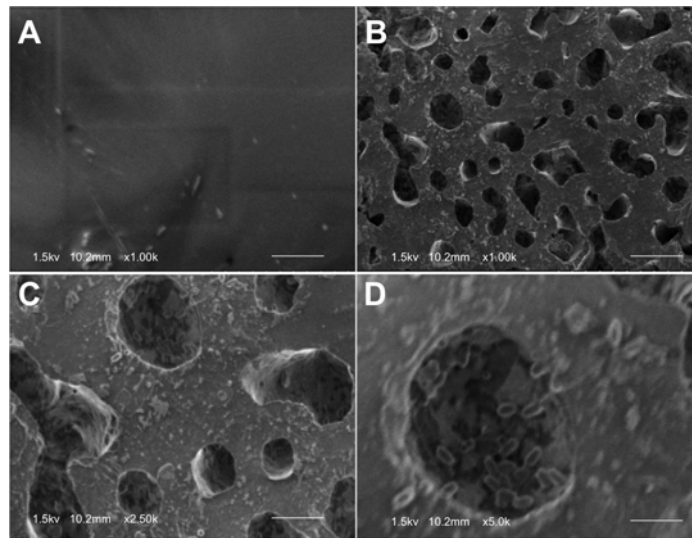
Ao longo deste TCC, foram alcançados avanços importantes no desenho e montagem de circuitos genéticos voltados à degradação de plásticos, em especial do PET. Uma das conquistas mais significativas foi a montagem bem-sucedida do circuito "E3. G0+Fast-PETase" utilizando a técnica Gibson Assembly. Embora a validação experimental da atividade enzimática da Fast-PETase em policaprolactona (PCL) não tenha sido concluída devido a restrições de tempo, a montagem correta do circuito é um avanço crítico para experimentos futuros que avaliarão a funcionalidade das enzimas expressas.

Transformação genética através da técnica de choque térmico de células *Escherichia coli* BL21 quimiocompetente, com o plasmídeo montado expressando Fast-PETase não pôde ser realizado com sucesso. Esta etapa é crucial porque é a etapa anterior à fase de validação da atividade enzimática, que confirma que o DNA plasmídico pode ser introduzido nas células bacterianas e ser lido corretamente para expressão enzimática.

O próximo passo fundamental neste projeto será transformar o *Escherichia coli* BL21 quimiocompetência, em seguida realizar a cultura de expressão induzida por IPTG, indutor que promove a produção de Fast-PETase nas células transformadas. Este processo permitirá a obtenção das enzimas de interesse em quantidades suficientes para futuros testes experimentais. Uma vez alcançada a expressão da enzima, serão realizados testes de degradação utilizando substratos como policaprolactona (PCL) e, posteriormente, PET. Estes testes permitirão avaliar a capacidade degradativa da enzima em plásticos, o que é essencial para validar o potencial do sistema projetado. Os experimentos relacionados à prova de conceito incluirão a análise da zona de degradação ao redor das colônias bacterianas para avaliar visualmente a degradação do polímero. Além disso, análises quantitativas mais detalhadas serão realizadas utilizando ferramentas como HPLC ou

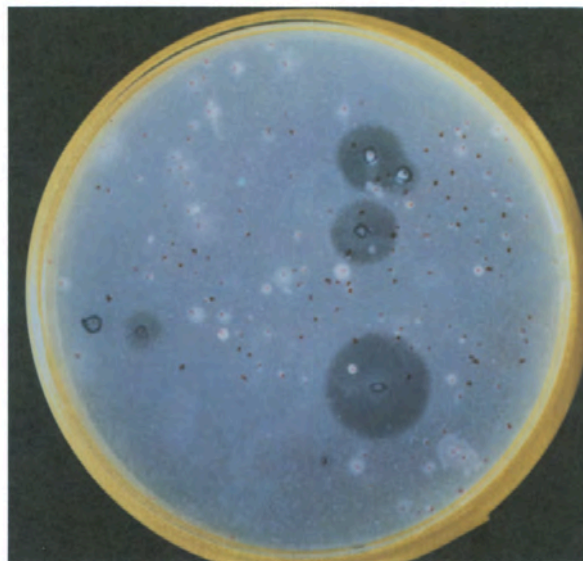
espectrometria de massa para detectar produtos de degradação. Finalmente, a comparação da atividade enzimática da Fast-PETase com a PETase de tipo selvagem poderia ser um foco principal em futuras TCC ou pesquisas de iniciação científica. Esta comparação permitirá determinar se as modificações introduzidas na Fast-PETase conferem maior eficiência de degradação ao PET, cumprindo o objetivo de avançar na biodegradação dos plásticos. As imagens a seguir mostram exemplos de trabalhos relacionados sobre como seria um teste de degradação realizado com enzimas do tipo hidrolase capazes de degradar PET.

Figura 36: Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) mostrando a degradação de filmes de PCL por *Brevundimonas* sp. MRL-AN1 após duas semanas de incubação.



Autor: Nawaz et al. (2014).

Figura 37: Colônias bacterianas e áreas claras em placas de LB-ágar com emulsão de PCL, indicativas da atividade enzimática no substrato.



Autor: Nishida & Tokiwa (1993).

Em seguida, pretende-se preservar as cepas bacterianas transformadas em 25% de glicerol a -80 °C, para garantir a estabilidade das células e sua disponibilidade para experimentos futuros. Esta etapa de preservação é crucial para manter um estoque de células viáveis que podem ser usadas em ensaios repetidos ou pesquisas adicionais.

Além das próximas etapas mencionadas, também há um interesse crescente em expandir este estudo para eucariotos, como a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, uma vez que já dispomos das partes genéticas do projeto Mhetyguá necessárias para a expressão da Fast-PETase nesta microalga. Utilizar *C. reinhardtii* para expressão enzimática pode trazer vantagens como a capacidade de produzir enzimas em sistemas fotossintéticos, reduzindo custos energéticos e fornecendo uma alternativa ecológica ao processo de produção. A possibilidade de inserir o circuito genético desenvolvido neste TCC em *C. reinhardtii* permitiria testar a eficiência da enzima Fast-PETase em um organismo eucariótico, abrindo novas perspectivas para a biodegradação de plásticos em ambientes diversos, inclusive em água doce e salobra.

Outra abordagem interessante seria testar a expressão em *Saccharomyces cerevisiae* (levedura), amplamente utilizada em biotecnologia por sua capacidade de produção de proteínas em grandes escalas e por ser um modelo bem estudado. No entanto, seria necessário adaptar o circuito de expressão para esta espécie, ajustando promotores e elementos regulatórios específicos para leveduras. Essas adaptações poderiam ampliar ainda mais o potencial biotecnológico da Fast-PETase, facilitando a sua produção em sistemas eucarióticos de fácil manipulação e com aplicações industriais.

## Conclusões

Este Projeto de Conclusão de Curso obteve avanços significativos no desenho, montagem e validação de circuitos genéticos destinados à produção de enzimas degradadoras de plástico, especificamente voltados para Fast-PETase. Ao longo desta pesquisa, foi demonstrada a viabilidade técnica da abordagem adotada, ao mesmo tempo que foram identificadas áreas de melhoria que abrem oportunidades para pesquisas futuras.

A montagem bem-sucedida do circuito genético "E3. G0+Fast-PETase" marca um marco importante neste trabalho, validando a metodologia utilizada e estabelecendo uma base sólida para as próximas etapas experimentais. Embora a transformação *Escherichia coli* BL21 para a expressão enzimática devido a restrições de tempo, os resultados obtidos são promissores e deixam um roteiro claro para as fases subsequentes da pesquisa.

As próximas etapas experimentais incluirão a transformação de *E. coli* BL21 e a indução da expressão Fast-PETase por IPTG. Os testes de atividade enzimática em policaprolactona (PCL) serão o primeiro passo para validar a funcionalidade da enzima, seguidos de testes PET, que permitirão uma avaliação mais precisa da sua capacidade degradativa. Para estes estudos futuros, a implementação de ferramentas analíticas avançadas como espectrofotometria e cromatografia será essencial para quantificar a eficácia enzimática.

Uma conquista notável neste projeto foi a reutilização de partes genéticas de projetos anteriores, como BioPank e Mhetyguá, o que permitiu otimizar recursos e tempo. Esta

prática não só demonstra uma abordagem sustentável e eficiente à pesquisa, mas também reforça a colaboração contínua entre projetos, aspecto fundamental para o desenvolvimento da biologia sintética na UNILA.

A validação de 13 Protocolos Operacionais Padrão (POPs) também representa um avanço importante, garantindo a reprodutibilidade e confiabilidade dos experimentos. Estes protocolos fortalecem a infra-estrutura metodológica do laboratório e estabelecem as bases para futuras pesquisas neste campo.

Uma recomendação importante para melhorar a eficiência de montagens futuras é a incorporação de prefixos e sufixos Golden Gate em inserções e plasmídeos. Isso permitiria padronizar os processos de montagem genética, reduzindo a dependência de técnicas como Gibson Assembly e linearização de plasmídeos, o que por sua vez otimizaria o uso de recursos no laboratório.

Além disso, seria valioso realizar um estudo comparativo entre a atividade enzimática da Fast-PETase e da PETase de tipo selvagem disponível em placas iGEM. Esta análise forneceria informações críticas para melhorar ainda mais as enzimas envolvidas na degradação do PET e orientar futuras modificações enzimáticas.

Em conclusão, este trabalho não só avançou a investigação sobre a biodegradação de plásticos utilizando a biologia sintética, mas também lançou as bases para uma investigação mais aprofundada. Ao integrar conhecimentos e recursos de projetos anteriores, e propor melhorias para aplicações futuras, este TCC contribui significativamente para o campo da biologia sintética da UNILA, com foco em soluções biotecnológicas sustentáveis para o problema dos plásticos. A investigação futura deverá centrar-se na validação experimental e na avaliação do impacto ambiental e económico da aplicação em larga escala destas enzimas, garantindo que as soluções propostas sejam não só viáveis, mas também sustentáveis a longo prazo.

# Referências

Achillas, D. S., Tsintzou, G. P., Nikolaidis, A. K., Bikiaris, D. N., & Karayannidis, G. P. (2011). Aminolytic depolymerization of poly(ethylene terephthalate) waste in a microwave reactor. *Polymer International*, 60(3), 500-506.

Adams, B. L. (2016). The next generation of synthetic biology chassis: Moving synthetic biology from the laboratory to the field. *ACS Synthetic Biology*, 5(12), 1328-1330.  
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00256>

Alzaben, M., Burve, R., Loeschner, K., Møller, P., & Roursgaard, M. (2023). Nanoplastics from ground polyethylene terephthalate food containers: Genotoxicity in human lung epithelial A549 cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 892, 503705. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2023.503705>

BARCLAY, A.; ACHARYA, K. R. *Engineering plastic eating enzymes using structural biology*. *Biomolecules*, v. 13, n. 9, p. 1407, 2023. DOI: [10.3390/biom13091407](https://doi.org/10.3390/biom13091407).

Barth, M., Honak, A., Oeser, T., Wei, R., Belisário-Ferrari, M. R., Then, J., Schmidt, J., & Zimmermann, W. (2016). A dual enzyme system composed of a polyester hydrolase and a carboxylesterase enhances the biocatalytic degradation of polyethylene terephthalate films. *Biotechnology Journal*, 11(8), 1082-1087.

Braatz, G. M. (2024). Design, Assembly, Clonagem E Preservação De Circuitos genéticos Paratransgênicos Para Prevenção Da Leishmaniose Visceral (TCC, Universidade Federal de Integração Latinoamericana). Recuperado de <https://dspace.unila.edu.br/handle/123456789/7822>

Buecherl, L., & Myers, C. J. (2022). Engineering genetic circuits: advancements in genetic design automation tools and standards for synthetic biology. *Current Opinion in Microbiology*, 68, 102155. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102155>

Clifton, I. J., Do, T., Jones, J. A., & Wang, Y. (2018). Characterization of RiboJ as a Genetic Insulator in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Engineering*, 12(1), 45-54.

De Lorenzo, V., Krasnogor, N., & Schmidt, M. (2020). For the sake of the bioeconomy: Define what a synthetic biology chassis is! *New Biotechnology*, 60, 44-51.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.08.004>

Facciola, A., Visalli, G., Pruiti Ciarello, M., & Di Pietro, A. (2021). Newly emerging airborne pollutants: Current knowledge of health impact of micro and nanoplastics. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(6), 2997.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph18062997>

Furukawa, M., Kawakami, N., Oda, K., & Miyamoto, K. (2018). Acceleration of enzymatic degradation of poly (ethylene terephthalate) by surface coating with anionic surfactants. *ChemSusChem*, 11(23), 4018-4025.

Garcia-Manyes, S., & Beedle, A. E. (2017). Steering chemical reactions with force. *Nature Reviews Chemistry*, 1(11), 1-16.

Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782.

Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, 9(1), 382.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1>

Júnior, H. C., et al. (2018). Synthetic acidic peptides for microbial peptide activation: DRS-N1 and CAM-W case studies. *Synthetic Biology Journal*, 3(2), 123-132.

Kim, N. K., Lee, S. H., & Park, H. D. (2022). Current biotechnologies on depolymerization of polyethylene terephthalate (PET) and repolymerization of reclaimed monomers from PET for bio-upcycling: A critical review. *Bioresource Technology*, 363, 127931.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127931>

Lu, H., Diaz, D. J., Czarnecki, N. J., Zhu, C., Kim, W., Shroff, R., ... & Alper, H. S. (2022). Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. *Nature*, 604, 662-667. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04599-z>

Liu, K., Wang, X., Wei, N., Song, Z., & Li, D. (2019). Accurate quantification and transport estimation of suspended atmospheric microplastics in megacities: Implications for human health. *Environmental International*, 132, 105127.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105127>

Materic, D., Kjaer, H. A., Vallelonga, P., Tison, J. L., Rockmann, T., & Holzinger, R. (2021). Nanoplastics transport to the remote, high-altitude Alps. *Environmental Pollution*, 288, 117697. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117697>

Nawaz, A., Hasan, F., & Shah, A. A. (2014). Degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) by a newly isolated *Brevundimonas* sp. strain MRL-AN1 from soil. *FEMS Microbiology Letters*, 362(1), 1-7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu004>

Nielsen, A. A. K., Der, B. S., Shin, J., Vaidyanathan, P., Paralanov, V., Strychalski, E. A., ... & Voigt, C. A. (2016). Genetic circuit design automation. *Science*, 352(6281), aac7341.  
<https://doi.org/10.1126/science.aac7341>

Nishida, H., & Tokiwa, Y. (1993). Distribution of PHB and PCL aerobic degrading microorganisms in different environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1(3), 227-233. <https://doi.org/10.1007/BF01458031>

Palm, G. J., Reisky, L., Böttcher, D., Müller, H., Michels, E. A., Walczak, M. C., ... &

Bornscheuer, U. T. (2019). Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate. *Nature Communications*, 10(1), 1717.

Pechsrichuang, P., et al. (2016). Expression of the OmpA signal peptide in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* for protein secretion. *Biotechnology Journal*, 11(5), 631-640.

Ronkvist, Å. M., Xie, W., Lu, W., & Gross, R. A. (2009). Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, 42(14), 5128-5138.

Roshanak, S., et al. (2023). Histidine-tagged proteins: Purification strategies and applications in biopharmaceutical production. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 24(3), 205-218.

SAPEA. (2019). A scientific perspective on microplastics in nature and society. *Science Advice for Policy by European Academies*.

Silva, C., et al. (2011). Enzyme engineering strategies for rational redesign of hydrolases. *Biotechnology Advances*, 29(5), 614-622.

Slusarczyk, A. L., Lin, A., & Weiss, R. (2012). Foundations for the design and implementation of synthetic genetic circuits. *Nature Reviews Genetics*, 13(6), 406-420. <https://doi.org/10.1038/nrg3227>

Sun, J., & Wang, C. (2023). Human exposure to microplastics and its associated health risks. *Science of the Total Environment*, 856, 159276.

Tournier, V., et al. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 580(7802), 216-219.


Wang, C., Zhao, Y., & Liu, J. (2023). The toxicological effects of inhaled microplastics in mammalian systems: A review. *Environmental Research*, 210, 112741.

Wang, X., Wei, D., Shi, Y., & Zhang, D. (2008). Degradation of poly(ethylene terephthalate) by two newly isolated *Aspergillus* sp. strains. *Journal of Applied Polymer Science*, 110(1), 641-647.

Yee, M. S., Hii, L. W., Looi, C. K., Lim, W. M., Wong, S. F., Kok, Y. Y., Tan, B. K., Wong, C. Y., & Leong, C. O. (2021). Impact of microplastics and nanoplastics on human health. *Nanomaterials (Basel)*, 11(2), 496. <https://doi.org/10.3390/nano11020496>

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., ... & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196-1199.

# Anexos

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P00</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Preparação de soluções estoque para atividades de biologia molecular</b>		

**Objetivos:** Preparar as seguintes soluções estoque: Tris-HCl 1 M; EDTA 0,5 M; TE 10X; TE 1X; TBE 10X; TBE 0,5X; Loading DYE; Sacarose 1 M; Tampão TSE; para utilização no desenvolvimento de atividades de biologia molecular.

**Materiais e reagentes:**


- Espátula
- Barra magnética
- Vidro relógio
- Béquer
- Erlenmeyer
- Frasco de reagente
- Proveta
- Tubo falcon (15 ml)
- Ponteiras de 1000 µl
- Micropipeta 1000 µl
- Água destilada
- Tris (PM:121,4)
- EDTA (PM:292,25)
- Ácido bórico
- Bromofenol blue
- Glicerina
- NaOH
- HCL

**Equipamentos:**

- Cabine de segurança biológica
- Balança analítica
- pHmetro
- Agitador magnético
- Autoclave

**Procedimentos:**

Antes de iniciar os procedimentos, verifique o peso molecular dos reagentes e certifique-se de utilizar a massa e volume correto para molaridade pretendida.

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P00</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>

**ATIVIDADE: Preparação de soluções estoque para atividades de biologia molecular**

#### Tris-HCl 1 M

1. Coloque em uma proveta 50 ml de água destilada e adicione 40 ml em um béquer;
2. Pese 6,07 g de Tris (PM:121,4) e transfira para o béquer, homogenize a solução;
3. Verifique o valor do pH e ajuste para 7,4 utilizando HCl;
4. Complete o volume em 50 ml e confira o pH novamente, se necessário reajuste;
5. Coloque em um frasco de reagente e autoclave a 121°C por 20 minutos ou filtre a solução com filtro de 0,22 µm em um frasco autoclavado.

#### EDTA 0,5 M


1. Coloque em uma proveta 50 ml de água destilada e adicione 40 ml em um béquer;
2. Pese 7,3 g de EDTA (PM:292,25) e transfira para o béquer, homogenize a solução;
3. Verifique o valor do pH e ajuste para 8 utilizando NaOH;
4. Complete o volume em 50 ml e confira o pH novamente, se necessário reajuste;
5. Coloque em um frasco de reagente e autoclave a 121°C por 20 minutos ou filtre a solução com filtro de 0,22 µm em um frasco autoclavado.

#### TE 10X

1. Em um tubo falcon de 15 ml adicione 8,8 ml de água destilada;
2. Adicione 1 ml de Tris-HCl 1 M e 200 µl de EDTA 0,5 M;
3. Verifique o pH e se necessário ajuste para 7,4;
4. Para ajustar utilize HCl ou NaOH em altas molaridades para não gerar muita interferência no volume final.

#### TE 1X

1. Em um tubo falcon de 15 ml adicione 9,88 ml de água destilada;
2. Adicione 100 µl de Tris-HCl 1 M e 20 µl de EDTA 0,5 M;
3. Ou faça uma diluição da solução TE 10X, utilizando 9 ml de água destilada e 1 ml da solução;
4. Em ambos os casos verifique o pH e se necessário ajuste para 7,4;

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P00</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Preparação de soluções estoque para atividades de biologia molecular</b>		

5. Para ajustar utilize HCl ou NaOH em altas molaridades para não gerar muita interferência no volume final.

#### TBE 10X

1. Coloque 1 L de água destilada em uma proveta e transfira 800 ml para um béquer;
2. Adicione 108 g de Tris (PM:121,4), 55 g de ácido bórico, e 7,3 g de EDTA (PM:292,25) ou 40 ml de EDTA pH: 8 (0,5 M), total da solução 0,025 M de EDTA;
3. Dissolva a solução completamente, pode ser necessário utilizar o auxílio de um agitador magnético e barra magnética;
4. Verifique o pH e se necessário ajuste para 7,4-8,0 então complete o volume para 1 litro;
5. Coloque em um frasco de reagente e autoclave a 121°C por 20 minutos.


#### TBE 0,5X

1. Faça uma diluição da solução TBE 10X, utilizando 900 ml de água destilada e 50 ml da solução;
2. Use água autoclavada e faça a transferência em área estéril;
3. Pode ser necessário esterilizar uma proveta, sem autoclavar.

#### Loading DYE (10 ml)

1. Ligue a balança analítica com 30 minutos de antecedência e prepare-a utilizando papel cobrir sua área interna;
2. Cubra com papel a área de trabalho fora da balança;
3. Adicione 3 ml de glicerina em uma proveta de 10 ml, adicione 5 ml de água destilada e homogenize a solução na proveta e transfira para um béquer de 20 ml;
4. Utilizando um vidro relógio e uma espátula pese 25 mg de bromofenol blue e transfira para o béquer;
5. Utilize 2 ml de água destilada para lavar o vidro relógio e a espátula;
6. Misture a solução e transfira para um tubo falcon de 15 ml ou faça alíquotas de 10 ml em microtubos de 1,5 ml. Armazene a -20°C.

#### Sacarose 1 M (50 mL)

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P00</b>
	<b>Syn Fronteiras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Preparação de soluções estoque para atividades de biologia molecular</b>		


1. Pese 17,11 g de sacarose e transfira para um erlenmeyer limpo;
2. Adicione 35 ml de água deionizada, agite a solução e aqueça até completa diluição;
3. Complete a solução com água destilada até completar 50 ml;
4. Autoclave a 121°C por 20 min;

Tampão TSE (200 mM Tris-HCl pH 8, 500mM sacarose, 1mM EDTA) (30 ml)

1. Adicione 15 ml de solução de sacarose (1 M) em um tubo falcon de 50 ml;
2. Adicione 6 ml de Tris-HCl (1 M, pH 8);
3. Adicione 60 µL de EDTA (0,5 M);
4. Complete o volume para 30 ml com água deionizada;
5. Caso não tenha utilizado soluções estéreis, autoclave a 121°C por 20 min.

**NOTAS:**

-

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P02</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Reativação de <i>Escherichia coli</i> a partir de <i>stabs</i> ou cultivos preservados</b>		

**Objetivos:** Demonstrar os procedimentos necessários para reativação de *Escherichia coli*, a partir de *stabs* ou preservados em 25% de glicerol a -80°C, e o início de um novo cultivo.

**Materiais e reagentes:**

- Placas de petri com meio sólido (com ou sem antibiótico)
- Tubos falcon com 5 ml de meio líquido (com ou sem antibiótico)
- Alça de semeadura (descartável)
- Palitos de madeira (autoclavados)
- Gelo
- Caixa de isopor
- Rack para tubo falcon e microtubos
- *Stab* ou cultivo preservado

**Equipamentos:**


- Cabine de segurança biológica
- Shaker
- Estufa
- Bico de bunsen

**Procedimentos:**

Os meios sólido e líquidos devem ser preparados de acordo com o POP 1 (P01) a necessidade ou não de antibiótico é relativo ao organismo que se busca reativar, e suas características (ex: plasmídeo de seleção).

Reativação (pré-inóculo):

1. Higienize a cabine de segurança biológica e organize os materiais em seu interior;
2. Caso a reativação seja a partir de um *stab*, leve-o até a cabine, se necessário ligue o bico de bunsen;
3. Com um palito de madeira ou outro perfuro cortante estéril, corte parte do meio do *stab* de modo que inclua um grupo celular, faça isso sobre o tubo falcon com meio e transfira o material cortado diretamente para o meio de cultivo líquido;

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P02</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>

**ATIVIDADE:** Reativação de *Escherichia coli* a partir de *stabs* ou cultivos preservados


4. Caso a reativação seja a partir de cultivo preservado em 25% de glicerol a -80°C, primeiramente obtenha gelo e coloque em uma caixa de isopor;
5. Retire do o preservado do -80 e coloque no gelo, leve até a cabine de segurança biológica;
6. Abra o tubo e com um palito de madeira ou alça de semeadura (descartável) pressione e raspe a superfície do meio em processo descongelamento, após obter material na ponta da alça coloque-a no meio e agite levemente, se usar um palito de madeira solte-o no meio;
7. Feita a transferência das bactérias para o meio líquido, feche o tubo falcon e leve até o shaker, deixe incubar *overnight* a 37°C a 250 RPM;
8. Após o período de incubação higienize a cabine de segurança biológica, ligue o bico de bunsen e leve as placas com meio sólido juntamente com cultivo retirado do shaker;
9. Após flambar, coloque a alça de semeadura ou palito de madeira no cultivo, em seguida faça uma estria de esgotamento na placa, faça uma duplicata do procedimento;
10. Leve as placas de petri até a estufa e incube a 37°C *overnight* . Alternativamente, deixe incubar a 30°C por 24-36 horas ou 25°C por 48 horas;

Novo cultivo (inóculo):

1. Higienize a cabine de segurança, ligue o bico de bunsen, e retire as placas da estufa e leve a cabine juntamente com meio líquido;
2. Após flambar a alça de semeadura, retire uma colônia isolada da placa e deposite no meio líquido, lembre de não usar a alça muito aquecida para não queimar as bactérias;
3. Feita a transferência das bactérias para o meio líquido, feche o tubo falcon e leve até o shaker, deixe incubar *overnight* a 37°C a 250 RPM.

**NOTAS:**

•

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P03</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Preparação de soluções para miniprep de lise alcalina</b>		

**Objetivos:** Instruir a preparação das soluções necessárias para realização de miniprep de lise alcalina.

**Materiais e reagentes:**

- Béquer (250 ml)
- Espátula
- Vidro relógio ou
- Filtro de 0,22 µm
- Frasco de reagente (250 ml)

**Solução I GTE ou DTE (pH 8,0) (100 mL):**

- 5 mM Sacarose (0,17 g) ou (glicose/dextrose (0,9 g))
- 25 mM Tris HCl pH 8,0 (0,3g) (2,5 ml sol. 1M)
- 10 mM EDTA pH 8,0 (2 ml sol. 0,5M)
- NaOH
- Água destilada

**Solução II (10 mL): (preparar no momento do uso)**

- NaOH 0,2 M (0,2 ml sol. 10M)
- SDS 1% (1 ml sol. 10%)
- Água destilada

**Solução III (pH 4,8) (100 mL):**


- Acetato de sódio 3 M (anidro: 24,6 g), (trihidratado: 40,82 g)
- Ácido acético glacial
- Água destilada

**Equipamentos:**

- Balança semi-analítica
- Chapa de aquecimento
- pHmetro
- Autoclave

**Procedimentos:**

Verificar se há soluções estoque de Tris-HCl, EDTA, NaOH, não havendo é necessário preparar as soluções estoque ou diretamente a partir dos reagentes

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P03</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Preparação de soluções para miniprep de lise alcalina</b>		

sólidos.

Solução I (GTE ou DTE) (pH: 8,0)

1. Iniciando o preparo da primeira solução, adicione 50 ml de água destilada no béquer;
2. Pese 0,9 g de dextrose ou glicose, alternativamente, pese 0,17 g de sacarose, e coloque no béquer;
3. Adicione 2,5 ml da solução 1M de Tris-HCl pH 8,0 ou 0,3 g de Tris (PM: 121,4);
4. Adicione 2 ml da solução 0,5 M de EDTA pH 8,0 ou X g EDTA (PM: X g);
5. Homogenize a solução completamente;
6. Utilizando o pHmetro verifique o valor do pH da solução, e se necessário utilize NaOH ou HCL para ajustar em pH 8,0;
7. Adicione o restante de água para completar 100 ml e transfira para um frasco de reagente, a solução deve ser esterilizada a 121°C por 15 minutos.


Solução III

1. Adicione 50 ml de água destilada em um béquer;
2. Pese 24,6 g de acetato de sódio 3 M (anidro) ou 40,82 g se triidratado, e coloque dentro do béquer;
3. Homogenize a solução completamente;
4. Verifique o valor do pH, e utilizando ácido acético glacial ajuste para 4,8;
5. Com água destilada, complete a solução para 100 ml
6. Filtre a solução e coloque em um frasco de reagente estéril, caso não haja filtro, a solução pode ser autoclavada a 121°C por 15 minutos.

Solução II (Estoque: SDS 10 %) (Trabalho: NaOH 0,2 M, SDS 1 %)

Esta solução deve ser preparada no dia do uso antes do início do procedimento

1. Para preparar a solução estoque, pese 1 g de SDS, e dissolva em 10 ml de água, apenas por aquecimento, sem agitação, se necessário ajuste o pH a 7,2 com HCl diluído;
2. Para preparar a solução de trabalho utilize 8,8 ml de água destilada e adicione 1 ml da solução de SDS 10%, por fim adicione a solução 200 µl de NaOH 10 N.

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P04</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 08/02/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Professor Cristian Rojas</b>
<b>ATIVIDADE: Extração plasmidial, miniprep de lise alcalina</b>		

**Objetivos:** Instruir o procedimento extração plasmidial, em uma miniprep de lise alcalina.

**Materiais e reagentes:**

- Microtubos (autoclavados)
- Micropipeta (200/1000 ul)
- Ponteiras de 200 e 1000 ul
- Gelo
- Caixa de isopor
- Cultivo para extração
- Solução I (GTE ou DTE) (pH: 8,0)
- Solução II (NaOH 0,2 N SDS 1%) (Cálculos em notas)
- Solução III (acetato de sódio 3 M) (pH 4,8)
- Etanol absoluto (4°C)
- Álcool 70% (4°C)
- Tampão TE

**Equipamentos:**


- Centrífuga refrigerada

**Procedimentos:**

Verifique a disponibilidade de centrífuga refrigerada e gelo para os períodos de incubação e manutenção da temperatura do etanol absoluto a 70%. As soluções para o procedimento devem ser preparadas previamente de acordo com o POP-005B.

**Lise Celular**

1. Cultive 5 mL de meio LB com uma colônia isolada e antibiótico apropriado, (overnight, 12 a 16 horas);
2. Após o cultivo, transfira 1,8 ml do cultivo em 2 microtubos ou mais, faça uma centrifugação por 5 minutos a 10.000 RPM. Remova o sobrenadante (longas centrifugações dificultam a ressuspensão celular);
3. Com movimento *up and down* faça a ressuspensão do pellet com 100uL da solução I e deixe descansar por 5 min em temperatura ambiente;

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P04</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 08/02/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Professor Cristian Rojas</b>
<b>ATIVIDADE: Extração plasmidial, miniprep de lise alcalina</b>		

(Certifique-se de que as células estão completamente ressuspendidas, se necessário use o vortex);

*Observação: Caso a extração seja feito a partir de uma E.coli BL21 utilizar a Solução I com maior concentração de EDTA (10x). Na figura 1 mostra-se a solução 1 com maior concentração de EDTA disponível no Lab 004 do Delaben.*

- Adicione 200 µl da solução II (NaOH/SDS), misture cuidadosamente com tapinhas no tubo, leve ao gelo por 5 minutos.

#### Precipitação das proteínas


- Adicione 150 µl da solução III (acetato de sódio) e coloque o tubo em vortex por 2 segundos ou misture por inversão. Deixe no gelo por 10 min.
- Realize uma centrifugação por 5 min
- Transfira o sobrenadante para um novo microtubo, evitando o pellet*
- Realize uma centrifugação por 5 min*

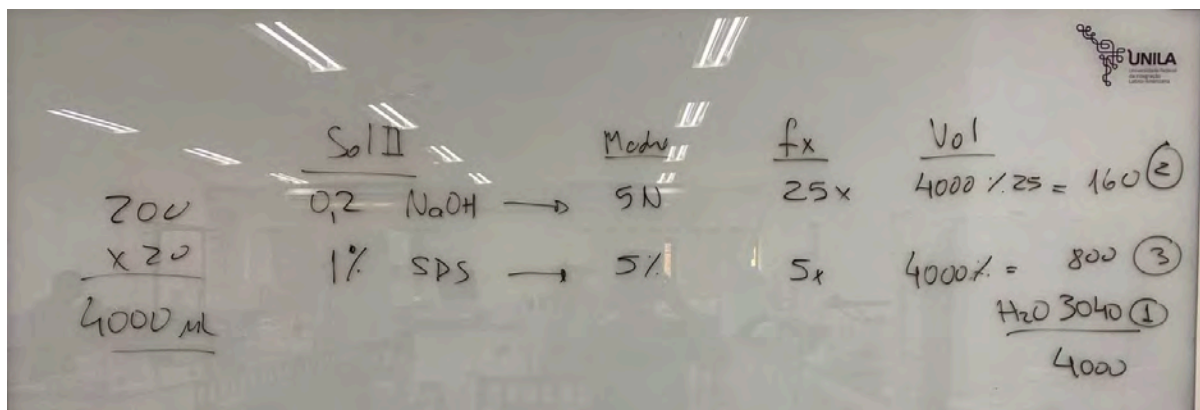
#### Precipitação do DNA

- Transfira o sobrenadante para um novo microtubo (~400 µl), evitando o pellet, adicione 40 µl da solução III, misture e adicione 1000 µl de etanol absoluto (gelado), deixe no freezer -20 por 30 min (para precipitação dos ácidos nucleicos).
- Centrifugue por 15 min 10.000 RPM, remova o sobrenadante e dê um spin de 1 min.
- Lave o pellet com 1 ml de etanol 70%, centrifugue por 5 minutos, remova o sobrenadante e de um spin, retire da centrífuga e deixe o pellet secar.
- Ressuspender o pellet em 20 µl de tampão TE, adicione 3 µL RNase 10 mg/mL.
- Para corrida eletroforética em gel de agarose use 5 µl e para leitura no nanodrop use 2uL.

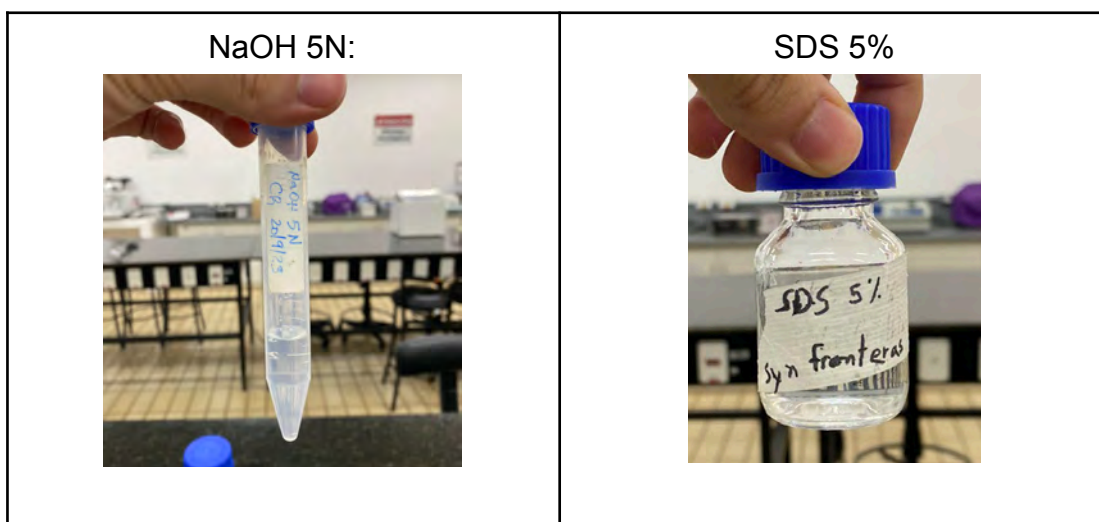
#### NOTAS:


- Todas as centrifugações devem ser feitas a 4°C.
- Cálculos para fazer a solução II com reagentes disponível no Lab 004 do Delaben (Ajustar según necesidad)

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P04</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 08/02/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Professor Cristian Rojas</b>
<b>ATIVIDADE: Extração plasmidial, miniprep de lise alcalina</b>		



Observación: Siendo el 4000 uL el volumen total a preparar, como eran 18 tubos con cultivo decidimos preparar para 20. Cada tubo debe contener 200uL entonces 200uL x 20 tubos da 4000uL de solución II. Identificamos la concentración que necesitamos en la columna Sol II, luego relacionamos con la concentración que tenemos disponible y por último calculamos el factor de dilución, es decir, nuestro NaOH estaba 25x veces más concentrado y el SDS 5x veces más. Finalmente relacionamos el volumen total de 4000 uL dividido 25 nos dió 160uL que tenemos que usar de NaOH en 5N y 4000uL dividido 5 nos dió 800uL de SDS al 5% que debemos utilizar, luego calculamos el agua restante necesaria que es de 3040uL. Por último pero no menos importante, la verdad muy importante, identificamos el orden que debemos colocar para preparar la solución, primero el agua, luego el NaOH y por último el SDS.



	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P04</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 08/02/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Professor Cristian Rojas</b>
<b>ATIVIDADE: Extração plasmidial, miniprep de lise alcalina</b>		

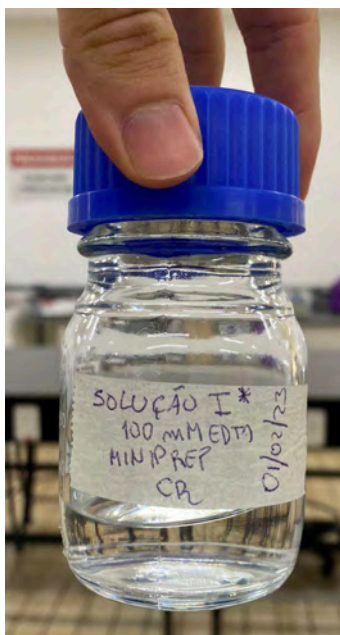



Figura 1.

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P06</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Linearização do vetor utilizando o kit Q5 High-Fidelity 2X Master Mix</b>		

**Objetivos:** Linearizar o vetor **pBBR1MCS-2**, com tamanho de 5148 pb

**Materiais e reagentes:**

- Q5 High-Fidelity 2X Master Mix
- Forward primer
- Reverse primer
- Template DNA
- Água nuclease free
- Microtubo de polipropileno de 0,5 mL ou 0,2 ml para PCR (verificar se cabe no termociclador)
- Pipeta de 1 µL - 10 µL
- Pipeta de 10 µL - 1000 µL ou 5 µL a 50 µL
- Ponteiras de 10 µL e 100 µL autoclavadas
- Gelo
- Caixa de isopor

**Equipamentos:**

- Centrífuga para microtubo (eppendorf)
- Vórtex
- Termociclador
- Nanodrop

**Procedimentos:**

1. Observar na **Tabela 1** os materiais e quantidades necessários para a reação e calcular os volumes a serem aplicados de primers e DNA template;
2. Realizar a assepsia das mãos e utilizar luvas livres de pó;
3. Limpar a cabine de segurança biológica, pipetas e materiais a serem utilizados dentro da cabine utilizando álcool 70%. Ligar a luz UV por 15 minutos. Não sempre será necessário trabalhar na cabine de segurança biológica, porém sempre tem que ser um ambiente limpo.
4. Separar o kit Q5 High-Fidelity 2X Master Mix e deixá-lo descongelando em ambiente protegido de luz e preferentemente em gelo (p.ex.: cabine de segurança biológica previamente preparada para uso).
5. Preparar uma tabela com as reações que serão feitas e numerar sequencialmente. É muito importante manter a ordem e sequência das reações, porque qualquer distração pode significar em um resultado falso.
6. Separar e identificar com números os microtubos de polipropileno para o preparo da solução de PCR.

7. No microtubo, dispor os reagentes apresentados na "**Tabela 1**", observação colocar os reagentes na seguinte sequência: água, primers, template e Master mix. Isso para que a reação aconteça só no final quando adicionado o Master Mix com a polimerasa.

**Obs:** Vortexar o Master Mix e os demais reagentes antes (Não sempre é necessário)

8. **Tabela 1:** Volumes para preparar 25 µL de reação de PCR:

Reagente	Volume x1	Concentração Final
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	12,5 µL	1x
Forward primer *	1,25 µL	0,5 µM
Reverse primer *	1,25 µL	0,5 µM
Template DNA	0,5 µL	< 1 pg a 10 ng
Água nuclease free	q.s. (até completar 25 µL)	
<b>Volume total</b>	<b>25 µL</b>	

\* Os primers a serem utilizados devem estar a uma concentração final de 0,5 µM em relação ao volume do mix de reação (25 µL). Sendo assim, o volume será adaptável com base na concentração dos primers em seu frasco original. O DNA template pode ser mensurado utilizando o Nanodrop.

9. Misturar os reagentes gentilmente com a pipeta;

10. Iniciar a corrida no termociclador sob as seguintes condições para um fragmento de ±5500 pb:

**Tabela 2:** Configuração para o termociclador para o linearização d vetor **pBBR1MCS-2:**

Passo		Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial		98 °C	5 minutos
Desnaturação	30 ciclos	98 °C	10 segundos
Anelamento		65 °C	30 segundos
Extensão		72 °C	3 minutos
Extensão final		72 °C	10 minutos
Final		4 °C	∞

11. Ao fim das PCRs, correr um gel a 1,2% de agarose e 0,5 TBE ou TAE, com 5 µL do produto da reação, 1 uL de corante Diamond Dye diluído na concentração 1:100 e uL de xilenol.


12. Verificar a concentração do DNA amplificado utilizando Nanodrop.


13. Correr gel utilizando o ladder [Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder | NEB](#) ou um Lambda digerido com PstI.

**Notas:**

- A **Tabela 2** foi realizada considerando as recomendações do fabricante do kit, tamanho do vetor e temperaturas de anelamento dos primers. Com a alteração de qualquer uma dessas variáveis, o protocolo também deve sofrer alterações.

**Material de referência:**

- [Q5® High-Fidelity 2X Master Mix | NEB](#)
- [Protocol for Q5® High-Fidelity 2X Master Mix | NEB](#)
- [Simple Cloning by Prolonged Overlap Extension-PCR with Application to the Preparation of Large-Size Random Gene Mutagenesis Library in Escherichia coli - PubMed \(nih.gov\)](#)
-  [How to Set Up a PCR](#)

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P07</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Eletroforese em gel de agarose</b>		

**Objetivos:** Demonstrar o procedimento de preparo do gel de agarose, amostras, marcadores e a execução da corrida eletroforética.

**Materiais e reagentes:**

- Agarose
- TBE ou TAE 0,5 X
- Micropipeta de 10 µl
- Ponteiras de 10 µl
- Proveta
- Espátula
- Vidro relógio
- Erlenmeyer
- Parafilm
- DNA ladder
- Amostra de DNA
- Loading DYE
- DNA stain


**Equipamentos:**

- Balança semi-analítica
- Microondas
- Cuba de eletroforese
- Transiluminador.

**Procedimentos:**



Antes de iniciar, certifique-se de possuir TBE ou TAE na concentração adequada e todos os reagentes necessários, as amostras devem estar devidamente quantificadas.


1. Adicione em uma proveta 100 ml de TBE ou TAE 0,5 X em seguida transfira para um erlenmeyer;
2. Pese 0,8 g de agarose (Gel de agarose 0,8 %), e aqueça fracionadamente até completa diluição (tempo total~1 min);
  - a. Para fazer 30mL de gel a 0,8% (240mg Agarosa + 30mL TBE/TAE 0,5x)
  - b. Para fazer 30mL de gel a 1,2% (360mg Agarosa + 30mL TBE/TAE 0,5x)

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P07</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Eletroforese em gel de agarose</b>		

3. Deixe esfriar por alguns instantes e vire o gel no molde e se houver remova as imperfeições com uma ponteira, aguarde o resfriamento;
4. Após o resfriamento, remova o pente e posicione o gel na cuba de eletroforese, adicione TBE ou TAE 0,5 X até cobrir o gel. Sempre adicione o mesmo buffer do gel, se foi utilizado TBE para fazer o gel também terá que usar TBE na cuba para correr o gel.
5. Coloque 1µl do corante Diamond na diluição 1:100 (1 uL de corante e 99 uL de água destilada) sob um parafilm previamente cortado, mais 1µl de xileno cianol, posteriormente adicione 5 µl do DNA, repita dependendo da quantidade de amostras;
6. Adicione as amostras nos poços centrais do gel;
7. Nos poços das extremidades adicione o DNA ladder [Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder | NEB](#) ou um Lambda digerido com PstI;
8. Montar os eletrodos e aplicar uma corrente de 50 a 100V por 20 ou 30 min;
9. Após a corrida, leve o gel para o transiluminador para análise;
10. Faça o registro do resultado.

#### NOTAS:

- A manipulação do DNA stain, loading DYE e amostras deve ser feita utilizando luvas, preferencialmente sem pó.
-  [How to Make an Agarose Gel](#)
-  [How to Load an Agarose Gel](#)

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P08</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 06/03/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Giulio Bratz</b>
<b>ATIVIDADE: Gibson assembly do plasmido linearizado com um inserto</b>		

**Objetivos:** Realizar o assembly do vetor e fragmentos de DNA gerando plasmídeos circulares a partir do NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit.

**Materiais e reagentes:**

- Gibson Assembly Master Mix (2x)
- (X) Fragmentos de DNA
- Template DNA (Vetor)
- Água nuclease free
- Microtubo de polipropileno de 0,5 mL ou 0,2 para PCR
- Micropipeta de 1 µL - 10 µL
- Micropipeta de 10 µL - 100 µL
- Ponteiros de 10 µL e 100 µL autoclavadas
- Gelo
- Caixa de isopor

**Equipamentos:**

- Centrífuga para microtubo (eppendorf)
- Vórtex
- Termociclador
- Nanodrop

**Procedimentos:**


Antes de iniciar o procedimento faça os cálculos para determinar o volume e concentração do template e fragmentos de DNA que serão utilizados na reação.

Utilize a ferramenta: [NEBicalculator](#).

Assista o seguinte vídeo para entender melhor os cálculos a serem feitas:

[NEBioCalculator® - Using the Ligation module | NEB](#) e

📺 [Gibson Assembly with NEB Assembly Tool: A Step-by-Step Guide with Real ...](#)


	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P08</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 06/03/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Giulio Bratz</b>
<b>ATIVIDADE: Gibson assembly do plasmido linearizado com um inserto</b>		

No caso do assembly da G0 Linearizado é o inserto Fast-PETase é o seguinte:

<b>DNA</b>	<b>Vector</b>	<b>Insert</b>
ng	92,96 ng	45,86 ng
Ratio 1:3 pmols ratio	0.027 pmol	0.081 pmol
<b>Total DNA: 0.128 pmols</b>		

1. Prepare o gelo na caixa de isopor e realize todos os procedimentos de preparo da reação em gelo;
2. Realize a assepsia das mãos e utilize luvas livres de pó;
3. Limpar a cabine de segurança biológica, pipetas e materiais a serem utilizados dentro da cabine utilizando álcool 70%. Ligar a luz UV por 15 minutos;
4. Separe os fragmentos de DNA o vetor e o Gibson Assembly Master Mix (2x) e deixe-os descongelando em ambiente protegido de luz no gelo (p.ex.: cabine de segurança biológica previamente preparada para uso) (Retire o master mix por último);
5. Separe e identifique um microtubo de polipropileno para o preparo da solução de assembly;
6. No microtubo, dispor os reagentes apresentados na **Tabela 1**;
7. **Tabela 1**: Volumes para preparar 20 µL de reação de assembly:

<b>Razão molar de DNA</b>	<b>Vetor:Inserto = 1:3**</b>
Faixa de concentração dos fragmentos de DNA	Vector: 17,3 ng/uL* Inserto: 10 ng/uL*
Volume total do inserto	5 uL (50 ng)
Volume total template de DNA (vetor)	5,37 uL (92,96 ng)

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P08</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 06/03/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Giulio Bratz</b>
<b>ATIVIDADE: Gibson assembly do plasmido linearizado com um inserto</b>		

Gibson Assembly Master Mix (2x)	10 uL
Água deionizada nuclease-free	0 uL
Volume total ***	20 uL

\*Concentração específica do vetor e inserto que foi utilizado, caso seja diferente os cálculos tem que ser feitos de novo.


\*\*A eficiência é otimizada com 50–100 ng de vetor com um excesso de fragmentos em 2–3 vezes. Caso os fragmentos tenham menos de 300 pb utilize 5 vezes mais em relação ao vetor. O volume total de PCR sem purificação não deve exceder 20% do volume da reação.

\*\*\* Números superiores de fragmento requerem um aumento do volume do master mix.

- Incube a reação em um termociclador a 50°C por no mínimo 15 minutos para 2 ou 3 fragmentos, e 60 minutos quando 4–6 fragmentos.  
OBS: Períodos de incubação de 60 minutos podem aumentar a eficiência do assembly.
- Após a incubação, armazene a reação a –20°C para posterior transformação.
- Transforme em *E. coli* DH5-alfa ou 10-beta Competent cells com 5 a 10 µl do assembly resfriado.

#### NOTAS:

- Referências:
  - [NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit | NEB](#)
  - [NEBuilder® HiFi DNA Assembly Chemical Transformation Protocol \(E2621, E5520, E2623\) | NEB](#)
  - [NEBuilder HiFi DNA Assembly Reaction Protocol | NEB](#)
  - [NEBioCalculator](#)

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P09</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Preparação de soluções para indução de <i>E. coli</i> quimiocompetente</b>		

**Objetivos:** Instruir o preparo das soluções utilizadas no processo para indução de *Escherichia coli* quimiocompetente.

**Materiais e reagentes:**

- Espátula
- Vidro relógio
- Erlenmeyer
- Frasco de reagente
- Proveta
- Filtro de 0,22 µm
- Seringa
- Ponteiras de 1000 µl
- Micropipeta 1000 µl
- Água destilada
- Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (PM:147,01))


**Equipamentos:**

- Cabine de segurança biológica
- Balança analítica
- Autoclave

**Procedimentos:**

CaCl<sub>2</sub> 1 M

1. Coloque 100 ml de água destilada em uma proveta e transfira para um béquer;
2. Pese 14,7 g de CaCl<sub>2</sub> (PM:147,01) e transfira para o béquer;
3. Leve a solução para cabine de segurança biológica para filtragem da solução (é necessário possuir um frasco de reagente autoclavado para esta etapa);
4. Carregue a seringa com a solução e cuidadosamente abra a embalagem do filtro, conecte a seringa ao filtro e pressione a solução para o frasco estéril, a saída do filtro não deve tocar nenhuma superfície, apenas as laterais para apoio;
5. Cuidadosamente coloque o filtro novamente na embalagem sem tocar na

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P09</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Preparação de soluções para indução de <i>E. coli</i> quimiocompetente</b>		

região de saída, recarregue a seringa e repita o procedimento até que toda a solução seja filtrada;

6. Feche, identifique o frasco e armazene a 4°C.

#### CaCl<sub>2</sub> 0,1 M


1. Coloque 90 ml de água destilada em uma proveta e transfira para um frasco de reagente ou erlenmeyer;
2. Esterilize em autoclave a 121°C por 20 minutos;
3. Em seguida leve o frasco para a cabine de segurança biológica e adicione 10 ml da solução de CaCl<sub>2</sub> 1 M, com o auxílio de ponteiras estéreis e uma micropipeta de 1000 µl, ou vidraria volumétrica estéril;
4. Feche, identifique o frasco e armazene a 4°C.

#### CaCl<sub>2</sub> 0,1 M glicerol 15%

1. Coloque 45 ml de água destilada em uma proveta e transfira para um frasco de reagente ou erlenmeyer;
2. Adicione 9 ml de glicerina em uma proveta e utilize a água previamente medida para homogeneizar a glicerina e transferir para o frasco;
3. Esterilize em autoclave a 121°C por 20 minutos;
4. Em seguida leve o frasco para a cabine de segurança biológica e adicione 6 ml da solução de CaCl<sub>2</sub> 1 M, com o auxílio de ponteiras estéreis e uma micropipeta de 1000 µl;
5. Feche, identifique o frasco e armazene a 4°C.

#### NOTAS:

- .

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P10</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Preparo <i>Escherichia coli</i> Quimiocompetentes</b>		

**Objetivos:** Instruir o procedimento de indução de *E. coli* quimiocompetente

**Materiais e reagentes:**

**Materiais estéreis**

- 4 tubos falcon (50 ml)
- Solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M (4°C) (40 ml)
- Solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M glicerol 15% (4°C) (10 ml)
- Cultivo overnight de *E. coli* não competente
- Erlenmeyer (500 ml)
- 99 ml meio LB
- Micropipeta de 1000 e 100 µL
- Ponteiros de 1000 e 100 µL
- Ponteiros de 1000 µL (cortadas)
- 100 Microtubos

**Materiais não estéreis**

- Cubeta
- Gelo
- Caixa de isopor
- Rack para microtubos
- Rack para tubos falcon

**Equipamentos:**


- Shaker
- Espectrofotômetro
- Cabine de Segurança biológica
- Centrífuga refrigerada (116 mm 50 ml F)

**Procedimentos:**

Antes de iniciar é preciso se certificar da disponibilidade dos equipamentos necessários e garantir que haja gelo suficiente para utilização em todo o processo.

**DIA 0**


1. Primeiramente deve-se preparar as soluções de trabalho, meio de cultivo e

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P10</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Preparo <i>Escherichia coli</i> Quimiocompetentes</b>		

- autoclavar todos os materiais que serão utilizados para o procedimento;
- O preparo do meio deve seguir como descrito em protocolos prévios, para facilitar os 99 ml de meio LB podem ser autoclavados diretamente no erlenmeyer de (500 ml) coberto com uma boneca e papel alumínio;
  - É necessário iniciar um cultivo overnight descrito no processo de reativação, usualmente 5 ml de LB a partir de uma colônia isolada.

#### DIA 1

- Ligue a máquina de gelo, e higienize a cabine de segurança biológica;
- Separe os materiais e organize devidamente, deixe as soluções de trabalho a 4°C assim como os materiais que devem ser resfriados
- Retire o cultivo overnight do shaker leve até a cabine e transfira 1 ml para o meio de cultivo em erlenmeyer posteriormente leve ao shaker a 37°C e 250 RPM;
- Deixe previamente preparado uma cubeta com meio LB estéril;
- A cada uma hora leve o cultivo para cabine e retire de 2 ml de meio e coloque em uma cubeta para medir a absorbância a 600 nm;
- Após duas horas ou quando a densidade óptica atinja 0.2, passe a fazer as medições a cada 30 min até que atinja 0.4 OD;
- Ao atingir OD de 0.4 dentro da cabine de segurança biológica distribua o meio e dois tubos falcon de 50 ml, e deixe no gelo por 10 min;
- Durante esse período ligue a refrigeração da centrífuga para que resfrie a 4°C;
- Faça uma centrifugação de 10 min a 4000 RPM e 4°C.
- Durante esse período prepare transfira 20 ml da solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M para cada tubo falcon de 50 ml resfriado.
- Retire os tubos da centrífuga e dentro da cabine rapidamente descarte o sobrenadante;
- Para cada tubo utilize as ponteiras cortadas para transferir a solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M e assim dissolver o pellet, quando estiver dissolvido, transfira o restante da solução até completar 20 ml;
- Deixe as soluções no gelo a 4°C de 3 a 4 horas;
- Durante esse período prepare os microtubos para transferência e certifique-se de que estão resfriados;
- Nos últimos minutos de incubação em gelo (4°C), ligue a refrigeração da centrífuga;

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P10</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Preparo <i>Escherichia coli</i> Quimiocompetentes</b>		

16. Após o período de descanso faça uma nova centrifugação de 10 min a 4000 RPM em 4°C;
17. Durante esse período prepare 10 ml da solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M glicerol 15% em tubos falcon;
18. Retire os tubos da centrifuga e dentro da cabine rapidamente descarte o sobrenadante;
19. Para cada tubo utilize as ponteiras cortadas para transferir a solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M glicerol 15% e assim dissolver o pellet, quando estiver dissolvido, transfira o restante da solução até completar 5 ml;
20. Após a ressuspensão distribua 100 µL para microtubos de 1,5 ml;
21. Coloque os microtubos em uma caixa criobox e armazene a -80°C

**NOTAS:**

- .

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P11</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Matheus Araujo</b>
<b>ATIVIDADE: Transformação de <i>Escherichia coli</i> quimiocompetente com DNA plasmidial por <i>heat shock</i> (choque térmico)</b>		

**Objetivos:** Este POP tem com objetivo instruir o processo de transformação (clonagem) de *Escherichia coli* quimiocompetente através e choque térmico, uma adaptação dos protocolos da New England Biolabs (NEB) (*C2987H/C2987I* e *C3019H/C3019I*) disponíveis também na plataforma protcols.io: [C2987H](#), [C2987I](#) e [interactive version of this protocol](#).

**Materiais e reagentes:**


- 5 microtubos (1,5 mL)(autoclavados)
- Micropipeta de 10, 100 e 1000 µL
- Ponteiros de 10, 100 e 1000 µL
- Alça Drigalski
- Caixa de Isopor
- Gelo
- Meio LB líquido (3 mL)
- Bactéria quimiocompetente
- DNA plasmidial
- Meio SOC (0,95 mL)
- Placas de seleção (LB sólido com antibiótico)

**Equipamentos:**


- Cabine de segurança biológica (fluxo laminar)
- Banho maria ou termo bloco a 42°C
- Shaker a 37°C 250 rpm
- Bico de Bunsen
- Estufa a 37°C
- Centrífuga refrigerada

**Procedimentos:**

Antes de iniciar: Verifique se os meios e materiais necessários estão devidamente preparados e autoclavados; Confira a agenda do Shaker e a disponibilidade da centrífuga refrigerada; Certifique-se de que há gelo para o procedimento, e lembre-se de ligar o banho-maria ou termo bloco.

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P11</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Matheus Araujo</b>
<b>ATIVIDADE: Transformação de <i>Escherichia coli</i> quimiocompetente com DNA plasmidial por <i>heat shock</i> (choque térmico)</b>		


1. Retire o Meio SOC e deixe em temperatura ambiente, organize a bancada com todos os materiais necessários e faça a limpeza da cabine de segurança biológica;
2. Distribua o gelo na caixa de isopor e coloque o microtubo de transformação no gelo. Retire do refrigerador o microtubo com as células competentes e o DNA plasmidial;
3. Descongele o tubo de células competentes em gelo por 10 minutos e leve a caixa de gelo para a cabine de segurança biológica;
4. Caso necessário dê um spin no tubo de células para que se concentre no fundo, tempo máx de 1 min (Cuidado quando for pegar as células para que elas não fiquem coladas na parede do tubo e só pegar glicerol); Dê um spin no plasmídeo para concentração, tempo máx de 1 min;
5. Quando os últimos cristais de gelo desaparecerem, cuidadosamente faça o movimento *up and down* e pipete 50 µL de células para o tubo de transformação;
6. Se houver identifique como usada e guarde o restante das células competentes no freezer -80;
7. Adicione 5 µL que resulte em uma concentração final de 1 pg à 100 ng de DNA plasmidial na mistura celular. Cuidadosamente agite com 4 a 5 tapinhas no tubo, para misturar as células com DNA;
8. Coloque a mistura no gelo por 30 minutos;
9. Aplique um choque térmico a exatos 42°C por exatos 45 segundos;
10. Coloque no gelo por 5 minutos;
11. Dentro da cabine de segurança biológica, pipete 950 µL de meio SOC a temperatura ambiente;
12. Leve ao shaker por uma hora a 37°C e 250 RPM;
13. Durante esse período coloque as placas de seleção na estufa a 37 °C;
14. Após uma hora, retire o microtubo do shaker e leve até a cabine de segurança biológica, misture as células completamente invertendo o tubo suficientemente;
15. Ligue o bico de bunsen (OBS: o fogo é importante para a flambagem da alça e manutenção da área de esterilidade (o procedimento, preferencialmente é realizado dentro da cabine de segurança biológica));
16. Para determinar a competência execute várias diluições em série de 10 vezes em SOC ou LB, distribua de 50 a 100 µL para diluição, sendo, 1:10,

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P11</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Matheus Araujo</b>
<b>ATIVIDADE: Transformação de <i>Escherichia coli</i> quimiocompetente com DNA plasmidial por <i>heat shock</i> (choque térmico)</b>		

<p>1:100 e 1:1000 (o processo pode ser feito em duplicata), em uma placa utilize 100 µL diretamente do cultivo;</p> <p>17. Para transformações com, utilize três placas, uma com 100 ul direto do cultivo, uma com diluição de 100 ou 1000 vezes (de acordo com a eficiência registrada) e uma concentrada (após a transferência para as duas placas anteriores, leve os microtubos e realize uma centrifugação de 5 min, retire 100 ul do volume, descarte o sobrenadante e ressuspensa as células com os 100 ul do meio, plaqueie o volume ressuspendido).</p> <p>18. O volume colocado nas placas deve ser distribuído por toda a superfície do meio utilizando uma alça Drigalski, o ideal é que a distribuição seja feita até que o líquido seque;</p> <p>19. Após o plaqueamento e deixe incubar a 37 °C <i>overnight</i> (plasmídeos de baixa cópia podem apresentar tempo maior para o crescimento celular).</p>
--

#### NOTAS:

- De preferência, o DNA transformante deve ser purificado ou ressuspendido em TE ou água.
- As placas de seleção não precisam estar aquecidas, entretanto se estiverem secas e aquecidas o processo de formação de colônia é otimizado.
- O crescimento a 37°C por 1 hora é o ideal para recuperação da célula e expressão do antibiótico. Ideal usar o meio SOC, pois há perda de eficiência com meio LB em até 2 vezes. Incubação sem agitação resulta em perda de 2 vezes em eficiência.
- Referencia: [NEBuilder® HiFi DNA Assembly Chemical Transformation Protocol \(E2621, E5520, E2623\) | NEB](#)

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P12</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 04/09/2022</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Giulio Braatz</b>
<b>ATIVIDADE: PCR de colônia utilizando o kit Q5 High-Fidelity 2X Master Mix</b>		

**Objetivos:** Teste para verificar se as colônias transformadas contêm o gene de interesse Fast-PETase inserido corretamente no plasmídeo.

**Materiais e reagentes:**

- Q5 High-Fidelity 2X Master Mix
- Forward primer
- Reverse primer
- Template DNA - colônias na placa
- Água nuclease free
- Microtubo de polipropileno de 0,5 mL ou 0,2 ml para PCR (verificar se cabe no termociclador)
- Pipeta de 1 µL - 10 µL
- Pipeta de 10 µL - 100 µL
- Ponteiras de 10 µL e 100 µL autoclavadas
- Gelo
- Caixa de isopor
- Placas de cultivo com antibiótico (depende do plasmídeo sendo usado)

**Equipamentos:**

- Centrífuga para microtubo (eppendorf)
- Vórtex
- Termociclador
- Nanodrop
- Estufa de crescimento de bactérias

**Procedimentos:**

É preferível usar taq polimerase, pois a amplificação não precisa ser livre de erros, mas a tabela 2 precisaria ser mudada.

1. Realizar a assepsia das mãos e utilizar luvas livres de pó;
2. Limpar a cabine de segurança biológica, pipetas e materiais a serem utilizados dentro da cabine utilizando álcool 70%. Ligar a luz UV por 15 minutos;
3. Selecionar e identificar colônias isoladas das placas de cultivo com as bactérias previamente transformadas.
4. Dividir placas de cultivo vazias em dois ou mais quadrantes a depender do seu tamanho e numerá-los de acordo com a quantidade de colônias que usará na PCR

5. Separar o kit Q5 High-Fidelity 2X Master Mix e deixá-lo descongelando em ambiente protegido de luz e preferentemente em gelo (p.ex.: cabine de segurança biológica previamente preparada para uso).
6. Preparar uma tabela com as reações que serão feitas e numerar sequencialmente. É muito importante manter a ordem e sequência das reações, porque qualquer distração pode significar em um resultado falso.
7. Separar e identificar com números os microtubos de polipropileno para o preparo da solução de PCR.
8. No microtubo, dispor os reagentes apresentados na "**Tabela 1**". **Observação:** colocar os reagentes na seguinte sequência: água, primers, template e Master mix. Isso para que a reação aconteça só no final quando adicionado o Master Mix com a polimerasa.  
**Obs:** Vortexar o Master Mix e os demais reagentes antes (Não sempre é necessário)
9. **Tabela 1:** Volumes para preparar 25 µL de reação de PCR:

Reagente	Volume x1	Concentração Final
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	12,5 µL	1x
Forward primer *	1,25 µL	0,5 µM
Reverse primer *	1,25 µL	0,5 µM
Template DNA	passar a ponteira	< 1 pg a 10 ng
Água nuclease free	q.s. (até completar 25 µL)	
<b>Volume total</b>	<b>25 µL</b>	

\* Os primers a serem utilizados devem estar a uma concentração final de 0,5 µM em relação ao volume do mix de reação (25 µL). Sendo assim, o volume será adaptável com base na concentração dos primers em seu frasco original. O DNA template pode ser mensurado utilizando o Nanodrop.

10. Misturar os reagentes gentilmente com a pipeta;
11. Iniciar a corrida no termociclador sob as seguintes condições para um fragmento de ± 1200 pb:

**Tabela 2:** Configuração para o termociclador para o linearização d vetor **pBBR1MCS-2:**

Passo		Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial		98 °C	10 minutos
Desnaturação	30 ciclos	98 °C	10 segundos
Anelamento		65 °C	30 segundos
Extensão		72 °C	3 minutos
Extensão final		72 °C	2 minutos


Final	4 °C	∞
-------	------	---


12. Ao fim das PCRs, correr um gel a 1,2% de agarose e 0,5 TBE ou TAE, com 5 µL do produto da reação, 1 uL de corante Diamond Dye diluído na concentração 1:100 e uL de xilenol.
13. Verificar a concentração do DNA amplificado utilizando Nanodrop.
14. Correr gel utilizando o ladder [Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder | NEB](#) ou um Lambda digerido com PstI.
15. As amostras que apresentarem banda do tamanho esperado têm o plasmídeo inserido corretamente.
16. O controle negativo não pode ter nenhuma banda.
17. Utilizar as bactérias dos quadrantes em que houve banda no gel para experimentos posteriores ou preservação.

**Notas:**

- A **Tabela 2** foi realizada considerando as recomendações do fabricante do kit, tamanho do vetor e temperaturas de anelamento dos primers. Com a alteração de qualquer uma dessas variáveis, o protocolo também deve sofrer alterações.

**Material de referência:**

- [Q5® High-Fidelity 2X Master Mix | NEB](#)
- [Protocol for Q5® High-Fidelity 2X Master Mix | NEB](#)
- [Simple Cloning by Prolonged Overlap Extension-PCR with Application to the Preparation of Large-Size Random Gene Mutagenesis Library in Escherichia coli - PubMed \(nih.gov\)](#)
-  [How to Set Up a PCR](#)

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P13</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Matheus Araujo</b>
<b>ATIVIDADE: Cultivo de expressão, induzido por IPTG (expressão com peptídeo sinal)</b>		

**Objetivos:** Orientar o cultivo e indução por IPTG de *E. coli* BL21 (D3) para expressão de peptídeos antimicrobianos de modo que se apresentem em sua forma solúvel.

**Materiais e reagentes:**

- Tubo falcon
- Alça em loop
- Meio de Cultivo
- Placas de seleção com colônias isoladas
- Cubetas
- Microtubos
- IPTG (X)
- Ponteiras de 1000 µL
- Micropipeta 1000 µL


**Equipamentos:**

- Shaker
- Espectrofotômetro
- Cabine de Segurança Biológica

**Procedimentos:**

As placas com cultivo em meio sólido devem ser previamente inoculadas e incubadas overnight. Realize um pré cultivo overnight (8-12 h) de 4 ml de meio lb com o antibiótico apropriado, e uma colônia isolada da bactéria de expressão a 37°C e 250 RPM;

1. Após o pré-cultivo inicie um cultivo de 30 ml em um erlenmeyer de 250 ml, para isso utilize como inóculo 300 µL do pré cultivo, a 37°C e 250 RPM;
2. Após duas horas de incubação faça a verificação da densidade óptica (OD) a 600 nm utilizando o espectrofotômetro;
3. Retire 2 ml de cultivo para quantificação;
4. Faça novas medições a cada 30 min ou uma hora, quando o cultivo atingir 0,6-0,7, faça a indução de expressão adicionando IPTG a 0,8 mM de

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P13</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 0/0/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por: Matheus Araujo</b>
<b>ATIVIDADE: Cultivo de expressão, induzido por IPTG (expressão com peptídeo sinal)</b>		


<p>concentração final;</p> <p>5. Retorne ao cultivo para incubadora com novos parâmetros, 28°C e 200 RPM por 8-12 h, se necessário estenda o cultivo em temperatura e rotação reduzida;</p> <p>6. Ao fim do cultivo realize a purificação.</p>
--

#### NOTAS:

- .

#### FONTES:

[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959203004333?casa\\_token=XyynJ7ijJkMAAAAA:trJcxq2UASX2rJbmq-VS1fqpKvIUVPv6fhmQxwkJQ6gFK7UsONX75kJ-u9CgVlvKHBr0FhOVqzQSTg#TBL1](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959203004333?casa_token=XyynJ7ijJkMAAAAA:trJcxq2UASX2rJbmq-VS1fqpKvIUVPv6fhmQxwkJQ6gFK7UsONX75kJ-u9CgVlvKHBr0FhOVqzQSTg#TBL1)

	<b>PROCEDIMIENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P00</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 23/07/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Extracción de DNA en gel</b>		

**Objetivos:** Extracción de DNA en gel utilizando [Monarch® DNA Gel Extraction Kit | NEB](#)

**Materiales y reactivos:**

- Monarch® DNA Gel Extraction Kit | NEB
- Pipetas
- Punteras
- 

**Equipamientos:**

- Centrífuga


**Procedimientos:**

Todos los pasos de centrifugación deben realizarse a 16.000 x g (alrededor de 13.000 RPM en una microcentrífuga típica). Esto garantiza que todos los rastros de tampón se eluyan en cada paso.

1. Cortar el fragmento de ADN que se va a purificar del gel de agarosa utilizando una hoja de afeitar, bisturí u otra herramienta de corte limpio. Tenga cuidado para recortar el exceso de agarosa. Transfiera a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y pese la porción de gel.

Nota: Es común usar luz ultravioleta para visualizar el corte, pero el tiempo de exposición debe ser lo más corto posible para minimizar el daño al ADN. Utilice rayos UV de onda larga cuando sea posible, ya que las longitudes de onda más cortas provocan un daño mayor. Además, recorte el exceso de agarosa del perímetro de la banda para minimizar la cantidad de tampón de disolución necesaria y reducir el tiempo necesario para extraer el ADN.

2. Agregue 4 volúmenes de tampón de disolución de gel Monarch al tubo con la porción de gel (por ejemplo, 400 ul de tampón por 100 mg de agarosa). Si la porción de gel es >150 mg, considere reducir la cantidad de tampón de disolución de gel a 3 o 3,5 volúmenes para minimizar la sal de guanidina presente en el flujo de trabajo.

	<b>PROCEDIMIENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P00</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 23/07/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Extracción de DNA en gel</b>		

Nota: Si el peso del fragmento de gel cortado es <50 mg colocarle un poco más de gel hasta acercarse a ± 100 mg, para que la extracción de mejor resultado. Si el volumen de la muestra disuelta supera los 800 µl, la carga de la muestra en la columna debe realizarse en varias rondas para no exceder las limitaciones de volumen de la columna de centrifugación.

3. Incubar la muestra entre 37 y 55 °C (normalmente 50 °C), invirtiendo periódicamente hasta que la porción de gel se disuelva por completo (generalmente entre 5 y 10 minutos).

Nota: Para fragmentos de ADN > 8 kb, se deben agregar 1,5 volúmenes adicionales de agua después de disolver el corte para mitigar la unión más estrecha de piezas más grandes de ADN (p. ej., corte de gel de 100 mg: 400 µl de tampón de disolución de gel: 150 µl de agua ). Si no se disuelve toda la agarosa, se reducirá el rendimiento de la recuperación debido a una extracción incompleta del ADN y a la posible obstrucción de la columna por partículas de agarosa.

4. Inserte la columna en el tubo de recolección y cargue la muestra en la columna. Centrifugue durante 1 minuto y luego deseche el líquido fluido.

Para ahorrar tiempo, el giro se puede reducir a 30 segundos.


Si utiliza un colector al vacío\* en lugar de centrifugación, inserte la columna en el colector y encienda el vacío. Deje que la solución pase a través de la columna y luego apague la fuente de vacío.

5. Vuelva a insertar la columna en el tubo de recolección. Agregue 200 µl de tampón de lavado de ADN y centrifugue durante 1 minuto. Descartar el flujo continuo es opcional.

Si utiliza un colector de vacío, agregue 200 µl de tampón de lavado de ADN y encienda el vacío. Deje que la solución de la columna pase a través de la columna y luego apague la fuente de vacío.

6. Repita el lavado (Paso 5).
7. Transfiera la columna a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml. Tenga cuidado para asegurarse de que la punta de la columna no haya entrado en contacto con el flujo. En caso de duda, vuelva a centrifugar durante 1 minuto antes de colocarlo en un tubo de microcentrífuga limpio.

Si utiliza un colector de vacío: dado que las configuraciones de vacío pueden variar, se recomienda una centrifugación de 1 minuto antes de la elución para garantizar que no se

	<b>PROCEDIMIENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>Código: P00</b>
	<b>Syn Fronteras</b>	<b>Data: 23/07/2024</b>
	<b>Responsável: Lucas Ovelar</b>	<b>Conferido por:</b>
<b>ATIVIDADE: Extracción de DNA en gel</b>		

transfieran rastros de sal y etanol al siguiente paso.

\* Asegúrese de seguir las instrucciones del fabricante del colector para configurarlo y conectarlo correctamente a una fuente de vacío.

8. Agregue  $\geq 10 \mu\text{l}$  de tampón de elución de ADN al centro de la matriz. Espere 1 minuto y gire durante 1 minuto para eluir el ADN.

Nota: Los volúmenes de elución típicos son de 6 a 20  $\mu\text{l}$ . También se puede utilizar agua libre de nucleasas (pH 7–8,5) para eluir el ADN. El rendimiento puede aumentar ligeramente si se utiliza un volumen mayor de tampón de elución de ADN, pero el ADN estará menos concentrado. Para ADN de mayor tamaño ( $\geq 10 \text{ kb}$ ), calentar el tampón de elución a 50 °C antes de su uso puede mejorar el rendimiento. Se debe tener cuidado para garantizar que el tampón de elución se administre a la matriz y no a la pared de la columna para maximizar la eficiencia de la elución.

Para ahorrar tiempo, el giro se puede reducir a 30 segundos.

#### NOTAS:

- Referencia: [Monarch® DNA Gel Extraction Kit Protocol \(NEB #T1020\) | NEB](#)
- Solución de problemas: [Monarch DNA Gel Extraction Kit T1020 manual \(neb.com\)](#)
- Vídeo: [Tips for using the Monarch DNA Gel Extraction Kit | NEB](#)