

Escola Secundária da Maia

Projeto Anual 12º Ano - Ciências e Tecnologias

Biologia

Projeto P.A.C.M.A.N.

Beatriz Maria Ribeiro, José Bernardo Pacheco, Maria Carolina Filipe, Maria Eduarda Rocha
12º A 2024/2025

Professora responsável

Prof. Luisa Santos

Apoio Científico

Dr. Bruno Sarmiento, Investigadora Ana Sampaio e toda a equipa do i3s



Resumo

Ribeiro, Beatriz M^a(1); Pacheco, José Bernardo(1); Filipe, M^a Carolina(1); Monteiro, M^a Eduarda(1)
(1) - Escola Secundária da Maia, 12^ªA

O projeto P.A.C.M.A.N (PETase de Ação Contra Microplásticos Atualmente Nocivos) propõe uma solução inovadora para o problema da presença de microplásticos no interior do corpo humano. Em média, uma pessoa poderá consumir 5g de plástico por semana.(Wit & Bigaud, 2019). De acordo com Maciel F. L. et al. (2020), a descoberta da *Ideonella sakaiensis* tem potencial importância para a degradação de plásticos PETS; devido à enzima PETase sintetizada pela mesma. O projeto visa modificar geneticamente bactérias *E.coli* (bactéria natural à flora intestinal) para sintetizar PETase, com a introdução de um vetor de expressão do gene da enzima proveniente da *Ideonella sakaiensis*. Em laboratório, com a parceria do I3S, foi verificada a sobrevivência das bactérias modificadas, e que estas expressam o gene da PETase. Ao observar se ocorre o processo de degradação química do plástico PET e formação de produtos, observar-se-á a funcionalidade da enzima. Nos passos finais, o projeto passará à fase de camuflagem da enzima (para que o organismo não a reconheça como exógena), e, finalmente, testar a possibilidade destas bactérias serem introduzidas no corpo humano, para assim digerir microplásticos que são ingeridos, antes de serem absorvidos para o meio interno. Os resultados obtidos irão corroborar a hipótese de introdução das bactérias no corpo, ou rejeitar esta experiência como solução para o problema.

Palavras-chave: PETase, microplásticos, *Ideonella sakaensis*, *Escherichia coli*, transfeção

1. Introdução

Os plásticos, polímeros sintéticos amplamente utilizados pela sua durabilidade e baixo custo, vêm acumulando-se no meio ambiente em proporções alarmantes. A fragmentação destes materiais origina microplásticos (MPs), definidos como partículas com menos de 5 mm, que hoje estão presentes desde regiões urbanas até ambientes remotos, como os oceanos Ártico e Antártico (Waller et al., 2017; Peeken et al., 2018). A origem dos MPs pode ser primária, oriunda de produtos como cosméticos e fibras têxteis, ou secundária, pela degradação de macrolásticos por abrasão física e radiação UV (Cunha et al., 2020a; 2020b).

Estas partículas, devido ao seu tamanho reduzido, são facilmente ingeridas por organismos marinhos e transferidas pela cadeia trófica, acumulando contaminantes químicos e biológicos, afetando a expressão genética, a toxicidade e a mortalidade de espécies aquáticas (Wright et al., 2013; Besseling et al., 2015; Lagarde et al., 2016; Bergami et al., 2017). O impacto dos MPs já foi comprovado em organismos de importância ecológica e econômica, como peixes marinhos destinados ao consumo humano (Silva, 2020). Além disso, os MPs já foram encontrados na placenta humana, indicando uma penetração sistêmica (Ragusa et al., 2021).

A ingestão de MPs pelo ser humano pode ocorrer por meio da alimentação e da água, e ainda que os seus efeitos a longo prazo não estejam completamente esclarecidos, evidências apontam para impactos inflamatórios e imunológicos relevantes (Pereira et al., s.d.; de Almeida Carvalho et al., 2024). Diante da limitada eficácia dos sistemas de tratamento de águas residuais, que não conseguem reter adequadamente MPs (Sun et al., 2019), é urgente o desenvolvimento de estratégias inovadoras e sustentáveis de mitigação.

É nesse contexto que se insere o projeto **P.A.C.M.A.N (PETase de Ação Contra Microplásticos Atualmente Nocivos)**. A proposta apresenta uma solução biotecnológica, com o objetivo principal de neutralizar, diretamente no organismo humano, os efeitos nocivos causados pela ingestão de microplásticos. Por meio da modificação genética de cepas da bactéria *Escherichia coli*, pretende-se expressar a enzima PETase no intestino, permitindo a degradação dos microplásticos *in situ*, ou seja, antes de serem absorvidos, acumularem-se e causar danos à saúde.

A PETase, enzima originalmente produzida pela bactéria *Ideonella sakaiensis*, possui a capacidade de degradar o polímero PET (polietileno tereftalato) em compostos mais simples e potencialmente menos nocivos, como o MHET (Vasconcelos, 2021). Ao adaptar essa atividade enzimática para atuar dentro do corpo humano, o projeto busca reduzir a carga tóxica destas partículas, mitigando os riscos sistêmicos e prevenindo a bioacumulação crônica.

O grande diferencial do projeto reside na sua abordagem preventiva e terapêutica, integrando avanços da biologia sintética à promoção da saúde humana e à proteção dos ecossistemas marinhos. O P.A.C.M.A.N visa, assim, construir um protótipo funcional e seguro, testando não apenas a eficiência da degradação dos MPs, mas também a biocompatibilidade da enzima e o metabolismo dos subprodutos gerados. Em colaboração com o Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S), o projeto responde de forma inovadora e viável aos desafios impostos pela poluição marinha.

2. Objetivos do projeto

2.1. Objetivos gerais

Desenvolver um protótipo biotecnológico baseado em bactérias geneticamente modificadas para expressar a enzima PETase no intestino humano, visando a degradação *in situ* de microplásticos ingeridos e a prevenção dos seus efeitos tóxicos no organismo.

2.2. Objetivos específicos

O primeiro passo do projeto, e até o momento a única fase concluída, consiste na modificação genética de cepas de *Escherichia coli* para que possam expressar de forma estável a enzima PETase, responsável por degradar o plástico PET.

Em seguida, será avaliada a atividade enzimática da PETase frente a partículas de microplásticos do tipo PET. Esta etapa permitirá observar a eficiência da degradação e a formação de produtos da reação química do processo.

Posteriormente, será realizado um estudo sobre a estabilidade das bactérias modificadas, a sua capacidade de colonização intestinal e os parâmetros de biossegurança necessários para garantir que o seu uso não represente riscos à saúde. Paralelamente, serão investigados os efeitos fisiológicos e imunológicos da presença dos subprodutos da degradação, como o MHET, com o intuito de compreender as suas interações com o organismo humano.

Por fim, será elaborado e testado um protótipo que simule o funcionamento do sistema proposto. Esse protótipo servirá para validar a aplicação terapêutica do projeto, oferecendo uma solução biotecnológica viável para combater a acumulação microplástica no interior do corpo humano.

3. Metodologia

3.1 Transfeção da PETase em *E. coli*

Esta etapa foi realizada por meio da introdução de um plasmídeo contendo o gene da enzima PETase na bactéria, permitindo que ela expresse essa enzima ao crescer em meio de cultura. Em seguida, foi feita a semeadura em placa de Petri com meio de ágar, a fim de selecionar colônias visíveis.

Na sequência, realizou-se o crescimento das bactérias em meio LB (Luria-Bertani), um caldo nutritivo que favorece o crescimento e permite a produção em maior escala da PETase. Esta etapa envolveu um pré-inóculo, onde uma colônia foi selecionada da placa e inoculada em meio líquido durante a noite, seguido pelo inóculo propriamente dito, em que a cultura foi transferida para uma maior quantidade de meio LB, promovendo o crescimento exponencial das bactérias.

3.2 Medição da densidade ótica

A densidade ótica (OD) foi então monitorada utilizando um espectrofotômetro, indicando a concentração celular no meio. Esta análise é crucial para determinar o melhor momento de induzir a expressão da PETase. Para isso, foi utilizado o IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo), um indutor químico que se liga ao repressor lacI, liberando o promotor lac e ativando a transcrição do gene PETase. A indução foi realizada quando as células atingiram a OD ideal, assegurando que estivessem em crescimento ativo e, portanto, produzissem maior quantidade da proteína.

3.3 Eletroforese

Para confirmar a expressão da PETase, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida. Esta técnica baseia-se na migração de proteínas num campo elétrico através de uma matriz porosa, no caso, o gel. As proteínas são previamente tratadas com SDS, um detergente aniônico que as desnatura e confere carga negativa proporcional ao seu tamanho. Assim, ao serem aplicadas no gel e submetidas à corrente elétrica, as proteínas migram em direção ao pólo positivo, sendo separadas exclusivamente pelo seu peso molecular. Quanto menor a proteína, maior a sua mobilidade no gel. Posteriormente, o gel foi corado com Azul de Coomassie (Figura 2), um corante que se liga às proteínas e permite visualizar a presença da PETase através da observação de uma banda na região esperada do gel (Figura 3). Essa confirmação marca a conclusão da etapa de produção e verificação da enzima, que será utilizada nas próximas fases do projeto para os testes de degradação de microplásticos.



Figura 1. Pipetagem das amostras para o poço do gel, para a eletroforese. Neste caso, estava a ser pipetado o marcador de densidade.



Figura 2. Agitação de 1h do gel após 1h30 das amostras em eletroforese em conjunto com o corante Azul de Coomassie para se observar os resultados da eletroforese.

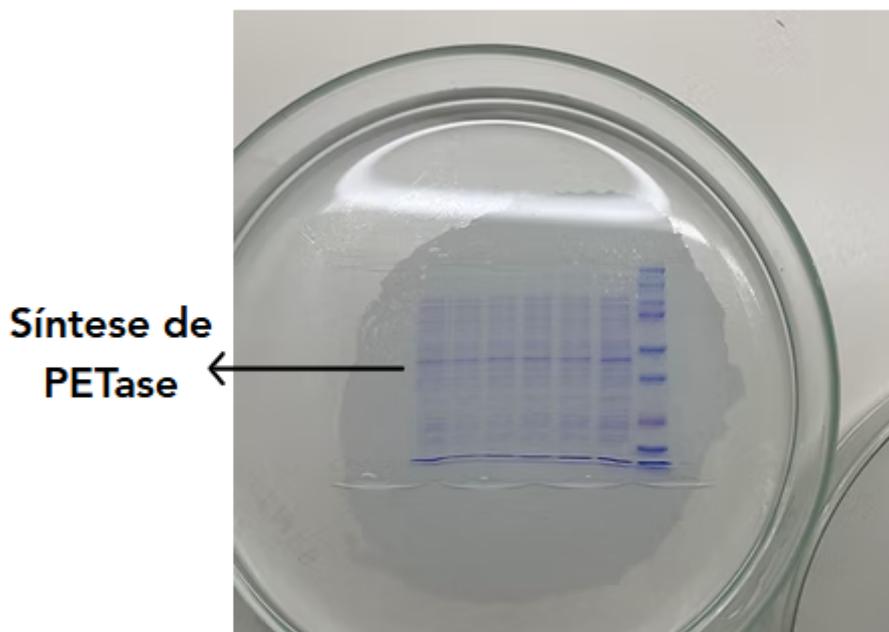


Figura 3. Eletroforese em gel evidenciando a expressão da enzima PETase por *E. coli* transformada. A banda correspondente à PETase está destacada na faixa de peso molecular previsto.

4. Discussão/Conclusão

O presente trabalho permitiu validar a etapa inicial do projeto P.A.C.M.A.N, confirmando a modificação genética bem-sucedida de *Escherichia coli* para expressão da enzima PETase. A confirmação da presença da enzima foi realizada por meio da eletroforese em gel SDS-PAGE e coloração com Azul de Coomassie, evidenciando uma banda compatível com o peso molecular da PETase esperada. Este resultado representa um passo promissor dentro da proposta do projeto, indicando que a enzima pode ser sintetizada pelas bactérias modificadas.

A indução com IPTG mostrou-se eficaz, permitindo controlar o momento da expressão enzimática após o crescimento celular ideal. Essa capacidade de regulação é essencial para futuras aplicações em ambientes biológicos, onde a expressão precisa ser eficiente e segura. No entanto, não foram ainda realizados os testes de degradação do PET para verificar a funcionalidade da enzima produzida pelas *E. coli* modificadas nem estudos de biocompatibilidade com o hospedeiro, etapas que permanecem como metas futuras.

Na fase seguinte, estava prevista a encapsulação das bactérias para garantir sua estabilidade, viabilidade e liberação controlada no tubo digestivo. Embora esta etapa não tenha sido iniciada, duas metodologias estão atualmente em avaliação como alternativas viáveis. A técnica Layer-by-Layer (LbL), baseada na deposição alternada de polímeros sobre núcleos de carbonato de cálcio posteriormente dissolvidos com EDTA, foi destacada em estudos por preservar a viabilidade celular e controlar a porosidade das cápsulas (Zhao et al., 2012; Sukhorukov et al., 2001; Reis, 2021). A segunda metodologia considerada é a liofilização, técnica que envolve o congelamento e subsequente secagem por sublimação, podendo ser associada a encapsulantes como alginato de cálcio e crioprotetores como trealose, eficazes na preservação da morfologia e viabilidade de *E. coli* (Man et al., 2001).

Apesar de o protótipo ainda não ter sido construído, os resultados obtidos sustentam a viabilidade do conceito e apontam caminhos sólidos para seu desenvolvimento. O avanço técnico registado até o ponto de interrupção do projeto reforça o caráter inovador da proposta e a relevância de soluções baseadas em biotecnologia para o enfrentamento da poluição plástica. O P.A.C.M.A.N apresenta potencial para se tornar uma abordagem disruptiva, capaz de integrar saúde pública, inovação científica e preservação ambiental, alinhando-se aos princípios defendidos pelo Concurso Atlântico Júnior.

5. Referências bibliográficas

- Ángel Criado, M. (2018, Outubro 29). Os microplásticos chegaram ao intestino humano. *EL PAÍS Brasil*, (Espanha).
brasil.elpais.com/brasil/2018/10/22/ciencia/1540213637_935289.html
- Botelho, V. (n.d.). Microplásticos da poluição podem contaminar o sangue por meio da alimentação e respiração. *JORNAL DA USP*.
<https://jornal.usp.br/atualidades/microplasticos-da-poluicao-podem-contaminar-o-sangue-por-meio-da-alimentacao-e-respiracao/>
- Braun, T., Ehrlich, L., Henrich, W., & Koepfel, S. (2021). Detection of Microplastic in Human Placenta and Meconium in a Clinical Setting. *13(7)*.
<https://www.mdpi.com/1999-4923/13/7/921#metrics>
- de Almeida Carvalho, D., Dieile da Silva, B., Pereira de Lucena, É., de Paula de Faria, I., & Carvalho Grijó, J. (2024, 07 01). CONTAMINAÇÃO INVISÍVEL. *Revista Tópicos*.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.12614821>
- European Patients' Academy on Therapeutic Innovation. (2015, Agosto 04). *Criar um medicamento. Fase 3 e 4: Escolher uma molécula ou uma molécula líder*. EUPAT.
toolbox.eupati.eu/resources/criar-um-medicamento-fase-3-e-4-escolher-uma-molecula-ou-uma-molecula-lider/?lang=pt-pt
- Kaushik, A., Singh, A., Gupta, K., & Mishra, Y. K. (2024). Nano/micro-plastic, an invisible threat getting into the brain. *361*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653524012736>
- Maciel, F. L., Souza, C. B., Vieira, C. B., Salbego, É. L., Balzan, G., Da Ré, Í., & Sávio, V. (2020). *Microrganismos com Potencial Biotecnológico* (1st ed.).
<https://www.uergs.edu.br/upload/arquivos/202101/25095646-e-book-microrganismos-com-potencial-biotecnologico.pdf#page=48>
- Moura, D., Mendes, I., Aníbal, J., & Gomes, A. (2023). *Micro e Nanoplásticos: um Macroproblema* (1st ed.).
<https://www.cima.ualg.pt/media/attachments/2024/02/02/livro-micro-nanoplasticos.pdf#page=115>
- Pereira, M. U., Lima, P. H. O., Constantino, C. F., Silva, L. R., Kuschnir, F. C., Goudouris, E. S., Solé, D., & Hass, N. (n.d.). Impacto dos Microplásticos na Saúde. *Impacto dos Microplásticos na Saúde*, 15.

https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/24403d-GPO_-_Impacto_Microplasticos_na_Saude.pdf?utm_source

Vargas, L. (n.d.). BIOLOGIA SINTÉTICA APLICADA À DEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS.

dspace.unila.edu.br/server/api/core/bitstreams/02282fe8-7035-46e0-b25d-277f3ce8ed3b/content#page=17

Vasconcelos, S. (2021). Engenharia Virtual da PETase termoestável da Ideonella Sakaiensis para degradação altamente eficiente do PET.

repositorio.ufms.br/retrieve/1834925b-acee-4ce9-9f3e-6e99a80cab51/Stephano%20%281%29%20%281%29.pdf#page12