

EFETIVIDADE NA RECICLAGEM DO GEL DE AGAROSE EM LABORATÓRIO COMERCIAL

Daniel Dávida¹
Paulo Roberto Rodrigues Ramos²

RESUMO

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica frequentemente utilizada em laboratórios de biologia molecular. Esta técnica possibilita a separação de moléculas de ácidos nucleicos. A agarose é um polissacarídeo obtido das paredes celulares de algas marinhas tendo um custo elevado. Após a sua utilização, o produto em forma de gel é considerado um contaminante ambiental e necessita de descarte especializado. O produto obtido apresentou o rendimento total de 81% e foi testado quanto a sua eficiência. Os testes demonstraram que a agarose reciclada apresenta resultados idênticos quando comparados aos obtidos em géis produzidos com agarose comercial.

Palavras-chave: Agarose, eletroforese, resíduo laboratorial, biologia molecular.

EFFECTIVENESS IN RECYCLING AGAROSE'S GEL IN COMMERCIAL LABORATORY

ABSTRACT

The agarose gel electrophoresis is a often technique used by molecular biology laboratories. This techniqne allows acid nucleic molecules separation. The agarose is a polysaccharide obtained from celular walls of seaweed having a high cost. After your use, the product in gel form is considered enviornment's hazardous and needs specialized waste. The obtained product showed a yield of 81% and it was tested as to yours efficiency. Tests showed that recycled agarose presents identical results compared with gels made from commercial agarose.

Key-words: Agarose, electrophoresis, laboratorial waste, molecular biology.

EFICACIA DEL RECICLAJE DE GEL DE AGAROSA EN LABORATORIO COMERCIAL

RESUMEN

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica usada con frecuencia en laboratorios de biología molecular. Esta técnica permite la separación de moléculas de ácido nucleico. La agarosa es un polisacárido obtenido a partir de las paredes celulares de las algas con un alto costo. Después de su uso, el producto en forma de gel, se considera un contaminante ambiental que debe ser desechado de forma adecuada. El rendimiento total del producto obtenido fue de 81% y el mismo fue estudiado para determinar su eficacia. Pruebas de laboratorio demostraron que la agarosa reciclada posee propiedades idénticas al comparar con otros geles de agarosa producidos comercialmente.

Palabras clave: Agarosa, electroforesis, residuos de laboratório, biologia molecular.

¹ Universidade De São Paulo. Contato principal para correspondência.

² Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

INTRODUÇÃO

Resíduo é um conceito vinculado a um contexto tecnológico, de aprimoramento da produção, portanto cultural e histórico (1).

Todos os dias lança-se à natureza o desafio de ela ter que assimilar novos produtos artificiais, ultrapassando os limites da capacidade dos fluxos de energia e seus respectivos ciclos naturais (2).

O gerador do resíduo, ao tornar-se adepto a um programa de reciclagem, transparece a imagem de que possui um programa de gerenciamento de resíduos aperfeiçoado. A reciclagem surge como um reflexo que aspirou à melhoria contínua.

Um modelo de gestão bem estruturado tem como cunho primordial a prevenção da poluição. Esta por sua vez, estimula a empresa a elaborar novas estratégias para a melhoria sistemática de seus processos, resultando no aumento da produtividade (3).

Para este trabalho, foi estudada a reciclagem do gel de agarose utilizado em análises eletroforéticas em laboratórios de biologia molecular. O gel torna-se um resíduo após o seu uso e depende de serviço especializado para seu descarte uma vez que é classificado como resíduo de serviço de saúde.

A agarose é um polissacarídeo linear obtido das paredes celulares de algas vermelhas da classe Rodophyceae, principalmente dos gêneros *Laurencia*, *Gracilaria* e *Gelidium*. Destaca-se principalmente o seu uso nas áreas ligadas à farmácia, setor alimentício e biotecnologia (4).

No Brasil a importação da agarose tem se demonstrado diminuta, sendo isso uma consequência ao seu alto valor (5).

Segundo a Agencia Nacional De Vigilância Sanitária por meio da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N°306 – De 7 De Dezembro De 2004, o gel é caracterizado no Grupo A1, item 5.1. Um tipo de resíduo, no qual, estão presentes materiais resultantes de atividades genéticas (6).

O presente trabalho foi desenvolvido numa associação do Centro de Isótopos Estáveis Aplicados às Ciências da Vida (CIE), IBB, UNESP Botucatu com o laboratório Avex Tecnologia Biomolecular e teve como objetivo verificar a eficácia da agarose reciclada quanto aos resultados de sexagem de aves, comparando-se com os da agarose comercial.

MATERIAIS E MÉTODOS

O processo de reciclagem

No presente trabalho foram empregados vinte géis de agarose comercial, a 2% de concentração, medindo 6x11cm. Na etapa inicial da reciclagem, aumentou-se o tempo de corrida da eletroforese (110V) em 10 minutos, promovendo a migração dos fragmentos de DNA para o polo positivo, até que saíssem dos géis.

Posteriormente, os géis foram fragmentados em frações circulares de 1,5cm de diâmetro e acondicionados num béquer com capacidade para um litro. Foram cobertos com água de torneira em temperatura ambiente, sem agitação, até a marcação de 1000mL. Estes fragmentos passaram por troca de água em igual volume a cada vinte e quatro horas, permanecendo imersos por três dias.

No quarto dia a água foi removida por escoamento, sendo acrescentado igual volume de água destilada para a completa remoção de sais. O béquer permaneceu em temperatura ambiente por 2 dias, sem agitação. Posteriormente essa água foi removida por escoamento e os fragmentos encaminhados para a secagem em estufa de circulação forçada no Centro De Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências UNESP de Botucatu.

Os fragmentos permaneceram em estufa de circulação forçada, Marconi, modelo MA 035 a 60°C por trinta e seis horas em graal de porcelana, sendo posteriormente acondicionados em frascos específicos para a moagem, onde receberam esferas de aço de 0,5 cm de diâmetro e foram acondicionados em moinho criogênico, Spex Sample Prep, modelo Geno/Grinder 2010, até a completa transformação em pó, obtendo-se a agarose reciclada.

Teste de efetividade da reciclagem

As amostras de sangue utilizadas para esse trabalho foram coletadas em papel do tipo FTA. Após os processos de extração e purificação com reagente Whatman, as amostras foram combinadas a reações bioquímicas de PCR e posteriormente foram amplificadas (7).

Preparam-se os géis, pesando-se 0,60g de agarose comercial e reciclada, as quais foram transferidas para dois béqueres com capacidade de 200mL.

Em seguida foram tomados 30mL de solução tampão TBE, para cada béquer, levados ao forno de micro-ondas, Philco, modelo PMS22N3 e aquecidos em potência máxima por trinta segundos. Após a dissolução da agarose, foram adicionados aos géis 1,5µL do corante Neotaq Brilliant Green. Os géis assim preparados foram vertidos nas bandejas previamente montadas e mantidas em temperatura ambiente até a completa gelificação.

Em cada gel foram aplicadas amostras de DNA de aves da espécie *Nymphicus hollandicus*, previamente preparadas a partir de amostras de sangue fornecidas pelo laboratório AVEX. As amostras em questão foram previamente sexadas de modo que se aplicaram 5µL em cada ponto de aplicação, sendo cinco machos e cinco fêmeas. O último ponto de aplicação foi empregado como controle negativo de contaminação. Os géis preparados com agarose reciclada foram montados com três repetições.

Ambos os géis foram colocados na mesma cuba, imersos em solução tampão TBE e submetidos à eletroforese cujos parâmetros foram 110V por trinta minutos. Do início ao final da corrida a amperagem variou de 70mA a 100mA.

Finalizada a eletroforese, os géis foram removidos da cuba, colocados num transluminador, UV, Crystal BioGlow, modelo ZT-21 e inspecionados quanto à presença de bandas de fragmentos de DNA, mediante exposição à luz ultravioleta. Uma vez verificada a presença das bandas os géis foram fotografados com uma câmera digital, Samsung, modelo ES65 para arquivamento da imagem e análises das mesmas.

As imagens assim obtidas foram investigadas quanto às mobilidades relativas (rfs) dos fragmentos de DNA encontrados em ambos os géis de agarose, empregando-se o pacote computacional GEL ANALYZER 2010.

Foi empregada a estatística descritiva para se avaliar a mobilidade relativa das bandas de fragmentos de DNA nos géis obtidos. Os dados quanto às mobilidades relativas foram analisados mediante o teste de correlação com o objetivo de comparar os géis preparados com agarose reciclada e comercial.

RESULTADOS

A sexagem de amostras de *Nymphicus hollandicus* em agarose comercial e em agarose reciclada, mostrou-se efetiva, visto que as amostras de fêmeas revelaram duas bandas, caracterizando a heterozigose dos cromossomos Z e W, já os machos apresentaram apenas uma banda referente à homozigose do cromossomo Z (Figura 1).

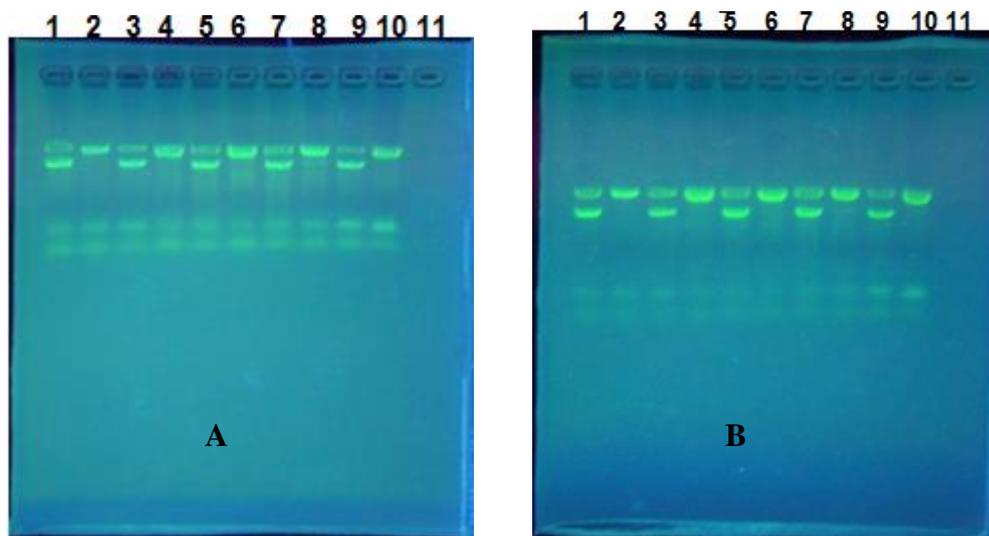


Figura 1. Gel de agarose comercial (A) e reciclada (B) a 2% em tampão TBE a 10%, com tempo de corrida de trinta minutos, corado com Neotaq Brilliant Green, demonstrando a existência de duas bandas nas amostras 1,3,5,7 e 9 caracterizando os cromossomos Z e W das fêmeas e uma banda nas amostras 2,4,6,8 e 10 caracterizando o cromossomo Z em homozigose de machos.

Na Tabela 1 estão descritos os dados referentes às mobilidades relativas obtidas por eletroforese em gel de agarose comercial, apresentando as bandas 1 e 2 referentes aos cromossomos Z e W na sexagem de *Nymphicus hollandicus*.

Tabela 1. Dados referentes às mobilidades relativas das bandas de fragmentos de DNA, referentes aos cromossomos Z (banda 1) e W (banda 2), obtidas em gel de agarose comercial na concentração de 2%, tampão TBE 10%.

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Banda 1	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
Banda 2	0,20		0,20		0,20		0,20		0,20	

Na Tabela 2 estão dispostos os valores obtidos na estatística descritiva referentes às mobilidades relativas obtidas por eletroforese em gel de agarose comercial, apresentando as bandas 1 e 2 referentes aos cromossomos Z e W na sexagem de *Nymphicus hollandicus*.

Tabela 2. Estatística Descritiva referente aos dados de mobilidade relativa das bandas de fragmentos de DNA, referentes aos cromossomos Z (banda 1) e W (banda 2), obtidas em gel de agarose comercial na concentração de 2%, tampão TBE 10%.

	Média	Desvio Padrão	Variância
Banda 1	0,17	$2,93 \times 10^{-17}$	$8,56 \times 10^{-34}$
Banda 2	0,20	0,00	0,00

Na Tabela 3 estão descritos os dados referentes às mobilidades relativas obtidas por eletroforese em gel de agarose reciclada, apresentando as bandas 1 e 2 referentes aos cromossomas Z e W na sexagem de *Nymphicus hollandicus*.

Tabela 3. Dados referentes às médias de mobilidades relativas das bandas de fragmentos de DNA, referentes aos cromossomas Z (banda 1) e W (banda 2), obtidas em gel de agarose reciclada na concentração de 2%, tampão TBE 10%.

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Banda 1	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Banda 2	0,35		0,35		0,35		0,35		0,35	

Na Tabela 4 estão dispostos os valores obtidos na estatística descritiva referentes às mobilidades relativas obtidas por eletroforese em gel de agarose reciclada, apresentando as bandas 1 e 2 referentes aos cromossomas Z e W na sexagem de *Nymphicus hollandicus*.

Tabela 4. Estatística Descritiva referente aos dados das médias das mobilidades relativas das bandas de fragmentos de DNA, referentes aos cromossomas Z (banda 1) e W (banda 2), obtidas em gel de agarose reciclada na concentração de 2%, tampão TBE 10%.

	Média	Desvio Padrão	Variância
Banda 1	0,30	$5,85 \times 10^{-17}$	$3,42 \times 10^{-33}$
Banda 2	0,35	0,00	0,00

Na Tabela 5 estão apresentados os valores obtidos nas correlações referentes às mobilidades relativas obtidas por eletroforese em géis de agarose comercial e reciclada, apresentando as bandas 1 e 2 referentes aos cromossomas Z e W na sexagem de *Nymphicus hollandicus*.

Tabela 5. Valores de correlação dos dados das mobilidades relativas das bandas de fragmentos de DNA, referentes aos cromossomas Z (banda 1) e W (banda 2), obtidas em gel de agarose comercial e reciclada na concentração de 2%, tampão TBE 10%.

	Reciclada Comercial	
	Banda 1	Banda 2
Banda 1	1,00	-
Banda 2	-	1,00

DISCUSSÃO

Os métodos criados e conduzidos nesse trabalho tiveram como suporte a comparação com os trabalhos revisados (8) (9). Contudo, algumas alterações introduzidas na metodologia empregada no presente trabalho demonstraram que a reciclagem da agarose teve um resultado bastante positivo.

Na primeira etapa do processo, optou-se por aumentar o tempo da eletroforese, garantindo então que eventuais contaminações devido à permanência de fragmentos de DNA fossem evitadas. Essa prática assegurou que a agarose reciclada tornasse-se isenta de contaminações oriundas de materiais genéticos.

Nos trabalhos revisados, a remoção do material genético foi feita por difusão em água. Quando comparadas as metodologias, verificou-se que a remoção pela extensão do tempo da eletroforese foi mais eficiente, pois foi mais rápida (8) (9).

Para o processo seguinte, a fragmentação, procurou-se padronizar um tamanho de fragmento adequado para a etapa de eluição. Os fragmentos foram convenientes para o processo de difusão de possíveis contaminantes, devido à área de contato com a água.

Ainda como uma garantia de qualidade, os fragmentos após as etapas de eluição foram conferidos novamente quanto à presença de material genético por meio da visualização dos mesmos no transiluminador UV. Nenhum resquício de DNA foi visualizado.

A etapa de desidratação teve como resultado fragmentos integralmente secos e, conseqüentemente, com tamanhos reduzidos, fatores ideais que contribuiriam para o processo de moagem. Observou-se, que a desidratação em estufa provida de circulação forçada, favoreceria o tempo do processo, visto que é um equipamento mais eficiente quando comparado a uma estufa normal (9).

A desidratação numa estufa que não dispõe de circulação de ar forçada é realizada no tempo de cinquenta e quatro horas (9). Para este trabalho, utilizando a estufa de circulação forçada de ar, foi possível reduzir o tempo para trinta e seis horas mantendo-se a mesma temperatura a qual foi utilizada como referência. Em relação ao moinho criogênico, o mesmo foi utilizado em virtude de também apresentar-se mais eficiente quando comparado a um moinho normal.

Os resultados das correlações apresentaram-se iguais a 1,00, o que certificou que a agarose reciclada possui a mesma eficiência da comercial.

Foi observado que as bandas de DNA nos géis reciclados tiveram mobilidade relativa maior do que as bandas de DNA no gel de agarose comercial. Esse fato pode ser explicado porque, provavelmente, os processos de eluição em água e eletroeluição tornaram a agarose reciclada livres de elementos presentes na agarose comercial. Isso lhe conferiu uma resistência ligeiramente menor, não alterando o resultado final.

CONCLUSÃO:

A agarose reciclada é tão eficiente quanto a comercial, quando empregada na sexagem de aves por técnicas moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Kuhen, A. Reciclando o cotidiano: O lixo como política pública e como representação social [dissertação][Internet]. Santa Catarina: Universidade Federal De Santa Catarina; 1994. [acesso em 12 abr 2016]. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/111944>.
2. Ferreira, J. A. Resíduos Sólidos e Lixo Hospitalar: Uma Discussão Ética. Solid Waste and Nosocomial Waste: An Ethical Discussion. Cad. Saúde Púb. [Internet] 1995. [acesso em 07 abr 2016]; 11 (2): 314–320. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/%0D/csp/v11n2/v11n2a14.pdf>.
3. Filho, J. S, Sicsú, A. Produção mais limpa: uma ferramenta da gestão ambiental aplicada às empresas nacionais [internet]. In: XXIII Encontro Nac. De Eng. de Produção; 2003; Ouro Preto. [acesso em 18 abr 2016]. Disponível em: http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGEP2003_TR1005_0001.pdf.

4. Vasconcelos, A. G, Araújo, K. V. D, Santana, L. DE A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: Uma revisão. Rev. Bra. Inov. Tecn. Saúde [Internet] 2015. [acesso em 20 abr 2016]; 27–51. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/reb/article/view/5898/5694>.
5. Cunha, P. L. R. DA, Feitosa, R. C. M. D. P. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: Uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. Quim. Nova [Internet] 2009. [acesso em 20 abr 2016]; 32 (3): 649-660. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/244750848_Polissacarideos_da_biodiversidade_brasileira UMA_oportunidade_de_transformar_conhecimento_em_valor_economico.
6. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Rdc nº 306, de 7 de dezembro de 2004 [Internet] 2004. [acesso em 07 mar 2016]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0306_07_12_2004.html.
7. Fridolfsson A.K, Ellegren H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. Jour. Avian Bio. [Internet] 1999. [acesso em 28 mar 2016]; 30:116-121. Disponível em: https://www.jstor.org/stable/3677252?seq=1#page_scan_tab_contents.
8. Palacios, G, Giménez, C, Garcia, E. Recycling agarose. Plant Mol. Bio. Rep. [Internet] 2000. [acesso em 28 mar 2016]; 18(1): 47-49. Disponível em: <http://www.nrc.ca/cisti/journals/ispmb/reporter.html>.
9. Reiniger L. R. S, Anthonisen D, Choer, E. Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. Ciên. Rural [Internet] 2004. [acesso em 28 mar 2016]; 34(5): 1603–1605. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/crural/article/view/17986/18828>.

Recebido em:

Aceito em: