

UNILEÃO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

PAULA GABRIELI DE SOUSA ALVES

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIA  
GRAM POSITIVA E ANÁLISE DE PUREZA E CONCENTRAÇÃO POR MEIO DE  
ELETROFORESE EM GEL.**

Juazeiro do Norte – CE  
2018

PAULA GABRIELI DE SOUSA ALVES

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIA  
GRAM POSITIVA E ANÁLISE DE PUREZA E CONCENTRAÇÃO POR MEIO DE  
ELETROFORESE EM GEL.**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

**Orientadora:** Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

**Coorientadora:** Esp. Francisca Alves dos Santos

PAULA GABRIELI DE SOUSA ALVES

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIA  
GRAM POSITIVA E ANÁLISE DE PUREZA E CONCENTRAÇÃO POR MEIO DE  
ELETROFORESE EM GEL.**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do  
Curso de Graduação em Biomedicina do Centro  
Universitário Leão Sampaio, em cumprimento  
às exigências para obtenção do grau de bacharel  
em Biomedicina.

**Orientadora:** Ma. Maria Karollyna do  
Nascimento Silva Leandro

**Coorientadora:** Esp. Francisca Alves dos  
Santos

**Data de aprovação:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>: Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro  
**Orientadora**

---

Prof<sup>ª</sup>: Esp. Francisca Alves dos Santos  
**Coorientadora**

---

Prof<sup>ª</sup>: Ma. Tassia Thaís Al Yafawi  
**Examinador 1**

---

Prof<sup>ª</sup>: Ma. Raira Justino Oliveira Costa  
**Examinador 2**

*Dedico esse trabalho aos meus pais Neide Sousa e Cicero Torres, que foram minha base, que além de me proporcionarem meus estudos sempre se fizeram presente em todos os momentos dessa jornada acadêmica.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades e abertura de caminhos que me proporcionou rumo para meu futuro.

É com enorme satisfação que agradeço aos meus pais Neide e Cícero por me incentivarem a nunca parar de estudar e sempre sonhar.

A minha orientadora Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro, por ter me ajudado a escolher esta incrível área para esta pesquisa.

A minha coorientadora que me mostrou toda a parte prática dos testes de uma forma tão enriquecedora que levarei para toda vida,

Fran e Karoll, vocês me ensinaram, compreenderam e me incentivaram a buscar ser melhor.

Aos meus irmãos Jonas e Raphael que sempre me ajudaram nessa caminhada longa e na vida.

Ao meu amor Davi Amorim que sempre me ouviu em momentos difíceis e me ajudou como pode a superar todos os obstáculos.

Aos meus amigos da faculdade para vida Júlio César, Karina Silva e Vanessa Lima que foram para mim a melhor equipe em que pude estar durante esse período de curso.

Cada pequena parte juntou-se e tornou possível o sonho de chegar ao final dessa etapa da minha vida, obrigada a todos!

# OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIA GRAM POSITIVA E ANÁLISE DE PUREZA E CONCENTRAÇÃO POR MEIO DE ELETROFORESE EM GEL.

Paula Gabrieli de Sousa Alves<sup>1</sup>, Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro<sup>2</sup>

## RESUMO

Este trabalho tem como objetivo otimizar protocolos de extração de Ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano no intuito de desenvolver metodologias mais práticas, rápidas e com menor custo, assim trará melhorias para o desenvolvimento de pesquisas e aplicações em rotina laboratorial tendo como base a dificuldade de estabelecer um método ideal que consiga extrair com ótima qualidade o DNA bacteriano em Gram positiva. O material e a cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* foram cedidos pelo Centro Universitário Leão Sampaio, onde também foram realizados os testes para extração de DNA. Os testes utilizados foram Dodecil sulfato de sódio (SDS); *Salting out*; Kit PROMEGA e CTAB/Fenol/clorofórmio e foram analisados por meio de Eletroforese em gel de agarose. Os melhores resultados foram mediante uso do Kit comercial da PROMEGA, o *Salting out* sem o uso da *Proteinase K* e o CTAB/fenol/clorofórmio, sendo que o *salting out* apresentou maiores vantagens em relação aos outros métodos por trazer rapidez, baixo custo, boa concentração de material extraído e não ser tóxico. Os testes moleculares para a extração do DNA de *Staphylococcus aureus* obtiveram êxito no geral, quando comparados questões como baixo custo, concentração extraída, nitidez das bandas na eletroforese e praticidade da realização. O melhor método para uma rotina laboratorial pequena ou para pesquisas futuras seria o *Salting out* sem a *proteínase K*, assim concluí-se que é possível obter uma ótima extração de DNA com métodos de menor complexidade e baixo custo.

**Palavras-chave:** Eletroforese. Extração de DNA. Otimização. *Staphylococcus aureus*.

<sup>1</sup> Discente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte - CE

<sup>2</sup> Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte - CE

## OPTIMIZATION OF PROTOCOLS OF DNA EXTRACTION IN POSITIVE GRAM BACTERIA AND ANALYSIS OF PURITY AND CONCENTRATION BY ELECTRODESPHERE IN GEL.

Paula Gabrieli de Sousa Alves<sup>1</sup>, Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro<sup>2</sup>

### ABSTRACT

This work has as goal to optimize bacterian DNA extraction protocols with the intent of obtaining quicker, cheaper and practical methods, which will make better development of researches and applications in lab routine, having as base the difficulty to establish an ideal method able to extract with great quality the bacterian DNA in positive Gram. The material and the bacterian strain *Staphylococcus aureus* were given by the Centro Universitário Leão Sampaio, where were also made the tests of DNA extract in which Dodecil sodium sulfate (SDS); salting out; Kit PROMEGA and CTAB/Phenol/Chloroform and were analysed with Electrophoresis with agarose gel. The best results were obtained through use of the commercial PROMETA kit; salting out without the use of *Proteinase K* and the CTAB/Phenol/Chloroform, in which the salting out has shown bigger advantages in relation with other methods, bringing quickness, low cost, better concentration of extracted material and not being toxic. Molecular tests for extraction of *Staphylococcus aureus* DNA obtained success, when compared with matters of low cost, good extracted concentration, nitid strains in electrophoresis and the practicity of realization the best method in a small lab routine or for future researches would be the salting out without *proteinase K*, after that, it's safe to assume that's possible to obtain a great DNA extraction with methods of lower complexity.

**Key words:** DNA extraction. Optimization. *Staphylococcus aureus*. Electrophoresis.

<sup>1</sup> Discente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte - CE

<sup>2</sup> Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte - CE

## 1 INTRODUÇÃO

Existem inúmeros testes para identificação do gênero e de espécie bacteriana, como as provas bioquímicas realizadas em laboratórios de microbiologia, porém a análise através de um método molecular agrupa mais informações do que apenas identificação podendo classificá-las em subtipos e também mapear características específicas com exatidão (BRASIL,2013).

Nos testes moleculares a escolha do método ideal é crucial para a extração do Ácido desoxirribonucleico (DNA), que por sua vez, será a base para que os testes sejam realizados com excelência, proporcionando maiores chances de obter boa qualidade e quantidade do DNA (CIBA-GEIGY, 1977).

Por existir uma dificuldade em estabelecer métodos manuais ideais para cada amostra, muitas vezes são escolhidos os *kits* comerciais que garantem maior confiabilidade de boa qualidade e pureza para análise, entretanto, a maior desvantagem é o alto custo de cada *kit* (LIPAY; BIANCO, 2015).

Outra dificuldade é a purificação do DNA bacteriano, nessa etapa deve-se considerar a estrutura celular do organismo, visto que uma bactéria Gram positiva, possui uma parede celular mais espessa do que em Gram negativa, o que prejudica o seu rompimento nos procedimentos realizados por alguns testes, sendo assim, torna-se necessário adição da *Proteinase K* nos métodos para êxito da extração de DNA de qualidade satisfatória (BARATTO; MEGIOLARO, 2012, SILVA et al, 2013).

Após a extração, avalia-se a qualidade e quantidade de DNA que podem ser determinadas por espectrofotometria ou através de eletroforese em gel de agarose seguida de leitura da intensidade de fluorescência do brometo de etídio (ANTONINI; MENEHIN; URASHIMA, 2004) e/ou outros intercalantes de DNA disponíveis no mercado.

O interesse dos pesquisadores em otimizar métodos para extração de DNA vem se tornado cada vez maior, buscando praticidade, baixo custo, livres de resíduos como proteínas e sem toxicidade (WEBER et al., 2010).

Baseado no exposto, este trabalho tem como objetivo otimizar protocolos de extração de DNA bacteriano no intuito de obter metodologias mais práticas, rápidas e com menor custo, trazendo melhorias para o desenvolvimento de pesquisas e aplicações em rotina laboratorial tendo como base a dificuldade de estabelecer um método ideal que consiga extrair com ótima qualidade o DNA bacteriano em Gram positiva.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 TIPO DE ESTUDO**

Trata-se de um estudo experimental de cunho quantitativo e qualitativo, que traça um esquema de planejamento envolvendo experimentos, que seguem métodos científicos estruturais, tudo o que pode ser mensurado em números classifica-se como quantitativo, esses dados serão analisados através de técnicas estatísticas (DALFOVO; LANA; SILVEIRA, 2008).

## 2.2 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DOS TESTES

As atividades foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia do Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO), Juazeiro do Norte– CE no período de Setembro a Outubro de 2018.

## 2.4 MÉTODOS

Por serem práticos e eficazes, optou-se pelos métodos dodecil sulfato sódio (SDS), CTAB/Fenol-Clorofório, *Salting-out* sem e com *Proteinase K*, sendo este com dois tempos de incubação e temperaturas diferentes e também com o *Kit Wizard® Genomic DNA Purification* da PROMEGA para Gram positivo.

### 2.4.1 Preparo da amostra

Foram usadas bactérias da linhagem padrão de *Staphylococcus aureus* 15, semeadas em meio líquido de enriquecimento, *Brain Heart Infusion* (BHI), cada tubo contendo 4 ml de meio, no qual foram transferidos após período de incubação de 24 horas para *eppendorfs*. Após transferência as amostras devidamente identificadas foram centrifugadas a 10.000 RPM por 2 minutos, e descartado o sobrenadante e após essa etapa, as bactérias foram acondicionadas em temperatura de -20°C para seguir com as extrações.

### 2.4.2 Métodos por *Salting-out*

***Salting-out* sem uso da *Proteinase K* por 1h à 60°C** Foram adicionados 200µL de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) aos tubos de polipropileno de 1,5 mL contendo a bactéria *Staphylococcus aureus* 15 e foram incubados por 1 hora a 60°C. Após a incubação, foi adicionado 35µL de NaCl saturado (5M), agitado manualmente com vigor. Foi centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm. Transferindo o sobrenadante para um novo tubo previamente identificado e foi adicionado 400 µL etanol absoluto, após isso foi agitado o tubo e centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm foi descartado o etanol cuidadosamente e adicionado 1 mL de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o pellet, foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm e desprezado o sobrenadante. Deve-se repetir a lavagem com etanol 70% mais uma vez e foi desprezado o sobrenadante. O tubo secou em

temperatura ambiente por 30 minutos para evaporação do etanol residual; Após esse período foi resuspendido o DNA em 50µL de água milliq autoclavada e foi estocado o DNA a -20 °C. (ABRÃO et al 2005)

***Salting-out com Proteinase K por 1h à 60°C:*** Foram adicionados 200µL de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) aos tubos de polipropileno de 1,5 mL contendo a bactéria *Staphylococos aureus* 15 e 5 µL de *proteinase K* (10mg/mL) e incubados por 1 h a 60°C. Após a incubação, foi adicionado 35µL de NaCl saturado (5M), agitado manualmente com vigor. Foi centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm. Transferindo o sobrenadante para um novo tubo previamente identificado e foi adicionado 400 µL etanol absoluto, após isso agitou-se o tubo e centrifugou por 10 minutos a 13.000 rpm foi descartado o etanol cuidadosamente e adicionado 1mL de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o pellet, foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm e desprezado o sobrenadante. Deve-se repetir a lavagem com etanol 70% mais uma vez e será desprezado o sobrenadante. O tubo secou em temperatura ambiente por 30 minutos para evaporação do etanol residual; Após esse período foi resuspendido o DNA em 50µL de água milliq autoclavada e foi estocado o DNA a -20 °C. (ABRÃO et al 2005)

***Salting-out com Proteinase K por 2h à 42°C:*** Foram adicionados 200µL de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) aos tubos de polipropileno de 1,5 mL contendo a bactéria *Staphylococos aureus* 15 e foi adicionado 5 µL de *proteinase K* (10mg/mL) e incubados por 2h a 42°C. Após a incubação, foi adicionado 35µL de NaCl saturado (5M), agitando manualmente com vigor. Foi centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm. Transferindo o sobrenadante para um novo tubo previamente identificado e foi adicionado 400 µL etanol absoluto, após isso foi agitado o tubo e centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm, após isso foi descartado o etanol cuidadosamente e adicionado 1 mL de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o pellet, foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm e desprezado o sobrenadante. Novamente foi feita a lavagem com etanol 70% e desprezado o sobrenadante. O tubo foi seco em temperatura ambiente por 30 minutos para evaporação do etanol residual; Após esse período foi resuspendido o DNA em 50µL de água milliq autoclavada e foi estocado a -20 °C. (ABRÃO et al 2005)

### 2.4.3 Método – Dodecil sulfato de sódio (SDS)

Foram adicionados 300 µL de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM) ao tubo de polipropileno contendo a bactéria *Staphylococcus aureus* 15 e deixados em repouso por 20 minutos. Após isso foi centrifugado por 2 minutos a 10.000 rpm e descartado o sobrenadante. Resuspendeu-se o precipitado em 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl 400mM e EDTA ,50 mM, NaCl 500mM, SDS 1%). Após isso foi agitado vigorosamente em vortex por 15 segundos e foi centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm. Transferindo o sobrenadante (fase aquosa) para um novo tubo identificado e descartar o tubo com o precipitado. Foi adicionado 1 mL de Etanol concentrado gelado, agitado por inversão lentamente. Centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm novamente e descartando o sobrenadante por inversão. Foi adicionado 700 µL de Etanol 70% gelado, centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm. Descartando o sobrenadante por inversão, foi colocado o tubo invertido sobre papel absorvente para secar o pellet por aproximadamente 30 minutos. Foi adicionado ao pellet 50µL de H<sub>2</sub>O ultrapura e estocar a amostra a – 20°C (LIMA et al., 2017).

### 2.4.4 Métodos com Kit WIZARD® *Genomic DNA Purification* da PROMEGA para Gram Positiva

Foi centrifugado 1 ml da cultura bacteriana por 2 minutos em 13.000 rpm, descartado o sobrenadante e foi resuspendido o tubo com *Staphylococcus aureus* em 480µL de EDTA. Adicionando 600µL de *Nuclei Lysis Solution* e 10 µL de *Proteinase K*. Foi resuspendido pipetando gentilmente. Foi incubados a 80°C por 5 minutos para lisar a parede bacteriana. Depois que esfriou a temperatura ambiente, foi adicionado 3µL de *RNAse Solution* no lizado celular. Invertendo os tubos de 2 a 5 vezes para misturar e foi incubado a 37°C por 15-60 minutos. Esfriou a amostra a temperatura ambiente, foi adicionado 200µL de *Protein Precipitation Solution* no lizado celular. Agitado em vortex vigorosamente por 20 segundos para misturar a solução com o lizado celular. Incubado a amostra no gelo por 5 minutos e novamente centrifugado por 3 minutos a 13.000 rpm. Transferindo o sobrenadante contendo o DNA para microtubo novo contendo 600µL de isopropanol a temperatura ambiente. Serão misturados gentilmente por inversão até que um fio de forma semelhante ao DNA seja observado. Foi centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm. Descartado o sobrenadante e foi adicionado 600µL de Etanol a temperatura ambiente e invertendo gentilmente várias vezes o tubo para lavar o pellet. Foi centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm. Descartando o etanol cuidadosamente; Deve-se drenar o tubo em papel absorvente limpo e deixar por

aproximadamente 10 -15 minutos o tubo invertido para o pellet secar. Foi adicionado ao pellet 50µL de H<sub>2</sub>O ultrapura e estocar a amostra a – 20°C (PROMEGA, S/D).

#### 2.4.5 Métodos com CTAB/Fenol-Clorofórmio

Em um microtubo polipropileno foi adicionado 250 µL de TE, foi adicionado 100 µL de cloreto de sódio (NaCl) 5 M e 100 µL de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) pré-aquecido a 65 °C. Agitando a suspensão por dez segundos até obter-se aspecto leitoso, com posterior incubação a 65 °C por dez minutos. Após esse período foi adicionado 750 µL de fenol e 750 clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1), agitando por dez segundos com movimentos leves e centrifugado por 6 minutos a 15.000 rpm; foi transferido o sobrenadante para outro tubo polipropileno e adicionado 200 µL de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1, foi centrifugado por 6 min a 15.000 rpm; Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionado 1/10 V de acetato de sódio 3M e 3X o volume de ETOH 100%, homogeneizando vagarosamente e foi colocado em overnight a –20 °C; Após essas etapas foi transferido o sobrenadante para novo tubo e adicionado 450 µL de etanol absoluto gelado, foi incubado durante dez minutos a -20 °C. Em seguida centrifugado por vinte minutos a 15.000 rpm, foi desprezado o álcool e acrescentado 500 µL de etanol a 70% em temperatura ambiente, seguindo-se o mesmo procedimento de centrifugação anteriormente citado. Desprezando o sobrenadante e foi seco o *pellet* a 56 °C no banho seco. Após a completa secagem do *pellet*, foi adicionado 50 µL de tampão de diluição (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA) pH 8,0 ou água ultrapura. Manter o DNA em temperatura ambiente por vinte minutos e posteriormente armazenar à -20 °C (OLIVEIRA, 2002).

#### 2.6 ANÁLISE EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para análise do material genético extraído nos métodos realizados anteriormente, foi realizado a eletroforese em gel de agarose, para que assim sejam observadas as diferenças visualmente para cada extração.

**Preparo do Gel:** Foi pesado 0,3g de agarose; transferindo o Agarose para o recipiente contendo 30ml do tampão TAE e foi diluído; em uma chapa aquecedora foi colocado e aqueceu o gel até ficar límpido, após isso esfriou em temperatura ambiente e foi transferido para cuba de eletroforese e foi colocado o pente para formar locais para colocação do DNA e esperou-se solidificar.

**Procedimento de Eletroforese:** Foi misturado 8  $\mu\text{L}$  da amostra com 5  $\mu\text{L}$  do tampão de corrida (*Blues Green Dye I (Ludwig Biotecnologia)*+ Intercalante de Ácidos nucleicos) e homogeneizado suavemente com a pipeta; Foi colocado o tampão TAE 1X na cuba até cobrir a base de aparo da cuba; foi colocado na cuba contendo o gel e foi removido o pente; foi aplicado a amostra cuidadosamente para não deixar vazar do poço formado; Fechada a cuba foi verificado a posição dos eletrodos indicada pela cor; ligou a fonte e ajustou a voltagem e corrente. Após a corrida foi desligado a fonte, removido os eletrodos e foi retirado o gel cuidadosamente, o qual foi colocado no transluminador de luz UV e observado os resultados e comparar com DNA Ladder 1Kb (Ludwig Biotecnologia). Essa metodologia foi realizada de acordo com os protocolos da EMBRAPA (1998) e EMBRAPA (2007).

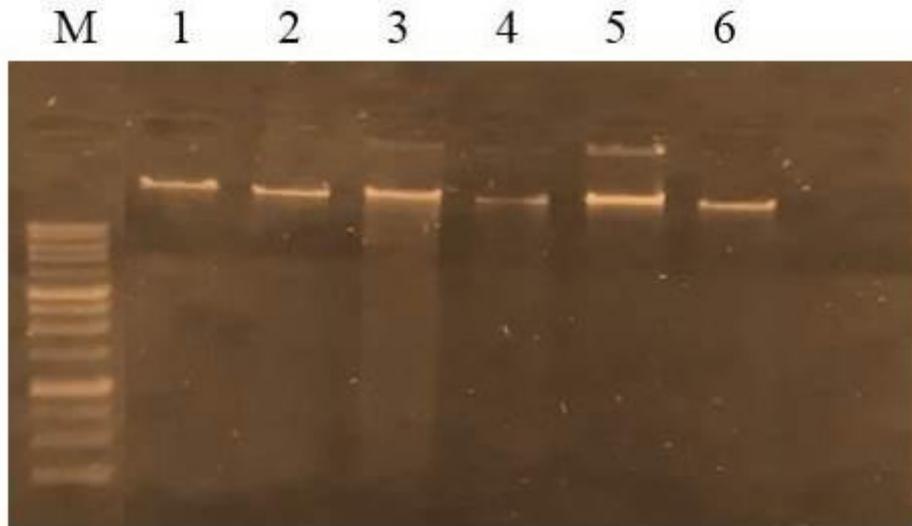
## 2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tabulados em tabelas do programa Excel® para melhor apresentação acadêmica, no qual avaliou-se os métodos entre si de acordo com temperaturas, períodos de incubação e substâncias usadas nas etapas de extração.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como visto na **Figura 1**, o material genômico extraído das bactérias *Staphylococcus aureus* linhagem 15, resultaram em bandas nítidas e de boa qualidade de forma geral, porém alguns métodos se destacaram em termos de concentração de DNA extraído como *Kit PROMEGA*, *Salting out* sem PK 1h a 60°C e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) com Fenol-Clorofório, dentre esses de maior destaque sobre suas concentrações, o *salting out* é o método que não é tão caro quanto o *kit PROMEGA* e também não possui toxicidade como o CTAB/Fenol-Clorofório sendo o método melhor escolha quando trata-se de ser de baixo custo e não tóxico.

**Figura 1** – Canaletas M= DNA Ladder 1 Kb; 1= método SDS; 2= método *Salting out* sem PK 1h a 60°C; 3= método *Salting out* com PK 1h a 60°C; 4= método *Salting out* com PK 2h a 42°C; 5= Kit Promega; 6= método CTAB/Fenol-Clorofórmio



Fonte: Dados da Pesquisa.

A **Tabela 1**, mostra quantificações de material extraído, por meio da eletroforese foram feitas comparações do DNA ladder que é uma amostra genômica conhecida com cada amostra, que foram calculadas de acordo com a quantidade de amostra introduzida no gel.

**Tabela 1** – Concentrações obtidas através da análise comparativa com DNA ladder

Métodos	ng/8μL	ng/μL
SDS	44,8	5,6
Salting-out com PK 1h à 60°C	44,8	5,6
Salting-out sem PK 1h à 60°C	72,0	9,0
Salting-out com PK 2h à 42°C	28,8	3,6
<i>Kit</i> PROMEGA	147,2	18,4
CTAB/Fenol-Clorofórmio	72,0	9,0

Fonte: dados da pesquisa

O melhor teste em relação a material extraído com exatidão como já esperado foi o Kit PROMEGA, pois esse teste comercial demonstrou ótimos resultados em relação a extração de material genético, mesmo assim ainda trás consigo a desvantagem de ser, entre todos, o que é de maior custo. Segundo Lipay; Bianco (2015), os *kits* comerciais para extração de DNA

apresentam com maior frequência melhor qualidade e pureza, do que os métodos manuais, mas a maior desvantagem em usar *kits*, é o valor do teste.

O método por Dodecil de sulfato de sódio (SDS) foi o método mais rápido e prático realizado, mostrou-se que é possível obter um bom resultado mesmo por um método simples que usa poucos constituintes em seu passo a passo, por não utilizar enzimas ou outro reagente de alto custo.

De acordo com Baratto e Megiolaro (2012), o método por SDS mesmo obtendo melhor desempenho quantitativo para Gram positiva, não foi eficaz em termos qualitativos, então fez-se necessário adição de *Proteinase K* ao método com SDS, e na análise comprovou que obteve pureza e uma excelente qualidade de material genético extraído. Também observou-se que para extração ideal de DNA em Gram positivas seria preciso acrescentar *Proteinase K*, para lise celular uma vez que bactérias Gram positivas possuem uma grossa parede celular o que dificulta a extração.

*Salting out* sem *Proteinase K* 1 hora a 60°C foi o melhor método de *Salting out*, pois esse teste teve um tempo de realização curto e sem o uso da *Proteinase K* o deixou com menor custo e além deste fato, na eletroforese a banda mostrou-se nítida e sem rastros e resíduos. O método por *Salting out* com uso da *Proteinase K* com temperatura de 1 hora à 60°C foi rápido assim como o período de teste equivalente ao SDS aumentando apenas um pouco o custo devido o uso da enzima e nas bandas esse teste mostrou-se com rastros de DNA, com relação a sua qualidade, essa extração mostrou rastros significando resíduos. O ultimo teste realizado ainda pelo *salting out*, dessa vez com a mudança de temperatura para 42°C por 2 horas ainda com uso da *Proteinase K*, dentre os três métodos por *salting out* foi o que obteve uma menor concentração de DNA extraído, assim concluindo que esse teste além de ter o método prolongado por uma hora e não teve eficácia.

Atualmente, pesquisadores procuram métodos de extração de DNA, que sejam rápidos, econômico, livres de contaminação residual e toxicidade. Foi possível observar a eficiência da utilização de solução salina (NaCl) como precipitante, que obteve o mesmo resultado nas amostras de DNA extraídas com fenol/clorofórmio, não mostrando diferenças no resultado. O uso do NaCl possibilita que o DNA fique livre de reagentes tóxicos, como o fenol e clorofórmio, também por ser de baixo custo é mais compatível com a realidade laboratorial (WEBER et al., 2010).

Os resultados desta pesquisa corroboram com os de Medrano; Aasen; Sharrow, (1990) que anteriormente, demonstraram que a solução salina pode ser um método alternativo para substituição do fenol e clorofórmio.

O CTBA/fenol-Clorofórmio foi o teste que resultou na mesma concentração que o *Saunting out* sem proteinase K por 1 hora à 60°, é um método que possui uma margem de custo um pouco maior em relação ao *salting out* por ter duas substâncias a mais a serem compradas, o fenol e o clorofórmio. Esse método faz uma boa extração mas possui uma desvantagem significativa pois traz riscos de toxicidade então muitas vezes não é utilizado. Segundo Miranda et al. (2014) entre os dois métodos de extração usados em sua pesquisa, o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e lise térmica, comprovou-se que o melhor método de extração foi por lise térmica, esse método mostrou-se efetivo para uma determinada bactéria Gram-positiva, que possui uma grossa camada de peptídeo glicano resultando em uma melhor extração em termos quantitativos e pureza. No entanto, Andreatti Filho et al., (2011) também usou os mesmos métodos para extrair o DNA de uma determinada bactéria Gram negativa em sua pesquisa e analisou que entre dois testes as duas extrações obtiveram quantidade, qualidade satisfatória e pureza do material genético foi o CTAB, que apresentou uma enorme sensibilidade e qualidade com boa nitidez nas bandas visualizadas.

A **tabela 2**, mostra outras características de cada extração realizada, que tornou-se importante para pesquisa porque são parâmetros necessários na escolha do melhor teste.

**Tabela 2** – Características gerais das extrações

Métodos	Tempo Médio	Toxicidade	Custo
SDS	1h40m	Ausente	Baixo
Salting-out com PK 1h à 60°C	3h40m	Ausente	Moderado
Salting-out sem PK 1h à 60°C	3h30m	Ausente	Baixo
Salting-out com PK 2h à 42°C	4h40m	Ausente	Moderado
Kit PROMEGA	2h	Ausente	Alto
CTAB/Fenol-Clorofórmio	26h	Presente	Moderado

Fonte: dados da pesquisa

#### 4 CONCLUSÃO

Os testes para a extração de DNA de *Staphylococcus aureus* no geral obtiveram êxito, sendo possível destacar três métodos como melhores quando se trata de concentração extraída, são eles o método por Kit PROMEGA, *Salting out* sem *proteinase K* e CTAB/fenol/cloroformio. Quando comparados questões de baixo custo, boa concentração

extraída, nitidez das bandas na eletroforese, praticidade da realização e baixa toxicidade, o melhor método para uma rotina laboratorial pequena ou para pesquisas futuras seria o *Salting out* sem a *proteinase K*. Assim concluí-se que é possível obter uma ótima extração de DNA com métodos de menor complexidade. Em pesquisas futuras serão testados ou devem ser testados novas temperaturas e tempos diferentes para as etapas de banho maria, pois podem levar a variações no resultado e gerar um novo procedimento que possa melhorar ainda mais a qualidade e quantidade de DNA extraído.

## REFERÊNCIAS

- ABRÃO, M. G. et al. **Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1.** v.49, n.6, 2005.
- ANDREATTI FILHO, R. L. et al. Comparação de métodos para extração de DNA na reação em cadeia da polimerase para detecção de *salmonella enterica* sorovar enteritidis em produtos avícolas **Ciência Animal.** Bras., Goiânia, v.12, n.1, 2011.
- ANTONINI, R. S. C; MENEGHIN, S. P; URASHIMA, A. S. **Apostila de Técnicas Básicas De Biologia Molecular.** Universidade Federal de São Carlos. Centro de Ciências Agrárias – Campus Araras, 2004.
- BARATTO, C. M; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para utilização em RAPD-PCR, **Unoesc & Ciência – ACET,** Joaçaba, v.3, n.1, 2012.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde: Detecção e identificação de bactérias de importância médica.** Brasília: v.9, n.1, 2013.
- CIBA-GEIGY, A. G. **Wissenschaftliche Tabellen Geigy. Einheiten im Meßwesen, Körperflüssigkeiten, Organe, Energiehaushalt, Ernährung,** 8ª Edição, Editors Ciba-Geigy Limited, v.1, 1977.
- DALFOVO, M.S; LANA, R.L; SILVEIRA, A. Métodos Quantitativos e Qualitativos: Um Resgate Teórico. **Revista Interdisciplinar Científica Aplicada,** v.2, n.4. 2008.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Descontaminação de substâncias tóxicas: Fenol e Brometo de Etídio.** Comunicado Técnico por Teixeira, K. R. S.; Pires, W.O. & Baldani, J.I. Embrapa Agrobiologia, 1998.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de Reação em cadeia da polimerase–** São Carlos: EMBRAPA Agropecuária Sudeste, 2007.
- LIMA, J.W.P et al. Comparação entre três métodos de extração de DNA a partir de urina. In: Anais da **XI Semana Nacional de Ciência e Tecnologia no Estado de Roraima –** Ciência alimentando o Brasil. 2017. Disponível em: <https://www.even3.com.br/Anais/snctrr/36097-COMPARACAO-ENTRE-TRES-METODOS-DE-EXTRACAO-DE-DNA-A-PARTIR-DE-URINA> acesso em: 10 de Maio 2018.
- LIPAY. M. V. N; BIANCO, B. **Biologia Molecular.** 1ª Edição, Rio de Janeiro, Editora: Roca, 2015.
- MEDRANO, J. F; AASEN, E; SHARROW, L. DNA extraction from nucleated red blood cells. **Bio Techniques,** v.8, n.1, 1990.

MIRANDA, R. R. et al. Avaliação de detergentes e ultra-som para isolamento de DNA genômico de bactérias de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. Paraná v.5, n.1, 2014.

OLIVEIRA, D. E. **Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe**. 2002. 117 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002. Disponível em: <[http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064056P5/2002/oliveira\\_de\\_dr\\_botfm\\_prot.pdf](http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064056P5/2002/oliveira_de_dr_botfm_prot.pdf)>. Acesso em: novembro 2018

PROMEGA. **Wizard® Genomic DNA Purification Kit**, Technical Manual. Disponível em: <https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/> acesso em: 28 de Abril de 2018.

WEBER, et al. **Uso de solução salina (NaCl) na extração de DNA a partir de bulbo capilar Evidência**, Joaçaba v.10, n.1, 2010.