

UNILEÃO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

OSLAENE ALVES DE BRITO

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DA BACTÉRIA**  
*Escherichia coli*

Juazeiro do Norte – CE  
2019

OSLAENE ALVES DE BRITO

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DA BACTÉRIA**  
*Escherichia coli*

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

OSLAENE ALVES DE BRITO

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DA BACTÉRIA  
*Escherichia coli***

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. Ana Ruth Sampaio Grangeiro  
**Examinador 1**

---

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

# OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DA BACTÉRIA *Escherichia coli*

Oslaene Alves de Brito<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. A cepa bacteriana de *Escherichia coli* foi cedida pelo Centro Universitário Leão Sampaio, onde também foram realizados os testes para extração de DNA. As metodologias adaptadas para o presente estudo foram as de: Dodecil sulfato de sódio (SDS); *Salting out*; Kit PROMEGA e CTAB/Fenol/clorofórmio e foram analisados por meio de Eletroforese em gel de agarose. O resultado satisfatório foi com SDS, que apresentou vantagem em relação aos outros métodos por trazer rapidez, baixo custo e melhor concentração de material extraído. Os outros métodos testados, apresentaram DNA sem pureza, podendo ser explicado pela presença de grande quantidade de proteínas da parede celular de *E. coli*, encontramos na análise por eletroforese, interferindo na qualidade das amostras. Conclui-se dessa maneira, que a metodologia utilizando o método SDS proporcionou obtenção de DNA de melhor qualidade, satisfatória para amplificação por reação em cadeia da polimerase o que pode gerar futuramente muitos benefícios no diagnóstico microbiano, com baixa custo e boa efetividade.

**Palavras-chave:** Eletroforese. Extração de DNA. Otimização. *Escherichia coli*.

## OPTIMIZATION OF BACTERIA DNA EXTRACTION PROTOCOLS *Escherichia coli*

### ABSTRACT

This work aims at the use of bacterial deoxyribonucleic acid (DNA) extraction protocols in order to expand its methodologies faster, faster and faster. The bacterial strain of *Escherichia coli* was supplied by the Leão Sampaio University Center, where tests for DNA extraction were also developed. The methodologies adapted for the present study were as follows: sodium dodecyl sulfate (SDS); *Salting out*; Kit PROMEGA and CTAB / Phenol / chloroform and were by means of agarose gel electrophoresis. The satisfactory result was with SDS, which had great advantage in relation to the other methods for bringing speed, low cost and better concentration of extracted material. DNAs, DNA, DNA, purity in vitro, DNA DNA purity, containing serexed by the presence of large amount of *E. coli* cell wall proteins, we found in the analysis by electrophoresis, interfering in the quality of the samples. It concludes in this way, with the use of the SDS method of DNA of better quality, satisfactory for amplification by polymerase chain, which can generate many benefits in the future without microbial diagnosis, with low cost and good effectiveness.

<sup>1</sup> Discente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio –UNILEÃO, oslaene15@gmail.com

<sup>2</sup> Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio-UNILEÃO, karollynasilva@leaosampaio.edu.br

**Key words:** Electrophoresis. DNA extraction. Optimization. *Escherichia coli*

<sup>1</sup> Discente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio –UNILEÃO, oslaene15@gmail.com

<sup>2</sup> Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio-UNILEÃO, karollynasilva@leaosampaio.edu.br

## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias, através da coloração de Gram, são classificadas em Gram positivas e Gram negativas e se diferenciam através da composição da sua parede celular (MIRANDA et al., 2011). As bactérias Gram positivas possuem uma espessa camada de peptidoglicano, tornando-as mais rígidas, já as Gram negativas apresentam uma fina camada de peptidoglicano, sendo mais frágil e uma membrana externa de lipopolissacarídeo (BONATTO; BREVE; TEJADA, 2014).

*Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria da família Enterobacteriaceae, bacilo Gram negativo curto, móvel ou imóvel, apresenta crescimento em meio aeróbico e anaeróbico, por ser uma bactéria facultativa. Habita naturalmente o intestino e está presente na maioria das infecções do trato urinário (ITUs) (EUSÉBIO et al., 2016).

A família das enterobactérias possuem antígenos K, O, F e H que possibilitam resistência das cepas bacterianas, com ação respectivamente no sistema imune, liberação de endotoxinas, aderência e movimentação. Algumas cepas adquirem genes de virulência, levando ao aumento da patogenicidade (OLIVEIRA et al., 2014).

Os métodos de isolamentos de microrganismos apresentam limitações quanto à sensibilidade e especificidade, tempo de diagnóstico e tratamento (NEVES & GUEDES, 2012). Quanto mais precoce o diagnóstico, maior a probabilidade de tratamento direcionado, melhor o prognóstico e menor a chance de seleção de microrganismos resistentes a antibióticos de largo espectro (NGUYEN, 2006).

As células procarióticas possuem DNA fita dupla, circular, desprovido de membrana nuclear, proteínas e divisão mitótica. Esse material genético possui replicação semiconservativa, além disso, possui como extra cromossomo o plasmídeo, estrutura facultativa relacionada ao mecanismo de resistência (REINHARDT et al., 2017).

Para obtenção do DNA, é necessário que este esteja íntegro, isento de contaminantes e interferentes que possam prejudicar a sua análise. Os métodos de extração consistem em isolamento e purificação seguidos de três etapas: lise das células e solubilização do DNA, purificação e precipitação desse ácido nucléico (CALDART et al., 2011).

O rompimento da parede celular é realizado com detergentes como *Sodium Doecy Sulphate* (SDS) e *etyl Trimetyl Ammonium Bromide* (CTAB). A separação do DNA ocorre em meio heterogêneo com fenol, que desnatura as proteínas e o material genético fica dissolvido em apenas uma das fases (SABA et al., 2016).

Para retirada das proteínas, são adicionadas altas concentrações de sal (*salting-out*), para que assim sejam separadas do DNA, que será precipitado com álcool (etanol ou isopropanol) para garantir sua pureza. A análise da pureza do DNA em qualidade e quantidade suficiente pode ser verificada pela técnica de Eletroforese (YUAN et al., 2012).

A eletroforese é uma técnica simples, que utiliza corrente elétrica para promover a separação de moléculas carregadas, como proteínas e ácidos nucleicos. Essa técnica tem sido cada vez mais utilizada na rotina laboratorial contribuindo com o diagnóstico e prognóstico de várias enfermidades (OLIVEIRA et al., 2015).

Em vista da dificuldade dos diagnósticos microbianos, por meio dos métodos de cultivos tradicionais, a extração do material genético com técnicas de baixo custo, rápidas e eficazes, tornam-se importantes para otimizar técnicas na área da genética molecular. O DNA bacteriano obtido por diferentes metodologias de extrações, analisado pela técnica de eletroforese, é um passo importante para esses diagnósticos.

Diante disso, o objetivo do presente estudo é otimizar protocolos de extração de DNA bacteriano no intuito de se obter uma metodologia que ofereça melhor custo benefício.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DOS TESTES**

As atividades foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO), Juazeiro do Norte– CE no período de fevereiro e março de 2019.

### **2.2. PREPARO DA AMOSTRA**

Foram usadas bactérias da linhagem padrão de *Escherichia coli*, cultivadas em meio líquido de enriquecimento *Brain Heart Infusion* (BHI), as quais foram transferidas após período de incubação de 24 horas para microtubo tipo *eppendorfs* de 2.0 mL. Após transferência as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM e acondicionadas em temperatura de -20°C para posterior extrações de DNA.

## 2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os métodos utilizados foram dodecil sulfato sódio (SDS), CTAB/Fenol-Clorofórmio, *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 negativa.

### 2.3.1 Métodos por *Salting-out*

***Salting-out* sem uso da *Proteinase K* por 1h à 60°C:** O método foi realizado com adição de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) aos tubos de polipropileno contendo a bactéria *Escherichia coli*, incubados por 1 hora a 60°C, em seguida adicionado 45µL de NaCl saturado (6M), centrifugado por dois minutos a 13.000 rpm, transferindo o sobrenadante para um novo tubo, adicionado 400 µL etanol absoluto, centrifugado por dez minutos a 13.000 rpm, o etanol foi descartado cuidadosamente e adicionado 1 mL de etanol 70%, centrifugado com a mesma rotação e tempo da anterior citada, desprezado o sobrenadante. O tubo secou em temperatura ambiente por 30 minutos para evaporação do etanol residual. O DNA foi resuspendido em 60µL de água livre de DNASE e estocado a -20 °C (ABRÃO et al 2005).

***Salting-out* com *Proteinase K* por 1h à 60°C:** A metodologia foi realizada com o mesmo protocolo de *Salting-out sem Proteinase K*, mas nesse houve adição de 10uL de *proteínase K* junto com TE.

***Salting-out* com *Proteinase K* por 2h à 42°C:** Os protocolos seguiram o mesmo princípio *Salting-out com Proteinase K*, mudando o tempo de incubação e temperatura para 2 hora à 42°C.

**2.3.2 Método – Dodecil sulfato de sódio (SDS):** As extrações foram realizadas segundo Lima et al (2017), com 300 µL de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM) ao tubo de polipropileno contendo a bactéria *Escherichia coli* e deixado em repouso por 20 minutos, centrifugado por 2 minutos a 10.000 rpm descartado o sobrenadante. Resuspendeu o precipitado em 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl 400mM e EDTA ,50 mM, NaCl 500mM, SDS 1%), agitado em vortex por 15 segundos, centrifugado por 5 minutos a 10.000 RPM.

Transferiu sobrenadante (fase aquosa) para um novo tubo, adicionado 1 mL de etanol concentrado gelado, centrifugado com mesmo tempo e rotação da anterior citada. Foi adicionado 700 µL de etanol 70% gelado, centrifugado da mesma forma anterior citada. O tubo foi deixado secar por aproximadamente 30 minutos e resuspendido com 50µL de H<sub>2</sub>O ultrapura e estocado a – 20°C.

**2.3.3 Métodos com Kit WIZARD® Genomic DNA Purification da PROMEGA para Gram Negativa:** Foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido pelo kit Wizard® *Genomic DNA Purification* da PROMEGA (PROMEGA, 2019).

#### **2.3.4 Métodos com CTAB/Fenol-Clorofórmio:**

Microtubo polipropileno foi adicionado 250 µL de TE, 100 µL de cloreto de sódio (NaCl) e 100 µL de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) pré-aquecido a 65 °C, agitado até obter-se aspecto leitoso, incubado a 65 °C por dez minutos. 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 isoamilico 24:1, centrifugado com a mesma rotação e tempo da anterior citada, transferiu o sobrenadante para um novo tubo e adicionado 1/10 V de acetato de sódio 3M e 3X o volume de ETOH 100%, foi colocado em overnight a –20 °C. Centrifugado por vinte minutos a 15.000 rpm, desprezado o álcool e acrescentado 500 µL de etanol a 70% em temperatura ambiente, seguindo-se o mesmo procedimento de centrifugação anteriormente citado. O sobrenadante foi desprezado e seco o *pellet* a 56 °C em estufa. Após a completa secagem do *pellet*, foi resuspendido com 50 µL de tampão de água ultrapura, deixando o DNA em temperatura ambiente por vinte minutos, armazenado à -20 °C (OLIVEIRA, 2002).

## **2.4 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 1%, para observação das diferenças de cada extração. O resultado foi observado e comparado com DNA Ladder 1 Kb (Ludwig Biotecnologia) no transluminador de luz UV. Essa metodologia foi realizada de acordo com os protocolos da EMBRAPA (1998) e EMBRAPA (2007).

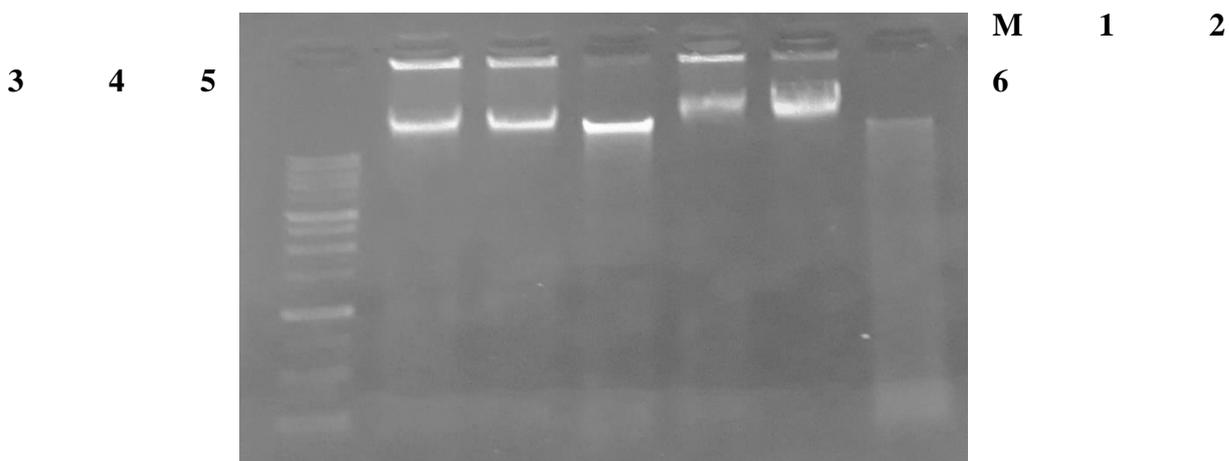
## 2.5 TABULAÇÃO DOS DADOS

Os resultados foram tabulados em tabelas do programa Excel® para melhor apresentação visual, avaliando-se os métodos entre si de acordo com temperaturas, períodos de incubação e substâncias usadas nas etapas de extração.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação entre os protocolos testados foi realizada através das médias dos valores das amostras de *Escherichia coli* em cada protocolo testado. Os resultados podem ser observados na Figura 1, que apresenta as quantidades e qualidade das amostras de DNA extraídas.

O protocolo que obteve maior concentração de DNA (ng/uL) foi o método Dodecil sulfato de sódio - SDS (3), destacando-se por ser um método rápido e simples. Já o protocolo que propiciou a extração de DNA em menor concentração foi o Kit Promega (6).



FONTE: Dados da Pesquisa

Figura 1: Avaliação de seis métodos de extração de DNA de *Escherichia coli*. Canaletas M=Marcador DNA Ladder 1 kb; (1) método Salting out incubado por 1 hora a 60°C sem Proteinase K; (2) método Salting out incubado por 1 hora a 60°C com Proteinase K; (3) método Dodecil sulfato de sódio -SDS; (4) método Salting out incubado por 2 horas a 42°C com Proteinase K; (5) método CTAB/Fenol/CAI e (6) Kit Promega.

A tabela 1 mostra os resultados obtidos após eletroforese em gel de agarose 1% para fins de quantificação do DNA extraído. Para a avaliação do rendimento do DNA, comparou-se com o marcador DNA Ladder 1 KB da KASVI, ao qual contém sua massa em 5 ng/uL

conhecida, tendo assim como base para calcular as amostras de acordo a quantidade inserida no gel.

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

<b>Protocolos</b>	<b>ng n<sub>l</sub></b>
Salting-out sem PK 1h à 6 25' 30	
Salting-out com PK 1h à 6 25' 30	
SDS	32, 40
Salting-out com PK 2h à 4 25' 30	
CTAB/Fenol-Clorofórmio 25' 30	
<i>Kit</i> PROMEGA	25, 30

FONTE: Dados da Pesquisa (2019)

De acordo com Bonatto e Breve (2014), a extração por SDS de DNA de *E. coli* é eficaz na obtenção de DNA genômico, mas para extração de DNA plasmidial os resultados não são tão favoráveis. O SDS é um agente detergente que solubiliza lipídeos, é um desnaturante de proteínas e também rompe ligações não-covalentes inter-subunidades de proteínas oligoméricas. Também é utilizado para se certificar que nenhuma nuclease que não depende de  $Mg^{2+}$ , cause qualquer degradação.

De acordo com Amaral et al (2016), o método SDS é mais eficiente quanto ao tempo, qualidade do DNA extraído, além de apresentar concentração satisfatória e baixo custo, sendo acessível para o desenvolvimento de pesquisas em diversos laboratórios.

No estudo de Baratto e Megiolaro (2012), ao comparar a extração do DNA pelo método SDS de bactérias Gram positivas e Gram negativas, foram obtidos diferentes resultados quanto a qualidade das amostras, sugerindo que a composição distinta da parede celular desses microrganismos pode interferir diretamente no teste, já que há uma dificuldade maior com as bactérias Gram positivas, exigindo assim metodologias mais complexas para obtenção do seu material genético.

No presente estudo, o protocolo que propiciou a extração de DNA em menor concentração foi utilizando o *Kit* promega, não corroborando com Lipay e Bianco (2015), tendo em vista que estes relatam que os *kits* comerciais para extração de DNA apresentam com maior frequência, melhor qualidade e pureza, do que os métodos manuais, apresentando como única desvantagem correspondendo aos valores dos testes.

Os métodos *Salting out* sem *Proteinase K* 1 hora a 60 °C e com *Proteinase k* 1 hora a 60°C e 2 horas a 42°C obtiveram resultados semelhantes, com uso da *Proteinase K* torna mais

caro o teste, e a diminuição de temperatura e aumento de tempo torna o teste mais demorado, torna-se mais eficaz, prático e rápido o *Salting out* sem *Proteinase K* 1 hora a 60°C.

Os protocolos com proteinase K e CTBA são amplamente utilizados e concede bons resultados. Entretanto, o uso de fenol e clorofórmico são substâncias tóxicas ao ambiente e perigoso ao ser manuseado, sendo assim indicando a substituição dos mesmos por solução salina (VIERA et al., 2015).

O fenol provoca desnaturação das proteínas de maneira eficiente. O clorofórmio também é usado como agente desnaturante das proteínas contidas na amostra. A mistura de fenol e de clorofórmio é muito eficiente para desproteinizar e sua ação se fundamenta na propriedade hidrófoba das proteínas que apresentam afinidade por solventes orgânicos (OLIVEIRA et al., 2007).

O teste CTBA/fenol-Clorofórmico resultou na mesma concentração obtida com o *Salting out*, porém é o teste que apresenta um custo maior devido, o uso de dois reagentes: o fenol e o clorofórmico. Além disso, tem como desvantagem o risco a quem administra essas substâncias, por ser tóxica a saúde (VIERA et al., 2015).

Os kits disponíveis comercialmente, em geral, resultam em purificações de boa qualidade para utilização nas mais variadas técnicas moleculares, dentre as quais a PCR. Porém tem como principal desvantagem um alto custo por amostra (ARAÚJO et al., 2009)

Andreatti Filho et al., 2011 verificaram após extrair DNA de *Salmonella*, que o material obtido por CTAB apresentava qualidade de nitidez (sem a formação de bandas inespecíficas) superior à do obtido pelo método com dodecil sulfato de sódio, e qualidade semelhante à do produto extraído pelo método de fenol-clorofórmio, porém com menos intensidade comparando-se com o método de extração com tiocinato de guanidina.

#### **4 CONCLUSÃO**

A extração pelo método SDS foi satisfatória para amplificação por Reação em cadeia da polimerase. É um método eficiente quanto ao tempo, apresenta boa qualidade do DNA extraído, concentrações satisfatórias e baixo custo, sendo acessível para o desenvolvimento de pesquisas em diversos laboratórios. Os outros métodos testados, apresentaram DNA de baixa qualidade, embora com bom rendimento exceto com o Kit Promega. Apesar dos resultados obtidos, por diferentes metodologias de extração de DNA bacteriano, sugere que há necessidade de novos estudos. Apesar dos grandes avanços da área, ainda possui um amplo

campo a ser explorado que pode gerar muitos benefícios no diagnóstico microbiano, com baixa custo e boa efetividade.

## 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. **Revista Arquivos Brasileiros Endocrinol Metabólico**, v.49, n.6, 2005.

AMARAL, C. B., et al. Evaluation protocols for the extraction of genomic DNA from Bovine blood. **Revista Journal of the Selva Andina Research Society**, v.7, n.2, p. 95-103. 2016.

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. **Revista Ciência Animal**, v.12, n.1, p.115-119. 2011.

ARAÚJO, F. R. et al. Avaliação de um Protocolo de Extração de DNA Genômico a Partir de Sangue Total. **Revista EMBRAPA**, v.1, n.1, p.1-5.2009.

BONATTO, F. A; BREVE, H. E. M; TEJADA, E. C. S. Comparação de protocolos de extração de DNA nas bactérias *E. coli* e *Pseudomonas*. **Revista Atlas de Ciências da Saúde**, v. 2, n. 1, p. 1-11. 2014.

BARATTO, C. M; MEGIOLARA, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para utilização em RAPD-PCR. **Revista Unoesc & Ciência**, v. 3, n. 1, p. 1-10. 2012.

CALDART, E. T. et al. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes e do leite de pequenos ruminantes. **Revista Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n.1, p. 945-953.2011.

EUSÉBIO, A. et al. *Escherichia coli* in community urinary tract infections: commensal or pathogenic?. **Pesquisa Revista Journals & Books**, v. 33, n. 2, p. 37-42. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2341402216300015>>. Acesso em: 12 de abr. 2019.

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 abr. 2019.

LIPAY, M. V. N; BIANCO, B. **Biologia Molecular**. 1. ed. Rio de Janeiro, Editora: Roca, 2015.

MIRANDA, R. R. et al. Detergents and ultrasound evaluation for genomic dna isolation of food bacterias. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 5, n.1, p. 398-407.2011.

NEVES, S. M; GUEDES, R. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Revista Arq Instituto biológico**, v.79, n. 4, p. 627-632. 2012.

NGUYEN, H. B. Severe sepsis and septic shock: Review of the literature and emergency department management guidelines. **Revista Annals of emergency medicine an international journal**, v. 48, n.1, p. 54-65.2006.

OLIVEIRA, E. et al. Eletroforese: conceitos e aplicações. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v.11, n.22, p.11-31.2015.

OLIVEIRA, M. C. S. et al. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Revista EMBRAPA**, v.1, n.1, p.1- 43.2007.

OLIVEIRA, A. L. D. et al. Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos na infecção urinária. **Revista UNINGÁ**, v. 20, n.3, p.65-71.2014.

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: 10 mai. 2019.

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 abr. 2019.

REINHARDT, G. et al. Desenvolvimento e aplicações de vacinas gênicas no tratamento e prevenção de doenças. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v.11, n.7, p.1-18.2017.

SABA, F. et al. A rapid and reproducible genomic dna extraction protocol for sequence-based identification of archaea, bacteria, cyanobacteria diatoms, fungi, and green algae. **Revista J Med Bacteriol**, v. 5, n. 4, p. 22-28.2016

VIERA, B. C. R. et al. Metodologias utilizadas na extração de ácido desoxirribonucleico. **Revista Pubvet**, v.9, n.1, p.25-37.2015.

YUAN, S. et al. Evaluation of methods for the extraction and purification of dna from the human microbiome. **Revista Plos One**, v.7, n.3, 2012. Disponível em:<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0033865>>. Acesso 15 mai. 2019.