

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

GELSON MANUEL NETO

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA FÚNGICO E
BACTERIANO**

Juazeiro Do Norte-CE

2019

GELSON MANUEL NETO

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA FÚNGICO E
BACTERIANO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Coorientadora: Esp. Francisca Alves dos Santos

Juazeiro do Norte – CE
2019

*Dedico esse trabalho aos meus pais Luiz
João e Maria das Graças e a minha
namorada Talita Vanessa, que foram minha
base, que além de apoiarem meus estudos
sempre se fizeram presente em todos os
momentos dessa jornada acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por iluminar sempre meus passos e permitir o alcance dos meus objetivos, como este que vivencio. Pois nada acontece sem sua permissão.

É com enorme satisfação que agradeço aos meus pais Luiz João e Maria das Graças por me incentivarem a nunca parar de estudar e sempre sonhar e em especial a minha mãe, minha eterna gratidão, pelas orações e por apoiar sempre minhas escolhas.

Ao meu Amor Talita Quesado minha eterna gratidão que sempre me ouviu e me apoiou na jornada acadêmica, por me ajudar em momentos difíceis, pelas orações, pelo seu ombro e pela paciência em lutar ao meu lado.

Aos meus irmãos Luiz João e Germano Gabriel e ao meu primo Jonatas André que considero um irmão, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando acima de tudo, minha eterna gratidão por cada risada. A minha prima Fernanda Neto por ser uma das melhores amigas que alguém poderia ter.

Aos meus amigos Elias, Rui, Nádia e Jessiane que são para mim são o melhor grupo de amigos que alguém poderia ter, seja em momentos tristes ou felizes.

A minha Sogra Maria e minha cunhada Gorete, por me tratar como filho desde que comecei a fazer parte da família, se preocupando, cuidando e ajudando sempre em momentos difíceis.

Aos meus amigos da Igreja Betel Brasileiro em Serrita, em especial a Gabriel Gomes e Gleissiano.

Ao Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, coordenação do curso de Biomedicina e seu corpo docente pela excelente formação que me proporcionaram.

Agradeço imensamente a minha orientadora Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro e ao minha coorientadora Francisca Alves dos Santos, pela paciência e empenho na construção deste trabalho.

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA FÚNGICO E BACTERIANO

Gelson Manuel Neto¹, Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro²

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo otimizar protocolos de extração de DNA fúngico e bacteriano no intuito de obter metodologias mais práticas, rápidas e com menor custo, o qual se torna importante, pois trará melhorias para o desenvolvimento de pesquisas e aplicações em rotina laboratorial. As linhagens bacterianas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* ATCC 10536 e a linhagem fúngica *Candida albicans* INCQS 40006 foram cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz *Candida albicans* INCQS 40006. As metodologias adaptadas para o presente estudo foram as de: Dodecil sulfato de sódio (SDS); *Salting out* em três métodos diferentes e CTAB e o DNA foi analisado por meio de Eletroforese em gel de agarose. O melhor resultado foi observado no método de SDS, no qual apresentou boa extração, além do SDS o método de CTAB se destacou em relação a concentração obtida, entretanto é um método que exige mais tempo de realização, tem um custo elevado em relação ao SDS. Para o DNA da *Candida albicans*, o único método que conseguiu extrair uma pequena quantidade foi o Método 1 de *Salting Out* com uma concentração de 1,8 ng/μl, fato pode ser explicado devido ao trabalho não apresentar um mecanismo de quebra da parede celular do fungo, como a utilização de nitrogênio líquido ou de perlas de vidro. Sendo assim conclui-se que é possível obter uma ótima extração a partir de otimizações de protocolos, tornando as metodologias menos complexas e mais baratas, sendo possível a utilização desses dados para pesquisas futuras, para a atualização de novos protocolos, conclui-se também que para a extração de DNA da *Candida* é necessário procedimentos mais específicos para a quebra da parede celular, como a utilização de nitrogênio líquido, altas temperaturas ou até mesmo o aumento a concentração de Proteinase K utilizada.

Palavras-chave: Eletroforese. Extração de DNA. Otimização.

OPTIMIZATION OF FUNGAL AND BACTERIAL DNA EXTRACTION PROTOCOLS

ABSTRACT

This work aimed to optimize the fungal and bacterial DNA extraction protocols, in order to obtaining more practical methods, faster and the lowest cost, which becomes important as it will bring improvements to the development of research and applications in laboratory routine. The standard bacterial strains of *Escherichia coli* ATCC 25923 and *Staphylococcus aureus* ATCC 10536 and the fungal strain *Candida albicans* INCQS 40006 were provided by the Oswaldo Cruz Institute. The methodologies adapted for the present study were as follows: Sodium Dodecyl Sulphate (SDS); *Salting Out* in three different methods and CTAB and the DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis. The best result was observed in the SDS

¹ Discente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte – CE

² Mestra Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte - CE

method, which presented a good extraction, the CTAB method stood out in relation to the concentration obtained, however, is a method that requires more execution time, which is a high cost in relation to SDS, besides presenting reagents with a certain degree of toxicity. For *Candida albicans* DNA, the only method that managed to extract a small amount was Method 1 if Salting Out with a concentration of 1.8 ng / μ l, fact that can be explained why the work does not have a mechanism of breakdown of the fungal cell wall, such as using liquid nitrogen or glass pearls. Thus, it is concluded that it is possible to obtain an good extraction from protocol optimizations, becoming the methodologies less complex and more cheaper, being possible to use this data for future research, for update new protocols, It is also concluded that for *Candida* DNA extraction, more specific procedures for breaking the cell wall are necessary, such as the use of liquid nitrogen, high temperatures or even the increase of the Proteinase K concentration used.

Key words: Electrophoresis. DNA extraction. Optimization

1 INTRODUÇÃO

Tanto os fungos quanto bactérias desenvolvem um papel fundamental na vida do ser humano, podendo ser na indústria, estudos científicos, conservação ecológica ou até mesmo por habitarem no próprio organismo humano (LOPES et al., 2012).

Candida sp., *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus* são microrganismos que habitam o organismo humano em situações normais, entretanto, quando a uma baixa no sistema imunológico, esses microrganismos podem se aproveitar dessa situação, e podem causar infecções desde as mais simples e fáceis de tratar até as mais graves (BANERJEE, 1991; KAVANAGH, 2005; NATARO; KAPER, 1998; TONG et al., 2015).

Normalmente para o diagnóstico de uma infecção causada por esses microrganismos é realizado uma cultura de alguma amostra e posteriormente provas bioquímicas para chegar à conclusão de qual gênero e espécie é responsável pelo processo infeccioso. Porém a identificação por métodos moleculares pode agrupar mais informações, podendo mapear e classifica-las em subtipos com mais precisão (BRASIL, 2013).

Para que esses microrganismos sejam identificados por métodos moleculares, eles necessitam passar pelo processo de extração de DNA, que consiste basicamente de dois procedimentos principais: a lise das células e a purificação do DNA. Essa etapa é essencial para se obter uma alta eficácia em diversos métodos moleculares, para isso é necessário a escolha de um protocolo de extração ideal, que possa permitir uma boa extração, ser rápido e prático (CIBA-GEIGY, 1977; GOUVEIA; REGITANO, 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

Com o DNA já extraído, o próximo passo é avaliar a qualidade e quantidade de DNA que podem ser determinadas através de espectrofotometria, eletroforese em gel de agarose,

eletroforese capilar por focalização isoelétrica, entre outras. E em seguida a leitura da intensidade de fluorescência do brometo de etídio ou outro agente intercalante (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).

Na extração de DNA fúngico e bacteriano, além de ser realizadas por protocolos diferentes, os reagentes utilizados são de alto custo, podem apresentar um certo grau de toxicidade para os que o manuseiam e as etapas apresentadas podem ser longas e complexas (BARATTO; MEGIOLARO, 2012).

O interesse dos pesquisadores pela otimização ou criação de novos protocolos vem crescendo a cada dia, pois tem o intuito de diminuir o tempo de algumas etapas, a substituição de reagentes, livrar de resíduos, como proteínas, e sem toxicidade e até mesmo a junção para a extração de duas ou mais amostras diferentes (WEBER et al., 2010).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo otimizar protocolos de extração de DNA fúngico e bacteriano no intuito de obter metodologias mais práticas, rápidas e com menor custo, que se torna importante pois trará melhorias para o desenvolvimento de pesquisas e aplicações em rotina laboratorial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DOS TESTES

As atividades foram realizadas nos Laboratórios de Biologia Molecular e Microbiologia do Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO), Juazeiro do Norte– CE no período de Agosto a Setembro de 2019.

2.2 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas as linhagens bacterianas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* ATCC 10536 cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz, que foram mantidas em *Agar infusão de coração* (HIA), e as linhagens de *Candida albicans* INCQS 40006, também cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz, mantidas em meio Saboroud dextrose. Para obter amostra de teste inicial, foi necessário 1 ml de cultivo de cada microrganismo em tubos distintos de 1,5 ml. As amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM por 2 minutos, descartando o sobrenadante.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

2.3.1 Método Salting-Out

Para a metodologia de *salting-out*, foram realizados três testes, os quais foram utilizado a enzima Proteinase K em dois testes, variando apenas temperatura e período, sendo por 2 horas a 42°C e por 1 hora a 60°C respectivamente e no terceiro teste foi utilizado a Proteinase K (ABRÃO et al., 2005):

MÉTODO 1: 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 ou o fungo e 10 µL de proteinase K (10mg/mL) e incubados por 2h a 42oC. Após a incubação, foi observado o volume e para cada 250µL aproximadamente foram adicionar 42µL de NaCl saturado (5M), agitando manualmente com vigor. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13.000 RPM e transferido o sobrenadante para um novo tubo previamente identificado e adicionado 2 vezes o volume de etanol absoluto. Os tubos foram agitdos e centrifugar por 10 minuto a 13.000 RPM e descartar o etanol cuidadosamente e então adicionado 1mL de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o pellet. Foram centrifugados por 10 minutos a 13.000 RPM e desprezado o sobrenadante. A lavagem com etanol 70% foi repetida mais uma vez e, desprezado o sobrenadante. Os tubos foram secados a temperatura ambiente (os tubos permaneceram abertos por 30min para evaporação do etanol residual). O DNA foi resuspendido em 50µL de água ultrapura autoclavada e estocado o DNA a -20 °C. O DNA foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1% e foi visualizado o DNA corado com Blue Green sob luz UV.

MÉTODO 2: Foram adicionados 200µL de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) aos tubos de polipropileno contendo a bactéria ou o fungo e 10 µL de proteinase K (10mg/mL) e foram incubados por 1h a 60oC. Após a incubação, foi observado o volume e para cada 250µL aproximadamente foram adicionar 42µL de NaCl saturado (5M), agitando manualmente com vigor. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13.000 RPM e transferido o sobrenadante para um novo tubo previamente identificado e adicionado 2 vezes o volume de etanol absoluto. Os tubos foram agitados e centrifugar por 10 minuto a 13.000 RPM e descartar o etanol cuidadosamente e então adicionado 1mL de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o pellet. Foram centrifugados por 10 minutos a 13.000 RPM e desprezado o sobrenadante. A lavagem com etanol 70% foi repetida mais uma vez e, desprezado

o sobrenadante. Os tubos foram secados a temperatura ambiente (os tubos permaneceram abertos por 30min para evaporação do etanol residual). O DNA foi resuspendido em 50 μ L de água ultrapura autoclavada e estocado o DNA a -20 °C. O DNA foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1% e foi visualizado o DNA corado com Blue Green sob luz UV.

MÉTODO 3: Foram adicionar 200 μ L de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) aos tubos de polipropileno contendo a bactéria ou o fungo e incubados por 1h a 60oC. Após a incubação, foi observado o volume e para cada 250 μ L aproximadamente foram adicionar 42 μ L de NaCl saturado (5M), agitando manualmente com vigor. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13.000 RPM e transferido o sobrenadante para um novo tubo previamente identificado e adicionado 2 vezes o volume de etanol absoluto. Os tubos foram agitados e centrifugar por 10 minuto a 13.000 RPM e descartar o etanol cuidadosamente e então adicionado 1mL de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o pellet. Foram centrifugados por 10 minutos a 13.000 RPM e desprezado o sobrenadante. A lavagem com etanol 70% foi repetida mais uma vez e, desprezado o sobrenadante. Os tubos foram secados a temperatura ambiente (os tubos permaneceram abertos por 30min para evaporação do etanol residual). O DNA foi resuspendido em 50 μ L de água milliq autoclavada e estocado o DNA a -20 °C. O DNA foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1% e foi visualizado o DNA corado com Blue Green sob luz UV.

2.3.2 Método – SDS

O método SDS consistiu-se na lise celular com um tampão constituído de Tris-HCl 400 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, EDTA 50 mM e 1% SDS, seguidos por centrifugações e lavagens do precipitado com etanol.

Foram adicionados 300 μ L de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM) aos tubos de polipropileno contendo a bactéria ou o fungo e deixado em repouso por 20 minutos. Foram centrifugados por 2 min a 10.000 RPM e descartado o sobrenadante. O precipitado foi resuspendido em 500 μ L de tampão de lise (Tris-HCl 400mM e EDTA ,50 mM, NaCl 500mM, SDS 1%). Os tubos foram agitados vigorosamente em vortex por 15 segundos e centrifugados por 5 min a 10.000 RPM. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo posteriormente identificado e descartado o tubo com o precipitado. Foi Adicionado 1 mL de Etanol concentrado gelado e agitar por inversão lentamente. Os tubos foram centrifugar por 5 min a 10.000 RPM novamente e descartar o sobrenadante por inversão. Então foi adicionado

700 µL de Etanol 70% gelado e foram centrifugar por 5 min a 10.000 RPM. O sobrenadante foi descartado por inversão e os tubos foram colocados invertidos sobre papel absorvente para secar o pellet por aproximadamente 30 minutos. O pellet foi ressuspendido em 50µL de H₂O ultrapura e estocado a amostra a – 20°C. O DNA foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1% e foi visualizado o DNA corado com Blue Green sob luz UV. (LIMA et al., 2017).

2.3.3 Método CTAB

Foram adicionado 600 µL do Tampão de CTAB (CTAB 2% w/v 100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl e 20 mM EDTA, pH 8,0) aos tubos de polipropileno contendo a bactéria ou o fungo e incubadas em banho-maria por 40 min a 65°C, sob agitação intermitente, após a incubação foi adicionado 480 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) gelado para a remoção de proteínas e centrifugado a 12.000 RPM por 10 min; O sobrenadante foi transferido para novos tubos, em seguida foi adicionado 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) gelado. Os microtubos foram agitados suavemente e foram mais uma vez centrifugados a 12.000 RPM por 10 min, a fase aquosa foi coletada e transferida para novos microtubos onde foi adicionado 0,6 volume de isopropanol, para a precipitação do DNA, os tubos foram centrifugados a 10.000 RPM por 10 min e o pallet foi lavado uma vez com 500 µL etanol absoluto e outra com 500 µL etanol 70% e foi mais uma vez centrifugado a 12.000 RPM por 10 min, logo após os tubos ficaram secando a temperatura ambiente por 30 min. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de água ultrapura esterilizada e logo após os tubos foram armazenados a -20°C; O DNA foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1% e foi visualizado o DNA corado com Blue Green sob luz UV.

2.4 ANÁLISE EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

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.

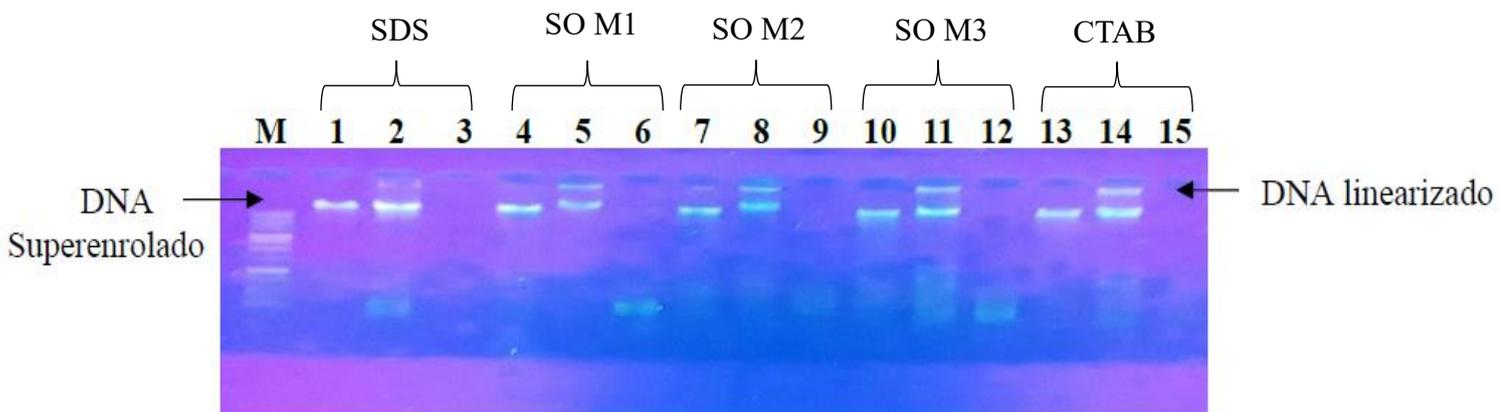
Procedimento de Eletroforese: Foi misturado 8 μ L da amostra com 5 μ L do tampão de corrida (*loading buffer*+ Intercalante de Ácidos nucleicos) e homogeneizado suavemente com a pipeta; Foi colocado o tampão TAE 1X na cuba até cobrir a base de aparato da cuba; foi colocado na cuba contendo o gel e foi 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. Essa metodologia foi realizada de acordo com os protocolos da EMBRAPA (1998) e EMBRAPA (2007).

2.5 TABULAÇÃO DE DADOS

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% de DNA genômico extraído.



M = DNA Ladder,

Staphylococcus aureus = 1, 4, 7, 10, 13;

Escherichia coli = 2, 5, 8, 11, 14;

Candida albicans = 3, 6, 9, 12, 15;

O material genômico extraído das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, resultaram e bandas bem nítidas e de boa qualidade de forma geral, pois não é observado contaminantes na corrida, porém alguns métodos se destacaram em termos de concentrações de DNA extraído como o SDS e o CTAB. Entretanto foi observado que os mesmos não foram

eficientes para a *Candida albicans*, conseguindo apresentar uma pequena banda de material genético apenas pelo método 1 de *Salting Out*.

A metodologia com mais destaque entre todos foi a de SDS por ter sido o mais rápido e pratico entre todos os outros, apesar de ser um método simples e barato por não possuir reagentes de alto custo foi o que mais se destacou em concentração de DNA extraído, além disso se destaca também pelo o fato de não apresentar uma certa toxicidade para o pesquisador em relação aos outros, sendo o SDS então o método de melhor escolha tanto para *Staphylococcus aureus* quanto para *Escherichia coli*.

Tabela 1. Concentração obtida através da análise comparativa com DNA Ladder.

	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Candida albicans</i>	
	ng/μl	ng/8μl	ng/μl	ng/8μl	ng/μl	ng/8μl
SDS	24	192	36,8	294,4	0	
SOM1	24	192	20	160	1,8	14,4
SOM2	20	160	24	192	0	
SOM3	24	192	24	192	0	
CTAB	24	192	36,8	294,4	0	

Fontes: dados da pesquisa

O método de SDS e CTAB conseguiram extrair aproximadamente a mesma quantidade de DNA, sendo 24 ng/μl para *S. aureus* e 36,8 ng/μl para *E. coli*. Os métodos foram mais eficientes para *E. coli* por ser um bacilo Gram negativo, apresentando uma delgada camada de peptídioglicano, o *S. aureus* por ser um coco Gram positivo apresenta uma camada mais espessa do peptídioglicano o que confere uma maior rigidez, conseqüentemente faz com que a quebra da parede celular apresente uma maior dificuldade (ROSA, 2008).

Segundo Baratto e Megiolaro (2012) o método por SDS se destacou mais para Gram negativas, já que a membrana celular dessas bactérias são mais simples em relação Gram positiva, fato se comprova quando se compara a quantidade de DNA extraído entre a *E. coli* (Gram negativa) em relação a *S. aureus* (Gram positiva) nesse estudo. O autor destaca também que o método é mais eficiente em termos quantitativos do que qualitativos, indicando o uso da proteinase K para livrar mais ainda as amostras de resíduos contaminantes.

Entre os três diferentes métodos de *Salting Out* o método 1, em que foi utilizado proteinase K e ficou em banho maria por 2 horas a 42° C se destacou por ter sido o único método entre todos a conseguir extrair 1,8 ng/μl do DNA da *Candida*. Porém o método 3 de *Salting Out* em que não foi utilizado a proteinase K e foi deixado no banho por 1 hora a 60° C se destacou também por conseguir extrair 24 ng/μl de DNA tanto para *S. aureus* quanto para *E. coli*, na

extração de DNA bacteriano em relação custo benefício o método 3 de *Salting Out* se destaca, por ser mais rápido e por não utilizar proteinase K.

O CTAB foi o teste que obteve a mesma concentração do método SDS, é um teste que possui um custo um tanto elevado em relação ao SDS devido a utilização de reagentes mais caros como o fenol e o clorofórmio, apesar disso é um método que realiza uma boa extração, porem possui uma desvantagem quando relacionado a segurança, pois traz riscos de toxicidade para o pesquisador, sendo necessário um capela de exaustão.

Um estudo realizado por Santos et al., (2017) comparou métodos de extração por CTAB e Kits comerciais, o método que apresentou maior eficiência foi o CTAB, o autor ainda destaca que apesar de ter sido o método com maior destaque este não possui um procedimento de purificação tão acurado quanto os Kits comerciais.

Um estudo realizado por Andreatti Filho et al., (2011) utilizou o método de CTAB e o método por lise térmica, e constatou que o método de CTAB foi mais eficiente em relação ao outro, apresentando uma enorme sensibilidade e qualidade com boa nitidez nas bandas visualizadas segundo o autor.

Para a extração do DNA da *Candida* os métodos utilizados não foram eficientes, exceto pelo Método 1 de *Salting Out* que conseguiu extrair 1,8 ng/ μ l de material genético. Foi levantado a hipótese que a provável dificuldade na extração do DNA dos métodos realizados está na estrutura celular dos fungos, devido os fungos apresentarem um componente celular que envolve a célula, denominado de parede celular que é constituída por quitina e tem a função de sustentação e proteção (KAVANAGH, 2011).

Estudos realizados por Oliveira et al., (2006) e Zimmermann et al., (2013) utilizaram métodos de extração diferentes, entretanto utilizaram um mesmo mecanismo para a quebra da parede celular com a adição de pérolas de vidro e posteriormente a agitação em vórtex. Menezes et al., (2012) utilizou uma solução de EDTA, SDS e Mercpatanol e as amostras foram incubadas a 100 °C, enquanto Castro (2017) utilizou um método de extração onde a amostra foi congelada por nitrogênio líquido e posteriormente triturada.

Diante disso pode ser observado que como o estudo não utilizou mecanismos físicos como as pérolas de vidro ou utilizou uma substancia química como o nitrogênio líquido ou quaisquer outros mecanismos para a quebra da parede celular da *Candida*. Pode então ter influenciado nos resultados da extração, com exceção do Método 1 do *Salting Out*, onde a metodologia utilizou a proteinase K e as amostras foram incubadas a 1 horas por 60° C, mesmo não sendo uma temperatura muito elevada como a dos estudos já citados, a junção entre a

temperatura e a exposição a proteinase K pode ter levado a quebra de algumas células e a obtenção de 1,8 ng/ μ l de material genético.

Tabela 2. Gasto total de cada método utilizados por amostra e tempo de realização de cada método.

Método	Custo total por amostra	Tempo de realização
SDS	R\$ 0,11	1h e 8 min
Salting Out M1	R\$ 0,51	2h e 51 min
Salting Out M2	R\$ 0,51	1h e 51 min
Salting Out M3	R\$ 0,08	1h e 51 min
CTAB	R\$ 0,22	2h e 30min

De acordo com a tabela pode se observar que os gastos foram mínimos em cada método por amostra, mostrando a vantagem do SDS e *Salting Out* Método 3 tendo-se um gasto de R\$ 0,11 e R\$ 0,08 por amostra e um tempo de realização de 1 hora e 8 minutos e 1 hora e 51 minutos respectivamente, os métodos que tiveram maiores gastos foram os métodos 1 e 2 de *Salting Out* com total de R\$ 0,51 por amostra, devido a utilização da proteinase K, além do método 1 de *Salting Out* ser um dos mais caros é o método com maior tempo de realização com total de 2 horas e 51 minutos. De forma geral os reagentes e substâncias utilizados em biologia molecular são de alto custo, porém, a quantidade utilizada por amostra é tão pouca que pode levar a metodologia a um menor custo.

CONCLUSÃO

Os testes de extração para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* obtiveram de forma geral um bom resultado, sendo possível destacar os métodos SDS e CTAB como os melhores em relação a concentração de DNA extraído, quando comparados em questão de baixo custo, boa concentração extraída, praticidade da realização, tempo de realização, toxicidade, entre outros aspectos, o que se destaca é o método de SDS.

Desta forma conclui-se que é capaz obter uma ótima extração a partir de otimizações de protocolos, tornando as metodologias menos complexas e mais baratas, sendo possível a utilização desses dados para pesquisas futuras, para a atualização de novos protocolos, sendo interessante testar temperaturas mais altas e menor tempo em banho maria, podendo haver um novo procedimento que melhore ainda mais a qualidade e quantidade de DNA extraído, além

disso conclui-se também que para a extração de DNA da *Candida* é necessário procedimentos mais específicos para a quebra da parede celular, como a utilização de nitrogênio líquido, altas temperaturas ou até mesmo o aumento a concentração de Proteinase K utilizada.

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 Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 115-119, 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.
- BANERJEE, S. N. et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980–1989. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 3, p. 86-89, 1991.
- 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.
- CASTRO, M. C. A. Ocorrência de espécies do complexo *Candida parapsilosis* em amostras biológicas de pacientes e profissionais de hospitais do Natal/RN. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.
- CIBA-GEIGY, A. G. **Wissenschaftliche Tabellen Geigy. Einheiten im Meßwesen, Körperflüssigkeiten, Organe, Energiehaushalt, Ernährung**, 8ª Edição, Editors Ciba-Geigy Limited, v.1, 1977.
- 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.
- GOUVEIA, J. J. de S.; REGITANO, L. C. de A. Extração de DNA. **Embrapa Pecuária Sudeste-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2007.

KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and Applications**. 1^a. ed. Irlanda: John Wiley & Sons, 2005.

KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and Applications**. 2^a. ed. Irlanda: John Wiley & Sons, 2011.

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: 13 de Maio 2019.

LOPES, D. S. A. et al. A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 234-245, 2012.

MENEZES, Everardo Albuquerque et al. Identificação molecular e suscetibilidade antifúngica de *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 415-420, 2012.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

OLIVEIRA, M. C. de S. et al. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE)**, 2007.

OLIVEIRA, N. C. et al. Utilização de um meio cromogênico e da técnica de semi-nested PCR para identificação de espécies de *Candida*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 27, n. 2, p. 125-132, 2006.

ROSA, Daniel Dias. Método rápido de extração de DNA de bactérias. **Summa Phytopathologica**, p. 259-261, 2008.

SANTOS, Michele Goulart et al. ESTUDO COMPARATIVO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO PARA O DNA GENÔMICO DE *Schinus molle* L. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 8, n. 2, 2017.

TONG, S. YC et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

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

ZIMMERMANN, J. B. et al. Associação entre cultura de secreção vaginal, características sociodemográficas e manifestações clínicas de pacientes com diagnóstico de candidíase vulvovaginal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 2013.