

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

RODRIGO BARBOSA DE MACÊDO

**COMPARAÇÃO ENTRE METODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE CELULAS DA
MUCOSA ORAL**

Juazeiro do Norte – CE
2019

RODRIGO BARBOSA DE MACÊDO

**COMPARAÇÃO ENTRE METODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE CELULAS DA
MUCOSA ORAL**

Artigo científico 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

RODRIGO BARBOSA DE MACÊDO

COMPARAÇÃO ENTRE METODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE CELULAS DA MUCOSA ORAL

Artigo 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

Data de aprovação: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof^a: Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro
Orientadora

Prof^a: Esp. Francisca Alves dos santos
Coorientadora

Prof: Me. Cicero Roberto Nascimento Saraiva
Examinador 1

Prof^a: Ma. Raira Justino Oliveira Costa
Examinador 2

Dedico esse trabalho aos meus pais maria zeneide e Vicente bezerra que sempre foram minha base e que sempre se fizeram presente na minha jornada acadêmica e me incentivou a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia não só na carreira universitária, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Agradeço a minha mãe heroína que me deu apoio e incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço.

Ao meu pai que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e que para mim foi muito importante.

As minhas irmãs Rayane e Raquel que sempre me ajudaram como podiam

A minha namorada Erika Viana que sempre esteve ao meu lado no meu percurso acadêmico, jamais me negou apoio e sempre me deu incentivo.

A minha orientadora Maria Karollyna que apesar da intensa rotina de sua vida acadêmica aceitou me orientar e por sempre me fazer pensar e questionar sobre o tema do meu trabalho.

Não posso deixar de agradecer a esta universidade por ser um espaço que privilegia o conhecimento.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado

COMPARAÇÃO ENTRE METODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE CELULAS DA MUCOSA ORAL

Rodrigo Barbosa de Macêdo¹, Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro²

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo, comparar um protocolo de extração de DNA da mucosa oral através de variações de protocolos já existentes na literatura, por diferentes métodos de extração, por meio da eletroforese. As amostras de células bucais foram obtidas com auxílio de um swab e colocados em tubos de polipropileno de 1,5ml contendo 300 µL de TE (Tris HCl 10mM PH 7,6; EDTA 1Mm), e foi posta em repouso por 20min e após centrifugadas por 2min a uma rotação de 10.000 RPM, e desprezado o sobrenadante. As atividades foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO), Juazeiro do Norte– CE. 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. As avaliações na eletroforese foram de acordo com a migração das bandas correspondente ao tamanho e pares de bases amplificadas pelas técnicas de eletroforese em Gel de agarose, eletroforese capilar e eletroforese em gel de poliacrilamida. Os melhores resultados foram mediante ao uso do método de *salting-out* sedo que o *salting-out* com PK 1h 42°C apresentou melhores resultados em termos de concentração de material extraído, O *salting-out*, obteve uma boa concentração extraída e nitidez das bandas na eletroforese. Conclui-se que o melhor método para uma rotina laboratorial pequena ou para pesquisas futuras seria o *Salting-out* com PK 2h 42°C, assim é possível obter uma boa extração de DNA com metodos de baixas temperaturas e com baixo grau de toxicidade.

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

¹ Discente do Curso de Biomedicina, rodrigobarosamacedo@hotmail.com do Centro Universitário Leão Sampaio- Juazeiro do Norte – CE

² Mestra Docente do Curso de Biomedicina, karollynasilva@leaosampaio.edu.br do Centro Universitário Leão Sampaio- Juazeiro do Norte – CE

COMPARISON BETWEEN ORAL MUCOSA CELL DNA EXTRACTION

METHODS

ABSTRACT

The aim of the present study was to compare an oral mucosa DNA extraction protocol through variations of existing protocols in the literature, by different extraction methods, by electrophoresis. The oral cell samples were obtained with the aid of a swab and placed in 1.5ml polypropylene tubes containing 300 μ L TE (10mM Tris HCl PH 7.6; 1Mm EDTA), and were put to rest for 20min and after centrifugation. for 2min at a speed of 10,000 RPM, and discarded the supernatant. The activities were carried out at the Biochemistry and Microbiology Laboratory of the Leão Sampaio Centro universitário (UNILEÃO), Juazeiro do Norte - CE. Because they are practical and effective, we opted for the methods dodecyl sulfate sodium (SDS), CTAB / Phenol-Chloroform, Salting-out without and with Proteinase K, which has two incubation times and different temperatures. The electrophoresis evaluations were based on the migration of the bands corresponding to the size and base pairs amplified by agarose gel electrophoresis, capillary electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis techniques. The best results were obtained by using the salting-out method because salting-out with PK 1h 42°C presented better results in terms of concentration of extracted material, the salting-out obtained a good concentration, sharpness of the bands in the electrophoresis. . The best method for a small laboratory routine or for future research would be Salting-out with proteinase K 2h 42°C, so it can be concluded that good DNA extraction with low temperature and no toxicity methods is possible.

Key words: Electrophoresis. DNA extraction. Optimization

1 INTRODUÇÃO

Todos os seres vivos guardam informações genéticas codificadas e contidas nos ácidos nucleicos essa carga genética está contida no núcleo de todas as células do organismo humano, sendo DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico). O ácido desoxirribonucleico é a “molécula conhecida como molécula da hereditariedade”, nela está contida todas as informações possíveis para que um indivíduo seja formado (PONTES,2013).

A parte fundamental que fornece todas as informações aos organismos vivos é o ácido desoxirribonucleico que codifica várias informações para a elaboração de um produto biológico, tendo como peça final, a proteína. A dupla hélice demonstra como o DNA pode ser copiado, de maneira que as informações contidas consigam se propagar de geração em geração (SCOPARO; FARIA,2017).

Diferentes amostras podem ser utilizadas para obtenção do DNA de boa qualidade, tais como, fios de cabelo, gotas de esperma, resquícios de saliva ou até mesmo restos

celulares que oferecem infinitas substâncias além do DNA. Por esse motivo foram criadas técnicas de extração com objetivo de separar proteínas e diversos elementos celulares de moléculas de ácidos nucleicos (BARREA JA et al.,2004; PONTES,2013).

Para a obtenção de DNA de células da mucosa oral, pode-se aplicar diferentes protocolos, esses apresentam variações na pesquisa clínica com relação ao tempo e custo benefício, sendo importante a avaliação de metodologias que possam diminuir o tempo, podendo ser realizada a extração por métodos químicos ou enzimáticos (HIRATA; TAVARES; HIRATA,2006). A coleta de células da mucosa oral trata-se de um procedimento indolor e não invasivo sendo simples e rápido de ser realizado na rotina laboratorial (CARVALHO,2009).

Nos testes moleculares a escolha do método ideal é crucial para a extração do Ácido desoxirribonucleico (DNA), exigindo tempo e envolvendo aspectos éticos , dando ao pesquisador a opção de escolha por reagentes de baixo custo e mais acessível, 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 (AIDAR,2006).

O interesse por parte de pesquisadores está voltado para otimização de métodos para extração de DNA, que sejam práticos, de baixo custo, livres de resíduos, como proteínas, e sem toxicidade, vem se tornado cada vez maior (ABRÃO et al.,2005).

Dentre as técnicas que são utilizadas para identificar a qualidade do DNA na área da biologia molecular, a eletroforese é uma pratica simples de rotina laboratorial que permite a separação de diferentes tipos de proteínas séricas ou plasmáticas e determina proporções relativas. São aplicadas cargas elétricas, onde haverá a migração de partículas de acordo com seu peso molecular (DE OLIVEIRA et al.,2015).

Por isso, este trabalho tem como objetivo de comparar protocolos de extração de DNA de células da mucosa oral 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 METODOLOGIA

2.1 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DOS TESTES

As atividades foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO), Juazeiro do Norte– CE no período de setembro a outubro de 2019

2.2 MÉTODOS

Por serem práticos e eficazes, optou-se pelos métodos dodecil sulfato sódio (SDS), CTAB/Fenol-Clorofório, e *Salting-out* sem e com *Proteinase K*, sendo o *salting-out* com dois tempos de incubação e temperaturas diferentes. A amostra a ser utilizada para extração foi cedida pelo próprio pesquisador.

2.2.1 Preparo da amostra

Com um swab foram coletadas células bucais e colocados em tubos de polipropileno de 1,5 mL contendo 200µL de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM) deixando em repouso por 20 min. Centrifugar por 2 min a 10.000 RPM e descartar o sobrenadante. Foram pesados os tubos de polipropileno sem a amostra, após a centrifugação retirou-se o sobrenadante e foram pesados os tubos novamente com a amostra que foi cedida pelo próprio pesquisador.

2.2.2 Métodos por *Salting-out*

Método 1: Foram adicionados 5 µL de proteinase K (10mg/mL) e incubados por 2h a 42°C. Após a incubação, foram adicionados 42µL de NaCl saturado (5M), agitando manualmente com vigor. Em seguida foi centrifugado por 2 minutos a uma rotação de 13.000 RPM. Foi transferido o sobrenadante para um novo tubo previamente identificado e adicionando 400 µL etanol absoluto, após isso agitou-se o tubo e centrifugou por 10 minutos a 13.000 RPM, após isso foi desprezado o etanol cuidadosamente e adicionado 1 mL de etanol 70%, invertendo os tubos diversas vezes para lavar o pellet, e foi centrifugo novamente por mais 10 minutos a 13.000 RPM e foi desprezado o sobrenadante. Novamente foram feitas lavagens com etanol 70% e desprezado o sobrenadante. O tubo ficou em temperatura ambiente por 30 minutos para evaporação do etanol residual. Após esse período foi resuspendido o DNA em 50µL de água milliQ autoclavada sendo estocado a -20 °C (ABRÃO et al 2005).

Método 2: Foram adicionados 5 μ L de proteinase K (10mg/mL) e incubados por 1 h a 60°C. Após a incubação, foram adicionados 42 μ L de NaCl saturado (5M), e agitado manualmente com vigor, e centrifugados por 2 minutos a 13.000 RPM. Foi transferido o sobrenadante para um novo tubo previamente identificado e adicionado 400 μ L do etanol absoluto, após isso agitou-se o tubo e foi centrifugado por 10 minutos a um rotação de 13.000 RPM e descartado o etanol cuidadosamente em seguida foi adicionado 1mL de etanol 70%, invertendo os tubos diversas vezes para lavar o pellet, e em seguida centrifugado por mais 10 minutos a 13.000 RPM e desprezado o sobrenadante. E repetida a lavagem com etanol 70% mais uma vez e desprezando o sobrenadante. O tubo ficou em temperatura ambiente por 30 minutos para evaporação do etanol residual; Após esse período foi resuspendido o DNA em 50 μ L de água milliq autoclavada e estocado o DNA a -20 °C (ABRÃO et al 2005).

Método 3: Foram incubados por 1 hora a 60°C. Após a incubação, foi adicionado 42 μ L de NaCl saturado (5M), e agitado manualmente com vigor. Foram centrifugados por 2 minutos a 13.000 RPM e Transferido o sobrenadante para um novo tubo previamente identificado e adicionados 400 μ L etanol absoluto, logo após agitou-se o tubo e foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 RPM sendo descartado o etanol cuidadosamente e adicionado 1 mL de etanol 70%, invertendo os tubos diversas vezes para lavar o pellet, sendo centrifugados por mais 10 minutos a 13.000 RPM e desprezados o sobrenadante. Foram repetidas as lavagens com etanol 70% mais uma vez e desprezados o sobrenadante. O tubo ficou em temperatura ambiente por 30 minutos para evaporação do etanol residual; após esse período o DNA foi resuspendido em 50 μ L de água milliq autoclavada sendo estocado o DNA a -20 °C. (ABRÃO, et al; 2005)

2.2.3 Método – Dodecil sulfato de sódio (SDS)

Foram centrifugados por 2 minutos a 10.000 RPM e descartado o sobrenadante e resuspendendo o precipitado em 500 μ L de tampão de lise (Tris-HCl 400mM e EDTA ,50 mM, NaCl 500mM, SDS 1%). Após isso agitou-se vigorosamente em vortex por 15 segundos e foi centrifugado por 5 minutos a 10.000 RPM e transferido o sobrenadante (fase aquosa) para um novo tubo identificado e descartado o tubo com o precipitado. Em seguida foi adicionado 1 mL de Etanol concentrado gelado, agitado por inversão lentamente. Centrifugado por 5 minutos a 10.000 RPM. Novamente foi descartado o sobrenadante por inversão, e foi adicionado 700 μ L de Etanol 70% gelado, centrifugado por 5 minutos a 10.000

RPM e Descartado o sobrenadante por inversão, foi colocado o tubo invertido sobre papel absorvente para secar o pellet por aproximadamente 30 minutos. e adicionado ao pellet 50µL de H₂O ultrapura e estocar a amostra a – 20°C (LIMA et al., 2017).

2.2.4 Métodos com CTAB/Fenol-Clorofórmio

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 as células da mucosa oral e foram 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 0,7 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 resuspendido 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.

2.3 ANÁLISE EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Preparo do Gel: Foi pesado 0,3g de agarose; e transferido para um recipiente contendo 30ml do tampão TAE e foi diluído; em uma chapa aquecedora onde será colocado e aquecido 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 solidificar.

Procedimento de Eletroforese: Foram misturados 8 µL da amostra com 5 µL 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; e colocado na cuba contendo o gel onde foi removido o pente; e em seguida aplicado, a amostra cuidadosamente para não deixar vazar do poço formado; foi fechada a cuba verificando a

posição dos eletrodos indicada pela cor; foi ligada a fonte e ajustada a voltagem e corrente. Após a corrida desligou-se a fonte e foi removido os eletrodos e retirado o gel cuidadosamente, o qual foram colocados no transluminador de luz UV e observado os resultados. Essa metodologia foi realizada de acordo com os protocolos da EMBRAPA (1998) e EMBRAPA (2007).

2.4 COMITÊ DE ÉTICA

O estudo foi submetido à aprovação pelo comitê de Ética em pesquisa do Centro Universitário Leão Sampaio através da Plataforma Brasil em total obediência à disposta na Resolução n° 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) a garantia de anonimato e sigilo das informações (BRASIL,2012).

2.5 ANÁLISE DOS DADOS

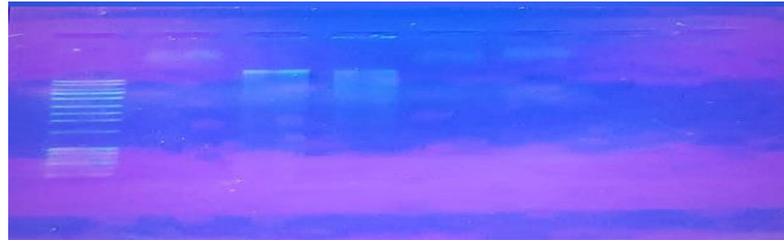
Os resultados foram tabulados em tabelas do programa Microsoft Excel® para melhor apresentação acadêmica, no qual foram avaliados os métodos entre si de acordo com tempo de extração, custo, qualidade e concentração das amostras obtidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras obtidas, é possível observar por meio da eletroforese em gel de agarose, rastros de degradação de DNA em algumas canaletas, porém alguns métodos ainda se destacaram em termos de concentração de DNA extraído, como o método de *salting-out* com PK 2h 42° c e o método *salting-out* com PK 1h 60° c, dentre esses o de maior destaque em termos de concentração e de melhor qualidade, foi o método *salting-out* com PK 2h 42° c sendo o método de melhor eficácia para extração tendo como desvantagem o tempo em banho maria, já o método com PK 1h 60° c teve menor tempo, no entanto teve maior degradação (Figura 1 e Tabela 1).

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA obtidas por diferentes métodos.

M 1 2 3 4 5



Fonte: imagem obtida através dessa pesquisa

Canaletas M= DNA Ladder 1kb plus (fisherscientific international inc). 1= método SDS; 2= método *saltig out* com PK 2h a 42° c; 3= método *saltinng out* com PK 1h 60°c 4= método *saltig out* sem PK 1h 60° c; 5= método CTAB/fenol clorofórmio.

Tabela 1. Concentrações obtidas através de análise comparativa com DNA lAdder.

Métodos	ng/8μL	ng/ μL
SDS	**	**
<i>saltig out 1</i>	32,8	4,1
<i>saltig out 2</i>	22,4	2,8
<i>saltig out 3</i>	**	**
CTAB/fenol		
clorofórmio	**	**

Fonte: dados da pesquisa

** Não foi visualizadas bandas significativas que expressem concentração de DNA

O método de SDS foi um dos métodos mais simples e rápido realizado, foram realizados também os métodos de *saltig out* e CTAB/fenol clorofórmio. Em três situações houve degradação das amostras, não sendo possível calcular a quantidade de DNA, degradação essa que pode ter ocorrido por uma baixa refrigeração, variações de temperatura e o fator de congelamento e descongelamento das amostras que interferem na concentração do material e alteração da qualidade (MELO et al.,2010).

O método de *santig-out* com proteinase K 2h 42°c e *santing-out* com proteinase K 1h 60°c foram mais eficazes em termos de concentração e boa qualidade de DNA extraído e os métodos de SDS e CTAB não conseguiu extrair quantidades suficientes de DNA (ROSA,2008).

Salting-out sem PK 1 hora a 60°c não foi eficaz quando comparado aos demais realizados pelo *Salting-out*, pois teve um tempo de realização curto, e não teve o uso da Proteinase K, e na eletroforese as bandas não ficaram bem nítida, evidenciou-se também a presença de rastros. O método por *Salting-out* com uso da Proteinase K com temperatura de 1 hora à 60°c obteve bons resultados devido ao uso da enzima. O último 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, foi o que obteve uma maior concentração de DNA extraído.

O CTBA/fenol-Clorofórmio foi o teste que apresentou resultados iguais ao *Salting out* sem proteinase K por 1 hora à 60°C e SDS, apresentando rastros e degradação do material genético. O método CTAB/fenol-Clorofórmio possui uma margem de custo um pouco maior em relação aos outros realizados por ter duas substâncias a serem compradas a mais, o fenol e o clorofórmio, o mesmo possui uma desvantagem significativa pois traz riscos de toxicidade então muitas vezes esse método não é utilizado.

O melhor teste em termo de material extraído com melhor resultado foi o *salting-out* com PK 2h 42°C esse teste é bem elucidado em relação a obtenção de ótimos resultados porém, esse teste traz consigo as desvantagens de ser de maior custo pelo uso da enzima (proteínase K) e por passar um grande período de tempo em banho maria. Segundo Lipay; Bianco (2015), existem também os *kits* comerciais para extração de DNA e apresentam maior frequência melhor qualidade e pureza, do que os métodos manuais, mas a maior desvantagem em usar *kits*, é o valor do teste.

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, presentes no fenol e clorofórmio, também por ser de baixo custo é mais compatível com a realidade laboratorial (WEBER et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

Dos testes para a extração do DNA de células da mucosa oral o que obteve melhor resultado foi o *salting-out*, sendo possível destacar dois métodos como melhores quando se trata de concentração extraída, são eles o método por *Salting-out* com proteinase K 2h 42°C e *salting-out* com proteinase K 1h 60°C. Quando comparados a uma boa concentração extraída, nitidez das bandas na eletroforese, praticidade da realização e menor temperatura e baixa toxicidade, o melhor método para uma rotina laboratorial pequena ou para pesquisas futuras seria o *Salting-out* a proteinase K 2h 42°C. Assim conclui-se que é possível obter uma boa extração de DNA com métodos de menor complexidade. Para atualizações de métodos seria

interessante testar novas temperaturas e tempos em banho maria, pois um novo procedimento podem melhorar ainda mais a qualidade e quantidade de DNA.

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 Rev Arq Bras Endocrinol Metab v.49, n.6, 2005.**
- AIDAR, M. **Extração do DNA genômico a partir de células epiteliais bucais utilizando acetato de amônio.** 2006. Dissertação (Mestrado e odontologia) - universidade estadual de campinas faculdade de odontologia de Piracicaba, Piracicaba, SP, 2006
- BAREA JA.; SALES, M. M. et al. **O laboratório de análises clínicas e a identificação de predisposição genética para trombose venosa Rev. bras. hematol. hemoter. 2004;26(4):274-281**
- 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, 2012.
- CARVALHO, S. P. M. **Avaliação da qualidade do DNA obtido de saliva humana armazenada e sua aplicabilidade na identificação forense em odontologia legal.** 2007. Dissertação de mestrado (Mestrado e odontologia) - Faculdade de odontologia de Bauru da universidade de São Paulo, São Paulo, 2009
- COELHO, E. G. A. et al. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pelos e entre técnicas de extração. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Minas Gerais, v. 56, n. 1, p. 111-115, 2004.
- DE OLIVEIRA, Evelyn et al. **Eletroforese: conceitos e aplicações** Enciclopédia Biosfera. Goiânia, 2015. 21 p. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_149>. Acesso em: 04 Mar. 2019.
- 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.
- 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.
- HIRATA, M.H; TAVARES, V.; HIRATA, R. D. C. **Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética.** Faculdade Medicina (Ribeirão Preto) 2006.
- 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: 31 de Mar 2018.

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

MELO, M. R. et al. **Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular** • J Bras Patol Med Lab • v. 46 • n. 5 • p. 375-381 , 2010

PONTES, T. C; Extração de DNA de células da mucosa oral com anti-sépticos bucais. *In*: 13 congresso nacional de iniciação científica, 2013, centro universitário das faculdades metropolitanas unidas. **Extração de DNA de células da mucosa oral com anti-sépticos bucais** [...]. Faculdade anhanguera de campinas: [s. N.], 2013.

ROSA, D.D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.3,p. 259-261, 2008.

SCOPARO, C.T; FARIA. **o exame de DNA e suas implicações jurídicas perante situações de gemelaridade univitelina e reprodução assistida heteróloga**. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2017.

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