

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO DOUTOR LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

THAINÁ DE OLIVEIRA SANTOS

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E RNA BACTERIANO

Juazeiro do Norte – CE
2022

THAINÁ DE OLIVEIRA SANTOS

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E RNA BACTERIANO

Trabalho de Conclusão de Curso – 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: Prof. Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Juazeiro do Norte – CE
2022

THAINÁ DE OLIVEIRA SANTOS

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E RNA BACTERIANO

Trabalho de Conclusão de Curso – 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: Prof. Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Data de aprovação: 17 / 06 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof(a): Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Orientadora

Prof(a): Esp. Francisca Alves Dos Santos

Co-Orientadora

Prof(a): Me. Cícero Roberto Nascimento Saraiva

Examinador 1

Prof(a): Ma. Rakel Olinda Macedo

Examinador 2

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E RNA BACTERIANO

Thainá de Oliveira Santos¹

Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro²

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo otimizar protocolos através da análise e extração de Ácidos nucleicos (DNA e RNA) bacteriano de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com a finalidade de obter metodologias mais práticas, rápidas e baixo custo. As cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram cedidas pelo Centro Universitário Leão Sampaio, onde também foi o local em que os testes de extração de DNA e RNA foram realizados. As metodologias empregadas nesta pesquisa foram: Glass beads (pérola de vidro); Carbetto de silício (SiC) e Sílica (SiO₂) associados ao método fenol-clorofórmio/álcool isoamílico. A quantificação e análise da integridade do DNA e RNA extraído foi realizada por meio de Eletroforese em gel de agarose 1%. O destaque desse trabalho foi para o método em que se utilizou o carbetto de silício, pela sua eficácia para extração simultânea de DNA e RNA de ótimo rendimento nas duas bactérias utilizadas, alta qualidade e excepcionalmente, por ser um método rápido e de baixo custo. Não há relatos do uso de carbetto de silício na purificação de RNA na literatura. Tanto o método Sílica gel quanto Glass bead utilizados para extração de ácidos nucleicos em *E. coli* não foram satisfatórios, contudo, a composição da parede celular pode estar relacionada com o baixo rendimento e/ou ausência dos ácidos nucleicos extraídos, podendo ser explicado pela grande quantidade de lipopolissacarídeos presente na parede celular de *E. coli*. O método Glass beads e sílica gel apresentaram excelentes resultados para a extração de ácidos nucleicos de *Staphylococcus aureus*, já o método de sílica gel não foi satisfatório para o rendimento de DNA e o isolamento dos RNAs ribossomais 23S e 16S, RNA 5s e RNA transportador. Conclui-se que a metodologia de Carbetto de silício proporcionou extração simultânea de DNA e RNA de melhor qualidade, otimizando o protocolo de extração de DNA e RNA bacteriano e desenvolvendo uma metodologia mais prática, rápida e de baixo custo, assim, proporcionando laboratórios de pesquisa e docência a realização de pesquisa básica utilizando ferramentas de biologia molecular em estudos de genética de microrganismos e consequentemente, oferecer ao acadêmico a oportunidade de expansão de seus conhecimentos.

Palavras-chave: Ácidos nucleicos. Bactérias. Carbetto de silício, Glass bead,

¹ Discente do curso de Biomedicina. thainadeoliveirasantos056@gmail.com. Centro Universitário Doutor Leão Sampaio.

² Docente do curso de Biomedicina. karollynasilva@leaosampaio.edu.br. Centro Universitário Doutor Leão Sampaio.

OPTIMIZATION OF BACTERIAL DNA AND RNA EXTRACTION PROTOCOLS

ABSTRACT

This work aimed to optimize protocols through the analysis and extraction of bacterial nucleic acids (DNA and RNA) of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in order to obtain more practical, fast and low cost methodologies. The bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were provided by the Leão Sampaio University Center, where the DNA and RNA extraction tests were performed. The methodologies used in this research were: Glass beads; Silicon carbide (SiC) and Silica (SiO₂) associated with the phenol-chloroform/isoamyl alcohol method. Quantification and analysis of the integrity of the extracted DNA and RNA was performed using 1% agarose gel electrophoresis. The highlight of this work was for the method in which silicon carbide was used, due to its effectiveness for the simultaneous extraction of DNA and RNA of great yield in the two bacteria used, high quality and exceptionally, for being a fast and low cost method. There are no reports of the use of silicon carbide in RNA purification in the literature. The Silica gel and Glass bead methods used to extract nucleic acids in *E. coli* were not satisfactory, however, the cell wall composition may be related to the low yield and/or absence of extracted nucleic acids, which can be explained by the large amount of lipopolysaccharides present in the cell wall of *E. coli*. The three methods used for the extraction of *Staphylococcus aureus* nucleic acids showed excellent results, although the silica gel method was not satisfactory for DNA yield and isolation of 23S and 16S ribosomal RNAs, 5s RNA and transfer RNA. It is concluded that the silicon carbide methodology provided the simultaneous extraction of better quality DNA and RNA, optimizing the bacterial DNA and RNA extraction protocol and developing a more practical, fast and low-cost methodology, thus providing minimally structured laboratories. conducting basic research using molecular biology tools in microorganism genetics studies and, consequently, offering the student the opportunity to expand their knowledge.

Keywords: Bacteria. Glass bead, Nucleic acids. Silicon carbide.

1 INTRODUÇÃO

Bactérias estão presentes por todos os lugares, estando também presente na microbiota natural dos seres humanos, e podem se tornar patogênicas de acordo com as condições imunológicas do indivíduo. São microrganismos procariontes e unicelulares que podem ser encontradas isoladamente ou em arranjos e apresentam-se em várias morfologias, como cocos, bacilos, bastonetes e espiroquetas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Células bacterianas contém apenas um cromossomo, envolvido por uma membrana nuclear. Seu material genético consiste em uma única molécula circular de DNA, organizada frouxamente, de replicação semiconservativa e de fita dupla, desprovida de membrana nuclear, proteínas e divisão mitótica (ROSSETTI, 2014).

Algumas bactérias também possuem plasmídeos, que são estruturas extras cromossômicas circulares de DNA e ficam livres no citoplasma, podendo se reproduzir independentemente do DNA cromossômico (REINHARDT et al., 2017).

São divididas em Gram positivo e Gram negativo. As Gram positivo possuem uma parede celular mais espessa que é composta por ácido teicóico e várias camadas de peptidoglicano, enquanto as Gram negativo possuem uma estrutura mais complexa, sua parede celular é envolta por uma membrana externa composta principalmente por lipopolissacarídeo, que funciona como uma barreira de permeabilidade seletiva (BROMBERG et al., 2006).

A diferenciação das bactérias através do Gram é muito importante para conclusão de diagnósticos e para indicar o melhor tratamento para as infecções. Geralmente as bactérias Gram negativo são as mais patogênicas (MARANNI; CENA, 2019).

As bactérias do gênero *Escherichia coli* são bacilos Gram negativos que pertencem ao grupo das enterobactérias fazem parte da microbiota humana, estando presentes no intestino e geralmente são incapazes de causar doenças em indivíduos saudáveis. Porém quando se encontram fora do intestino possuem a capacidade de desencadear respostas imunes, sendo a principal causadora de infecções no trato urinário (EUSÉBIO et al., 2016).

Staphylococcus aureus são cocos Gram positivos que tendem a se organizar em cachos e pertencem à família Staphylococcaceae. É uma bactéria de importância clínica, pois apesar de fazer parte da microbiota normal, também é responsável por diversos processos infecciosos. Podendo provocar infecções simples como uma espinha a uma infecção mais grave como a pneumonia e a meningite (BRAGA; CARDOSO, 2018).

Staphylococcus aureus é potencialmente patogênico ao ser humano e uma das suas principais características é ser altamente oportunista, se destacando principalmente nos ambientes hospitalares (MANDAL et al., 2015).

O DNA forma o genoma de todos os organismos contendo as informações genéticas necessárias para o seu funcionamento e regulação. Assim, foram desenvolvidas diferentes técnicas moleculares que permitem extrair e analisar o DNA. Os objetivos destas análises genéticas consistem em entender o funcionamento normal das células e identificar as causas das diferentes doenças existentes, principalmente como diagnóstico de doenças genéticas e de doenças adquiridas por vírus, bactérias e protozoários (HEPP; NONOHAY, 2016).

Para a realização de análises moleculares, a escolha da metodologia é de suma importância uma vez que, as biomoléculas de DNA ou RNA devem apresentar alto rendimento e ótima qualidade. Diversas metodologias para as mais variadas aplicações são difundidas e que variam de métodos denominados “in house” a kits comerciais, entretanto, todos com o mesmo princípio que são a lise celular, purificação das biomoléculas e solubilização (ALVES, et al., 2021). Contudo, esses métodos são na sua maioria, laboriosos, demorados, e no caso de kits comerciais têm um custo excessivamente elevado.

Para a realização dos testes é necessário a extração do DNA, que inicia com a lise da membrana e solubilização do DNA ou RNA, que geralmente é feito com detergentes, em seguida é feita a limpeza dos contaminantes como proteínas e outras macromoléculas, que é feita a partir de métodos químicos e enzimáticos, pois o material deve ser livre de contaminantes e por último é feita a precipitação alcoólica do DNA (SABA, et al., 2016).

Análises preliminares como quantificação e pureza das biomoléculas purificadas são realizadas comumente por espectrofotometro com OD 260 nm para DNA e 280 nm para RNA, e/ou por eletroforese em gel de agarose onde é possível quantificar e avaliar a integridade das moléculas. A eletroforese consiste em um método que utiliza correntes elétricas para promover a separar fragmentos de macromoléculas, como o DNA, RNA e proteínas quando estas moléculas estão em uma matriz como gel de agarose e ou acrilamida submerso em um tampão e aplicado uma corrente elétrica e voltagem específica. Através de um gel, as macromoléculas vão se movendo em diferentes direções e velocidades de acordo com o seu peso molecular e carga elétrica (OLIVEIRA et al., 2015).

As moléculas de DNA apresentam carga elétrica negativa por conta do grupo fosfato dos nucleotídeos, e quando são submetidas a um campo elétrico, move-se para o polo positivo (NETO, 2019).

Tendo em vista a importância do estudo de organismos a partir de biomoléculas como DNA e RNA, o desenvolvimento e/ou otimização de métodos que possibilite a purificação simultânea dessas moléculas com alto rendimento, livre de contaminantes é relevante, assim, o presente estudo tem como objetivo desenvolver métodos mais rápidos e de menor custo para purificação simultânea de DNA e RNA e assim, proporcionar laboratórios minimamente estruturados a realização de pesquisa básica utilizando ferramentas de biologia molecular em estudos em genética de microrganismos e conseqüentemente, oferecer ao acadêmico a oportunidade de expansão de seus conhecimentos.

2 METODOLOGIA

2.1 CULTURA BACTERIANA

Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, as quais foram inoculadas em 10 mL de meio de cultura líquido (BHI) em tubo de 15 mL tratado com água DEPC (Diethylpyrocarbonete) 0,01% e esterilizados. Os inóculos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por aproximadamente 24 horas. As cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram cedidas pelo Centro Universitário Leão Sampaio, onde também foi o local em que os testes de extração de DNA e RNA foram realizados.

Para a obtenção da massa bacteriana final, os microtubos de 2.0 mL livre de RNases e estéreis foram pesados e posteriormente transferido alíquotas de 1 ml da cultura e centrifugadas por 2 min a 13.000 rpm em rotor gelado. Foi descartado o sobrenadante e repetido o mesmo procedimento mais duas vezes para obtenção do sedimento bacteriano. Após essa etapa, os tubos contendo as bactérias foram pesados novamente e obtido o peso final de bactérias em cada tubo e seguido o procedimento de extração dos ácidos nucleicos.

2.2 MÉTODOS PARA ROMPIMENTO NA MEMBRANA CELULAR:

2.2.1 Método 1: Glass beads (pérola de vidro)

Para realização dessa metodologia, os testes foram baseados no estudo de Weiss et al. (2016). As pérolas de vidro foram submergidas em uma solução de Hidróxido de potássio 1M por 5 minutos e posteriormente lavadas com água destilada e mergulhadas na solução de ácido clorídrico 1M por 5 minutos.

Foram novamente lavadas com água destilada e etanol absoluto por duas vezes durante 5 minutos. Após isso, foram esterilizadas e armazenadas em tampão Tris-EDTA-DEPC 0,01% (Tris 10 mM, EDTA 10mM, pH 7.5) até o seu uso. O sedimento com as bactérias foi suspenso em 1 mL de solução tampão de extração, sendo adicionada as glass beads. As amostras foram mantidas sob agitação em vórtex por 20 min.

2.2.2 Método 2: Carbetto de Silício (SiC)

Esse método foi baseado na técnica proposta por Rosa (2008), onde 10 gramas de carbetto de silício foram tratadas com uma solução de 50 mL de ácido clorídrico 10 M, por 2 horas a temperatura de 30°C, seguida de lavagem contínua por 12 horas com água destilada/DEPA 0,01%, e posteriormente autoclavado a 120°C por 20 minutos e seco em estufa a 70°C por 24 horas. O sedimento com as bactérias foi suspenso em 1 mL de tampão de extração, sendo adicionado o carbetto de Silício. As amostras foram mantidas sob agitação em vórtex por 20 minutos.

2.2.3 Método 3: Sílica (SiO₂)

Para realização desse método, foram utilizadas técnicas baseadas nos estudos de Boom et al. (1989) e Boumba et al. (2015). 12 gramas de dióxido de silício 60G (SiO₂) foram dissolvidas em 100 mL de água Milli-Q/DEPC 0,01% e deixadas em repouso para sedimentação por 24 horas a temperatura ambiente. Após isso, foi removido o sobrenadante (86 mL) e adicionado novamente água Milli-Q/DEPC 0,01% até atingir o volume de 100 ml, agitado vigorosamente e após 5 horas, removido o sobrenadante (88 mL) e adicionado HCl 1M até atingir pH 2.0.

A amostra foi agitada vigorosamente e aguardada novamente sua sedimentação durante 5 horas. Após esse período, foi removido o sobrenadante e adicionado HCl (1 M) até atingir pH 2,0. O sedimento com as bactérias foi suspenso em 1 mL de tampão de extração, sendo adicionada a sílica. As amostras foram mantidas sob agitação em vórtex por 20 minutos.

2.3 PURIFICAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para realização dessa etapa, a metodologia empregada foi baseada nos métodos de AUSUBEL et al.,1999; SAMBROOK et al., 1987; RIVAS et al., 2001; NUYTS et al., 2001.

Para garantir que os materiais e reagentes estivessem livres de RNAses, todos foram tratados e/ou preparados com água DEPC 0,01% e esterilizados.

As amostras obtidas nos procedimentos anteriores identificadas como 1a, 1b, 1c para *E. coli* e 2a, 2b, 2c para *S. aureus* foram ressuspensas em 570 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) gelado e 30 µL de solução de SDS 10%. Foi adicionado sílica gel em 1a e 2a; carvão de silício em 1b e 2b; glass bead em 1c e 2c e em seguida agitado vigorosamente no vortex por 30 segundos. Após agitação vigorosa por 10 segundos, foram mantidas por uma hora em agitação a 200 rpm em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl (5 M) gelado, e nova agitação vigorosa por 10 segundos por inversão, seguido da adição de 100 µL de solução de CTAB (CTAB 10% em NaCl 0,7 M). Foi realizada uma nova agitação em vortex por 30 segundos a 200 rpm por uma hora à temperatura ambiente.

Em seguida, foram adicionados 600 µL fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) de agitação por 5 minutos à temperatura ambiente manualmente. Centrifugadas as amostras a 13.000 rpm por 15 minutos, transferido o sobrenadante para novo microtubo e adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram homogeneizados por inversão por 5 minutos à temperatura ambiente e nova centrifugação a 13.000 g por 15 minutos. A fase aquosa resultante (superfície) foi transferida para um novo tubo, adicionado 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M (pH 5,0) e adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado.

A precipitação foi realizada incubando os tubos a -20 °C por 30 minutos seguida por centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol (70%) gelado por duas vezes, centrifugando-se a 7.000 rpm por 5 minutos cada vez. Após o descarte do sobrenadante da última lavagem, os tubos contendo o pellet foram colocados inverso sob o papel toalha por aproximadamente 30 minutos para evaporação do etanol. A solubilização dos ácidos nucleicos foi feita pela adição de 50 µL de água livre de RNAses, e os tubos ficaram em repouso e posterior quantificação.

2.4 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para realização da eletroforese, a cuba, e acessórios foram tratados com água DEPC 0,01% para garantir a integridade do RNA. Preparou-se o gel de agarose a 1% em TAE 1X diluído em água DEPE e posteriormente após resfriamento e solidificação aplicou-se 10 µL da amostra juntamente com 1.0 µL do intercalante Blue Green Loading Dye I (LGC

Biotecnologia). A corrida foi realizada em cuba de eletroforese contendo o tampão TAE 1X/DEPC a 75 volt por 30 minutos e em seguida, visualizado em transluminador de luz UV 260 nm. Para comparar o rendimento do DNA, utilizou-se o marcador de peso molecular 1Kb plus Fisher BioReagentts.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

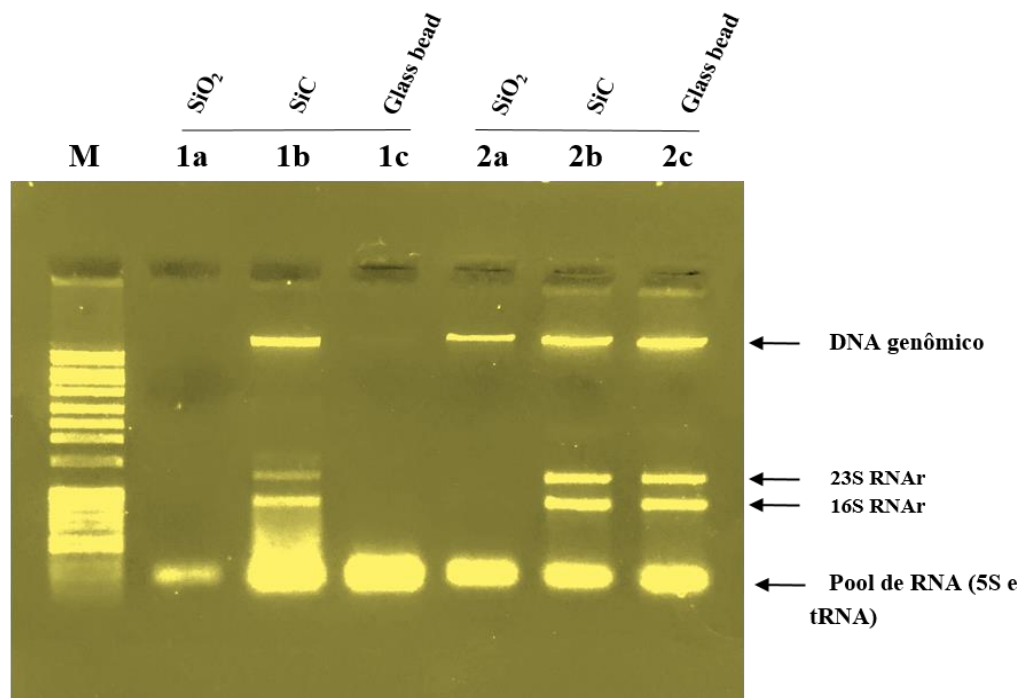
Tabela 1: Massa bacteriana utilizada nas extrações versus rendimento de DNA obtido.

Amostra	Massa bacteriana (mg)	Método	Rendimento de DNA (ng/10µL)
<i>E. coli</i> (1a)	10	SiO ₂	Não detectado
<i>E. coli</i> (1b)	20	SiC	70
<i>E. coli</i> (1c)	17	Glass bead	5
<i>S. aureus</i> (2a)	23	SiO ₂	43
<i>S. aureus</i> (2b)	17	SiC	80
<i>S. aureus</i> (2c)	17	Glass bead	85

De acordo com os resultados expostos acima na tabela 1, o rendimento dos DNAs extraídos não apresentam uma correlação direta com o peso inicial das células, mas, com os métodos avaliados e a espécie bacteriana. É notável a discrepância nos resultados de DNA e RNA obtido a partir de *Escherichia coli* em relação a *Staphylococcus aureus*, com exceção da amostra 1b, onde a massa celular e o DNA obtido são relativamente altos. No presente trabalho, os métodos tanto de sílica gel quanto glass bead utilizados para extração de ácidos nucleicos em *E. coli* não foram satisfatórios, contudo, a composição da parede celular pode estar relacionada com o baixo rendimento e/ou ausência dos ácidos nucleicos obtidos, assim, sendo necessário uma reavaliação nas etapas de lise celular, aumentando o tempo de agitação no aparelho Vortex e nas etapas subsequentes de purificação dos ácidos nucleicos por centrifugações.

Para a amostra 1b, onde foi utilizado o método de extração com carbeto de silício, obteve-se um bom rendimento e alta qualidade de DNA, assim como de RNAs ribossomais 23 S e 16S, RNA 5S e RNA transportador, o que mostra ser um método promissor para extração simultâneo de DNA e RNA de *E. coli*, figura 1. Os métodos de sílica gel e glass bead utilizados para extração de ácidos nucleicos em *E. coli* não foram satisfatórios.

Figura 1: Gel de agarose 1%: Canaleta M= DNA Ladder 1 Kb Plus Fisher BioReagents; canaletas 1a, 1b, 1c *Escherichia coli*; canaletas 2a, 2b, 2c *Staphylococcus aureus*.



Em testes realizados por Weiss et al., 2016 o método glass beads mostrou-se eficaz para extração do DNA de *Giardia* sp.

Segundo Ferreira & Santos (2015) os protocolos utilizando partículas de sílica para a separação e captação do DNA de *Salmonella* sp. demonstrou ser uma metodologia eficaz, simples, rápida, fácil, com boa amplificação do DNA e baixo custo. Salientando que nesse trabalho o autor utilizou o método apenas para extração de DNA.

. O método Glass beads e sílica gel apresentaram excelentes resultados para a extração de ácidos nucleicos de *Staphylococcus aureus*, já o método de sílica gel não foi satisfatório para o rendimento de DNA e o isolamento dos RNAs ribossomais 23S e 16S, RNA 5s e RNA transportador. Teixeira et al. (2012) realizou uma metodologia associando sílica com tiocianeto de guanidina para extração de DNA em amostras de leite, onde obtiveram um bom resultado com um custo benefício favorável. As metodologias avaliadas neste trabalho são comumente utilizadas associadas com outros métodos para realizar a extração de DNA de bactérias Gram Positivas e Gram negativas obtidas de cultivos (ROSA, 2008).

A grande relevância desse trabalho é para o método que se utilizou o carbeto de silício pela sua eficácia para extração simultânea de DNA e RNA de ótimo rendimento, alta qualidade e excepcionalmente, por ser um método rápido e de baixo custo. Não há relatos do

uso de carbeto de silício na purificação de RNA na literatura. A sua função é essencialmente na lise celular, onde o seu contato com as células sob agitação vigorosa em aparelho vortex aumenta a fricção e ocorre uma “perturbação ultrassônica” na estrutura da parede celular promovendo a lise e liberação das biomoléculas. O carbeto de silício, é um composto químico de silício e carbono largamente usado como abrasivo na fitopatologia, limpeza de metais. (ROSA, 2008).

4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que através da otimização dos protocolos de extração de RNA e DNA bacteriano, foi possível desenvolver metodologias de extração simultânea de RNA e DNA de boa qualidade e com melhor custo benefício. Dando destaque para o método no qual foi utilizado carbeto de silício, pois apresentou maior eficácia um ótimo rendimento, alta qualidade e por ser um método rápido e de baixo custo, assim, proporcionando laboratórios de pesquisa e docência a realização de pesquisa básica utilizando ferramentas de biologia molecular em estudos de genética de microrganismos e consequentemente, oferecer ao acadêmico a oportunidade de expansão de seus conhecimentos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, P. G. S. et al. Optimization of gram positive bacteria DNA extraction protocols and purity and concentration analysis by gel electrophoresis. **Revista interfaces**, v. 9, n. 2. 2021
- AUSUBEL, F. M. et al. **Short protocols in molecular biology**. 4 ed. New York: John Wiley, 1999.
- BOOM, R. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.L] v. 28, n. 8, p. 495-503, nov. 1989. American Society for Microbiology.
- BOUMBA, L. M. A. et al. Optimization of a manual and rapid Silica-based DNA Extraction Method: Applied to Human papillomavirus detection using fresh Cervical Biopsies Samples. **International Journal of Scientific and Research Publications**, [S. L.], v. 5, n. 3, p. 1-6, mar. 2015.
- BRAGA, R. P.; CARDOSO, T. dos R. Contaminação por cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em aparelhos celulares e resistência aos antibióticos como fatores de risco: revisão de literatura. **Psicologia e Saúde em debate**, v. 4, 2018. Disponível em: <http://psicodebate.dpgpsifpm.com.br/index.php/periodico/article/view/406>. Acesso em: 13 out. 2021.
- BROMBERG, R. et al. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis ssp. hordniae* ctc 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, 2006.
- 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 : 19 nov. 2021.
- FERREIRA, A. C. R., SANTOS, B. M. Avaliação de três métodos de extração de DNA de *Salmonella sp.* em ovos de galinha contaminados artificialmente. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 37. 2015.
- HEPP, D.; DE NONOHAY, J. S. A importância das técnicas e análises de DNA. **ScientiaTec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS**. Porto Alegre, v. 3, n. 2, 2016.
- MANDAL, S. M., GHOSHA, K., PATI, B. R. Dissemination of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus* strains isolated from hospital effluents. **American Journal of Infection Control**, v. 43, 2015.
- MARANNI, A. C.; CENA, C. R. Espectroscopia Óptica Aplicada Para Diferenciação de Bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas In Reuniões Anual da SBPC, 2019, Campo Grande – MS. **71ª Reunião Anual da SBPC**. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2019.
- NETO, G. F. S. Avaliação do uso de imagens digitais para determinações quantitativas em eletroforese em gel. **Repositório UNB** 89 f., il. Dissertação (Mestrado em Química)—Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

NUYTS, S. et al. Efficient isolation of total RNA from *Clostridium* without DNA contamination. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 4 p. 235-238, 2001.

OLIVEIRA E.de. et al. Eletroforese: conceitos e aplicações. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, 2015.

REINHARDT, G. et al. Desenvolvimento e aplicações de vacinas gênicas no tratamento e prevenção de doenças. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 11, n. 7. 2017.

RIVAS, R. et al. Na effective, rapid and simple method for total RNA extraction from bactéria and yeast. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 51, p. 119-121, 2002.

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

ROSSETTI, M. L. R., A célula e seus constituintes moleculares. In ZAHA, A.; FERREIRA, H. E.; PASSAGLIA, L. M. P., **Biologia Molecular Básica**. São Paulo: Artmed, 2014. Pag 3-4.

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. 2016.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIASTIS, T. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Habor Laboratory, 1987.

TEIXEIRA, L. V. et al. Extração de DNA e avaliação da composição espécie-específica de queijos. **Arq. Bras. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 3, p. 721-726, 2012.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R, CASE, C.L., **Microbiologia**, 12^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

WEISS, P. H. E. et al. Comparação de seis métodos de extração de DNA genômico de *Giardia duodenalis*. **Clinical & Biomedical Research**. v. 36, n. 1. Porto Alegre, 2016.