

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ELIZABETH CRISTINA VIEIRA DE FREITAS

CO-EXTRAÇÃO DE DNA E RNA DE *Candida albicans* UTILIZANDO UM MÉTODO QUÍMICO EM CONJUNTO COM CARBETO DE SÍLCIO A PARTIR DE POUCAS CÉLULAS

Juazeiro do Norte – CE
2023

ELIZABETH CRISTINA VIEIRA DE FREITAS

CO-EXTRAÇÃO DE DNA E RNA DE *Candida albicans* UTILIZANDO UM MÉTODO QUÍMICO EM CONJUNTO COM CARBETO DE SÍLÍCIO A PARTIR DE POUCAS CÉLULAS

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.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Co-orientador: Esp. Francisca Alves dos Santos

ELIZABETH CRISTINA VIEIRA DE FREITAS

CO-EXTRAÇÃO DE DNA E RNA DE *Candida albicans* UTILIZANDO UM MÉTODO QUÍMICO EM CONJUNTO COM CARBETO DE SÍLÍCIO A PARTIR DE POUCAS CÉLULAS

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.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Co-orientador: Esp. Francisca Alves dos Santos

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof(a): _____
Prof.^a Dr.^a Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Prof(a): _____
Prof.^a Ma. Tassia Thaís Al Yafawi

Prof(a): _____
Prof. Me. Plínio Bezerra Palácio

Dedico esse trabalho aos meus Pais que com todo esforço e dedicação me ajudaram a concluir a graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e força para vencer todos os obstáculos e barreiras encontrados ao longo da graduação. Aos meus pais por me incentivarem a nunca desistir dos meus sonhos e objetivos mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço também a minha família materna e paterna por todo apoio e acolhimento para a concretização desse sonho além de compreender minha ausência durante a formação.

Agradeço a todos os professores e amigos que me auxiliaram no decorrer dessa caminhada. Agradeço imensamente a minha orientadora Maria Karollyna, minha co-orientadora Francisca Alves e colaboradores por toda paciência, dedicação, suporte e ensinamento não só para que eu pudesse concluir com êxito esse trabalho, mas também pudesse me tornar uma profissional melhor a cada dia.

CO-EXTRAÇÃO DE DNA E RNA DE *Candida albicans* UTILIZANDO UM MÉTODO QUÍMICO EM CONJUNTO COM CARBETO DE SÍLÍCIO A PARTIR DE POUCAS CÉLULAS

Elizabeth Cristina Vieira de Freitas¹; Francisca Alves dos Santos²; Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro².

RESUMO

O estudo objetivou a otimização de protocolos na extração conjunta do ácido desoxirribonucleico (DNA) e do ácido ribonucleico (RNA) a partir de poucas células de *Candida albicans*, dado que desvantagens obstam a extração do material genético. Em razão disso, protocolos são adaptados de acordo com as amostras biológicas utilizadas além de visar o desenvolvimento de métodos rápidos, baratos e que preservem a pureza e o rendimento do material isolado. Visto isso, grânulos de Carbeto de Silício (SiC) tratados foram adicionados as amostras fúngicas dos métodos 1, 2 e 3 obtidos a partir de alíquotas do meio BHI ou Sabouraud para provocar a lise celular e possibilitar o isolamento dessas macromoléculas pelo fenol e clorofórmio. Sendo, a concentração e integridade dos ácidos nucleicos obtidas, respectivamente, por espectrofotometria através de razões a A_{260}/A_{280} e eletroforese em gel de agarose a 1%. Dessa maneira, o estudo ao comparar os métodos adaptados concluiu que o método 3 é o que mais compreende amostras consideradas puras tanto de DNA quanto de RNA, simultaneamente. Além disso, foi verificado na eletroforese a presença RNAs íntegros e correspondentes em tamanho de pares de base como rRNA 5.8 S e tRNA, tendo em vista, as particularidades do RNA, o que o torna muito instável e facilmente degradado. Portanto, resultando num método mais rápido e simples além de obter resultados promissores utilizando quantidades mínimas de amostra biológica, tendo em consideração, as dificuldades enfrentadas pelos laboratórios de pequeno porte no trabalho com a biologia molecular.

Palavras-chave: Ácidos nucleicos. Clorifórmio-fenol. Extração.

CO-EXTRACTION OF DNA AND RNA FROM *Candida albicans* USING A CHEMICAL METHOD IN CONJUNCTION WITH SILICON CARBIDE WITH FEW CELLS

ABSTRACT

The study aimed to optimize protocols for the joint extraction of deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA) from a few cells of *Candida albicans*, given that disadvantages prevent the extraction of genetic material. For this reason, protocols are adapted according to the biological samples used, in addition to aiming at the development of fast, inexpensive methods that preserve the purity and yield of the isolated material. In view of this, treated Silicon Carbide (SiC) granules were added to fungal samples of methods 1, 2 and 3 obtained from aliquots from BHI or Sabouraud medium to cause cell lysis and enable the isolation of these macromolecules by phenol and chloroform. Being, the concentration and integrity of the nucleic acids obtained, respectively, by spectrophotometry through ratios to A_{260}/A_{280} and electrophoresis in 1% agarose gel. In this way, the study, when comparing the adapted methods, concluded that method 3 is the one that most comprises samples considered pure both of DNA and RNA, simultaneously. In addition, the presence of intact and corresponding RNAs in size of base pairs such as 5.8 S rRNA and tRNA was verified in

¹ Discente do curso de Biomedicina. Elizabeth_vieira.freitas@hotmail.com. Centro Universitário Leão Sampaio.

² Técnica do curso de Biomedicina. Franciscaalves@leaosampaio.edu.br. Centro Universitário Leão Sampaio.

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

the electrophoresis, considering the particularities of the RNA, which makes it very unstable and easily degraded. Therefore, resulting in a faster and simpler method, in addition to obtaining promising results using minimal amounts of biological sample, taking into account the difficulties faced by small laboratories in working with molecular biology.

Keywords: Nucleic acids. Chloroform-phenol. Extraction.

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é um fungo comensal que integra a microbiota de diversas mucosas em indivíduos saudáveis sem ocasionar doenças. Entretanto, em hospedeiros imunocomprometidos essa espécie pode se tornar patogênica. Deste modo, possui a capacidade tanto de coexistir como comensal quanto de predominar como patógeno fúngico em seres humanos. Sendo fatores utilizados para adaptação e virulência: o desenvolvimento de diversos polimorfismos, adaptação nutricional e a produção de biofilme, entre outros fatores (DADAR et al., 2018; LI et al., 2019; MAYER; WILSON; HUBE, 2013; WANG, 2015).

Assim, o uso da biologia molecular a partir do estudo do material genético é o que possibilita não só a compreensão de características particulares e fundamentais, mas também a detecção desses seres quando presente em outros seres vivos. Dessa forma, o isolamento de material genético é o marco inicial no estudo mais detalhados sobre qualquer ser. Dado que independente da complexidade apresentam a capacidade de sintetizar macromoléculas, a exemplo dos ácidos nucleicos e proteínas, as quais contém todas as informações necessárias para o funcionamento celular (MELLO et al., 2015; NELSON; COX, 2019; PINHO, 2006).

Em razão disso, não existe protocolos únicos nem fixos para extração de material genético já que o isolamento de material genético de qualidade e quantidade necessita de uma escolha comedida do método de extração, pois sofrem variações de acordo com as amostras utilizadas. Além disso, as adequações nessas metodologias objetivam a criação de protocolos menos dispendiosos, rápidos e que mantém a qualidade e o rendimento do material isolado (CORRÊA et al., 2013; MARTINS; BARBOSA, 2020; SOUZA et al., 2020), tornando-se valiosa tanto para fins de pesquisa quanto para utilização em rotinas laboratoriais que visam o diagnóstico molecular de microrganismos.

Deste modo, métodos que utilizam o carbeto de silício (SiC) em sua composição buscam não só auxiliar na ruptura de estruturas celulares, como também proporcionar homogeneidade as amostras. Assim, os grânulos de SiC são utilizados como agentes abrasivos na etapa de lise celular, por serem compostos cerâmicos estáveis e inertes produzidos

industrialmente. Visto que estruturas compostas por paredes celulares demandam condições mais vigorosas para a liberação do conteúdo citoplasmático, por serem mais resistentes em comparação com estruturas que só possuem membrana plasmática (GORG; WEISS; DUNN, 2004; ROSA, 2008; SILVA, 2018a; STIPP, 2009; PORTO; SANTOS; OLIVEIRA, 2018).

A partir disso, a eletroforese em gel de agarose é uma etapa importante. Visto que, a partir dessa ferramenta podemos não só avaliar a integridade do material genético isolado quando observados sobre a luz raios ultravioletas, mas também a capacidade dos mais diferentes métodos de extrair material genético. Ao passo que a extração de material genético de alta pureza, concentração e rendimento é primordial no estudo genômico de qualquer organismo devido a sua utilização em processos posteriores, como sequenciamento, análise da expressão gênica e PCR (MELLO et al., 2015; VIANA et al., 2015).

Dessa maneira, a adequação é significativa, pois busca otimizar o processo de extração do material genético fúngico que é obstado por diversos fatores, além de ser o primeiro passo no estudo da biologia molecular, sobretudo, em laboratórios de pequeno porte. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o rendimento, a pureza e a integridade dos ácidos nucleicos isolados pelo protocolo adaptado para a extração conjunta de DNA e RNA de *Candida albicans*, utilizando um método químico em conjunto com SiC a partir de poucas de células, seguido de acréscimos gradativos para avaliação da sua eficácia.

2 METODOLOGIA

2.1 PREPARO DE MATERIAIS

Com base na metodologia empregada nos métodos de Oliveira; Simões-Araujo; Baldini (2005) e Rosa (2008), para realização da extração conjunta de ácidos nucleicos, todas as soluções foram preparadas em água deionizada tratada com Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 1:1000 (v/v), a 37°C por 24 horas e, por conseguinte, autoclavada. As vidrarias utilizadas também foram tratadas e autoclavadas a 120°C por 20 minutos e os plásticos, como ponteiras e tubos de polipropilenos, foram assegurados como isentos de DNases e RNases.

2.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS FÚNGICAS

Para obtenção das amostras fúngicas da espécie *Candida albicans*, duas alçadas de uma cepa padrão identificada como NCP 3179 semeada em ágar Sabouraud Dextrose obtida

em colaboração com o Laboratório Vicente Lemos, situado no Crato-CE, foram inoculadas tanto em aproximadamente 60 mL meio líquido Brain Heart Infusion (BHI) estéril, preparado em frasco tratado com H₂O/DEPC 1:1000 (v/v) e estéril, quanto em meio sólido Sabouraud Dextrose, preparado em duas placas estéreis. Após isso, o meio BHI semeado foi incubado em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C, enquanto as placas de meio Sabouraud foram incubadas em câmara úmida por cerca de 2 semanas cada. Em seguida, foram preparadas alíquotas contendo amostras fúngicas a partir dos meios semeados (Tabela 1).

Assim, foram preparadas ao total 30 amostras, sendo 10 amostras obtidas a partir de alíquotas retiradas do meio BHI e transferidas para tubos Falcon de 15 mL estéreis, denominado método 1, que foram centrifugadas a 3.500 rpm por 5 min. para o descarte do meio BHI e as células ressuspensas em 10 mL de salina. Como também, foram obtidas 10 amostras a partir de cada placa de Sabouraud, em que se utilizou colônias retiradas diretamente do meio, denominado método 2 e método 3. Desse modo, o máximo de colônias da placa foi transferido para um tubo Falcon estéril contendo 10 mL de salina, em seguida as células foram ressuspensas em vórtex até completa homogeneização e separadas em alíquotas. Posteriormente, foi retirado 20 µL de cada amostra para a contagem de células e as suspensões foram transferidas para tubos de 2.0 mL estéreis livres de DNases e RNases, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Amostras obtidas em meio líquido BHI, Sabouraud Dextrose.

Amostra	Método 1	Método 2	Método 3
	mL	mL	mL
1	0,1	0,2	0,2
2	0,5	0,4	0,4
3	1,0	0,6	0,6
4	1,5	0,8	0,8
5	2,0	1,0	1,0
6	2,5	1,2	1,2
7	3,0	1,4	1,4
8	3,5	1,6	1,6
9	4,0	1,8	1,8
10	4,5	2,0	2,0

Fonte: Elaborada pela autora.

A contagem de células foi realizada no hemocitômetro central da Câmara de Neubauer através da contagem de 5 campos contendo 16 subcampos, contados em uma linha traçada na diagonal. Após isso, o número total de células por mL foi estimado através do cálculo com as células contidas em 10 uL (Tabela 3). Por fim, as suspensões em salina armazenadas em tubos de 2.0 mL foram novamente centrifugadas a 3.500 rpm por 5 min. para o descarte da salina e armazenadas a -20°C até o momento das extrações.

2.3 TRATAMENTO DO CARBETO DE SILÍCIO

Na utilização dessa metodologia, o SiC com granulometria entorno de 320 μm foi tratado de acordo com protocolo utilizado por Rosa (2008), em que 10 gramas de SiC foi acrescido de uma solução de 50 ml de ácido clorídrico 10 M, por um período de 2 horas a uma temperatura aproximadamente de 30°C , e, por conseguinte, foi continuamente lavado por 12 horas em água DEPC 1:1000 (v/v) estéril. Em seguida, o material foi autoclavado a 120°C por 20 min. e seco em estufa a 70°C por 24 horas e armazenado até o uso.

2.4 PURIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Para a extração dos ácidos nucleicos, utilizou-se o SiC de acordo com as descrições feitas por Rosa (2008), com o objetivo de potencializar a ruptura celular devido seu caráter inerte e abrasivo. Os reagentes utilizados nas extrações foram preparados com H₂O DEPC 1:1000 (v/v), mantidos em refrigeração a 4°C e no decorrer do procedimento condicionados em banho de gelo, exceto o Dodecilsulfato de sódio (SDS) e o Cetyltrimethylammonium (CTAB), visto que precipitam em baixas temperaturas.

Como também, as amostras foram preservadas em banho de gelo durante o processo de extração, exceto quando o protocolo recomendava temperatura ambiente. As etapas de agitação, centrifugação e tempo de precipitação dos ácidos nucleicos descritos por Oliveira Simões-Araujo; Baldini (2005), foram modificadas com o objetivo de reduzir o tempo de execução do protocolo (Tabela 2) e nas etapas de centrifugação recomendada a 4°C , o rotor da centrífuga “não refrigerada” foi previamente mantido em freezer para a realização das centrifugações.

Tabela 2: Etapas modificadas versos o método de Oliveira, Simões-Araújo, Baldini (2005)

Etapas	Oliveira; Simões-Araújo; Baldini (2005)	Método adaptado	
		Método 1 e 2	Método 3
Sedimentação celular	2 min./10.000 g (4°)	5 min./3,500 rpm*	5 min./3,500 rpm*
Homogeneizado por inversão	10 segs.	10 segs.	10 segs.
Homogeneização em vórtex	1 hora (200 rpm)	1 min.*	2 min.*
Homogeneizado por inversão	10 segs.	10 segs.	10 segs.
Homogeneização em vórtex	1 hora (200 rpm)	1 min.*	2 min.*
Homogeneizado por inversão	10 min.	5 min.*	5 min.*
Centrifugação	15 min./10.000 g (4°)	15 min./15.000 rpm*	15 min./15.000 rpm*
Homogeneizado por inversão	10 min.	5 min.*	5 min.*
Centrifugação (4°)	10 min./10.000 g (4°)	15 min./15.000 rpm*	15 min./15.000 rpm*
Precipitação	3 horas a -20°C	30 min. a -20°C*	30 min. a -20°C*
Centrifugação	10 min./10.000 g (4°)	15 min./15.000 rpm*	15 min./15.000 rpm*
Centrifugação	5 min./7.000 g (4°)	5 min./10.000 rpm*	5 min./10.000 rpm*
Secagem	30 min.	30 min.	30 min.
Solubilizado em 50 µL de água	-----	-----	-----
Tempo de execução	06 h 50 min 06 seg.	02 h 10 min 50 seg.	02 h 12 min 50 seg.

* Etapas modificadas

Fonte: Elaborada pela autora.

Inicialmente, em um tubo Falcon de 15 mL livre DNase e RNase contendo TE (Tris 10 Mm, EDTA 1mM, pH 8,0) foi adicionado o SiC (0,35 mg por amostra), em uma quantidade proporcional para utilização em todas amostras. A mistura foi homogeneizada utilizando uma pipeta de 1 mL e a partir da mistura foram transferidos 570 uL para cada tubo contendo a amostra fúngica contida em tubos de polipropileno de 2.0 mL livre de DNases, RNases, estéreis e previamente identificados.

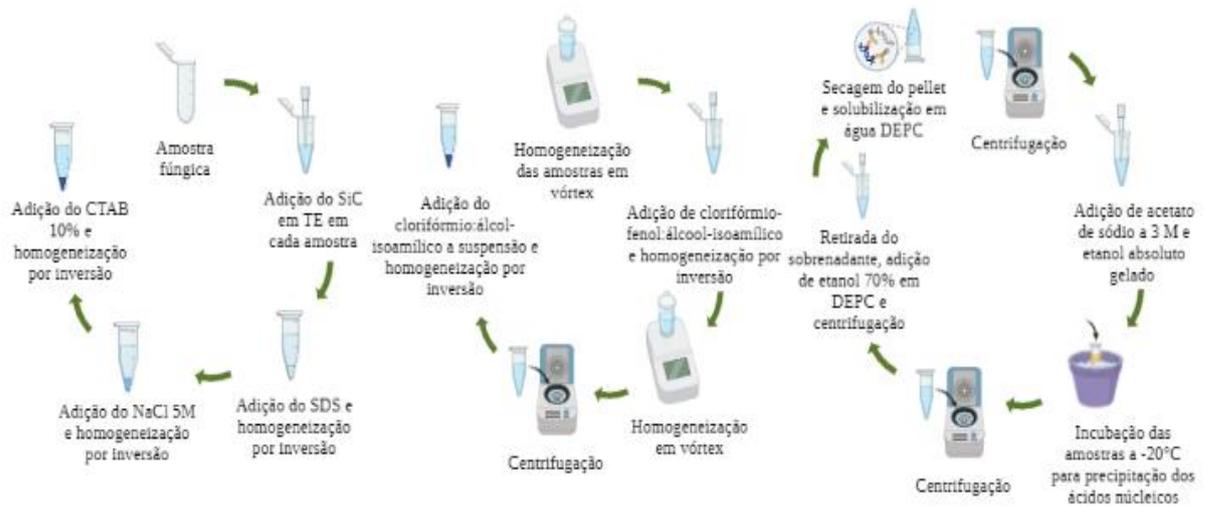
A seguir, foram adicionados a cada tubo, 30 uL de SDS 10% e agitado por 10 seg. por inversão manualmente. Após isso, foi adicionado 100 uL de NaCl 5 M /DEPC e agitado por 10 seg. também por inversão. Por último, foi adicionado 100 uL da solução de CTAB 10% (CTAB dissolvido em NaCl 0,7M) e as amostras foram agitadas por 1 min. em vórtex, contudo no método 3 o tempo de vórtex foi elevado para 2 minutos (Tabela 2).

Logo após, foram adicionados 600 uL (1:1) de fenol-clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1) e homogeneizados por 5 min. manualmente por inversão. Entretanto, no método 2, esta etapa com fenol/clorofórmio foi realizada duas vezes. Em seguida, as amostras foram agitadas novamente em vórtex, sendo que no método 3 a agitação foi de 2 min. (Tabela 2). Depois disso, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 15 min. e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 2.0 mL observando o volume final para posterior adição de 1 volume de clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1) e homogeneização por inversão por 5 min. à temperatura ambiente.

Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 15 min. e o sobrenadante transferido para outro microtubo de 2.0 mL observando o volume final para subsequente adição de 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M (pH 5,0) e dois volumes de etanol absoluto gelado. Após isso, as amostras foram incubadas a -20°C por 30 min. para a precipitação dos ácidos nucleicos. Aguardado esse período, foi realizada uma nova centrifugação a 15.000 rpm por 15 min.

Por fim, ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70% em água DEPC 1:1000 (v/v). Logo em seguida, tudo foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min. Sendo essa etapa de adição de álcool, descarte do sobrenadante e centrifugação realizada por duas vezes. Após a última lavagem, o pellet foi seco por cerca de 30 min. por inversão sobre um papel absorvente. Logo a secagem, os ácidos nucleicos foram solubilizados em 50 uL de água/DEPC e os tubos deixados em repouso por 15 a 20 min. para posterior análise da integridade dos ácidos nucleicos como mostra o Esquema 1.

Esquema 1: Processo de purificação e precipitação dos ácidos nucleicos



Fonte: Elaborado pela autora na plataforma Biorender.

2.5 ANÁLISE DA INTEGRIDADE

Para a realização da eletroforese em gel de agarose 1%, o passo a passo foi baseado em protocolos anteriormente consolidados para análise da integridade do material genético de Sambrook; Russel (2001).

Assim, inicialmente a cuba e os demais acessórios a serem utilizados foram tratados com água DEPC 1:1000 (v/v). Posteriormente, foi preparado do gel de agarose a 1% em TAE 1X. Dessa maneira, após a montagem do sistema de eletroforese, 8 uL da amostra foram misturados em 1 uL do agente intercalante Blue Green Loading Buffer Dye – (LGC Biotecnologia) e aplicados no gel. E submetidos a uma voltagem constante de 100 volts por 20 min. em tampão TAE 1X/DEPC para posterior visualização em transiluminador de luz UV 260 nm.

2.6 QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS ISOLADOS

A avaliação do grau de pureza e quantificação dos ácidos nucleicos isolados foi obtida em espectrofotômetro de microvolume da Agilent Bio Tek Synergy LX Multimode Reader modelo Cytation 7 através da placa Take 3 em colaboração com o Laboratório de Bioprospecção Molecular e Métodos Alternativos da URCA, situado no Crato-CE. Para essa finalidade foi utilizado 2 µL de cada amostra. Sendo a pureza e concentração obtidas em A_{260}/A_{280} (Tabela 3).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, são dispostos em forma de tabela os dados obtidos na quantificação das amostras, no rendimento e o índice de pureza dado pela razão A_{260}/A_{280} do método 1, 2 e 3.

Tabela 3: Concentração e pureza dos ácidos nucleicos totais isolados de *Candida albicans*

Cultivo	Amostra	Nº células/mL (x 10 ⁶ UFC)	Rendimento (ng/μL)		Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	
			DNA	RNA	DNA	RNA
Método 1 (BHI)	1	0.025	-	-	-	-
	2	0.075	-	-	-	-
	3	0.115	-	-	-	-
	4	0.115	-	-	-	-
	5	0.160	24.8	-	1.3	-
	6	0.260	-	-	-	-
	7	0.270	59.3	26.0	1.4	1.2
	8	0.295	72.4	36.1	1.4	1.2
	9	0.405	57.7	25.6	1.3	1.13
	10	0.595	61.9	31.1	1.4	1.1
Método 2 (Sabouraud)	1	0.816	7.9	50.7	1.0	1.3
	2	1.632	86.9	-	1.4	-
	3	2.448	126.1	84.0	1.5	1.4
	4	3.264	102.3	61.9	1.6	1.4
	5	4.080	93.9	49.0	1.6	1.4
	6	4.896	263.7	231.4	2.1	2.2
	7	5.712	325.2	288.2	2.2	2.2
	8	6.528	165.9	145.5	2.1	2.1
	9	7.344	354.9	302.8	2.1	2.2
	10	8.160	569.8	477.6	2.2	2.2
Método 3 (Sabouraud)	1	0.622	35.2	29.3	2.0	2.0
	2	1.244	47.5	40.4	1.8	1.7
	3	1.867	49.8	42.4	2.0	2.0
	4	2.489	97.7	83.4	2.1	2.1
	5	3.112	126.5	108.1	2.1	2.1
	6	3.734	202.0	171.9	2.2	2.2
	7	4.356	209.6	177.1	2.2	2.2
	8	4.979	228.9	190.4	2.2	2.2
	9	5.601	220.2	185.7	2.2	2.2
	10	6.224	384.2	312.6	2.2	2.2

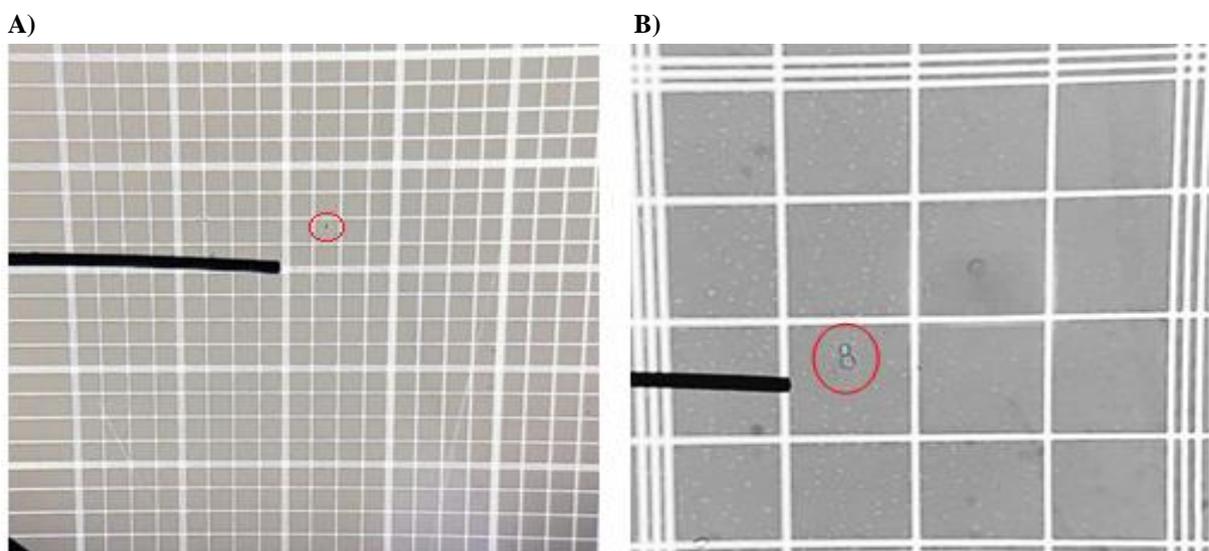
Fonte: Elaborada pela autora.

Para as extrações no método 1, a menor quantidade de células fúngicas obtida foi 0.025×10^6 UFC, e a quantidade máxima 0.595×10^6 UFC (Tabela 3). Quanto para as extrações das amostras dos métodos 2 e 3, a obtenção de um maior número de células, como evidenciado nas primeiras amostras desses métodos, respectivamente, 0.816 e 0.622×10^6 UFC, se deve, sobretudo, ao maior crescimento das colônias em meio Sabouraud (Tabela 3).

Visto isso, a quantificação de células de microrganismos é relevante não só em áreas, como microbiologia, saúde pública e indústria farmacêutica, mas também na biologia molecular, uma vez que é necessária uma quantidade mínima de amostra biológica para a obtenção de DNA e/ou RNA (GREGHI, 2005; IBRAHIM, 2011; PESSÔA, 2008; REIS et al., 2012). E é reafirmado por Silva (2018b), dado que para ele uma boa quantidade de células independentemente do tipo de amostra utilizada é o que possibilita a estabilidade e bom isolamento do material genético.

Logo após, na figura 1 é possível visualizar a morfologia de *Candida albicans* utilizada na contagem de células nos métodos 1, 2 e 3.

Figura 1: Visualização da morfologia de *Candida albicans* em Câmara de Neubauer



A) Visualização da morfologia de *Candida albicans* no aumento de 100x; B) no aumento de 400x.

Fonte: Elaborada pela autora.

A morfologia leveduriforme foi a forma utilizada para contagem de células e preparação das amostras de *Candida albicans* nos métodos 1, 2 e 3 (Figura 1). Assim para Pêsoa (2008) estudos não demonstram que algumas morfologias fúngicas comprometem a

determinação do número de células. Embora, a metodologia de contagem adotada deve ser aquela que oferece, principalmente, aos laboratórios de pequeno e médio porte, custo benéfico. É nesta perspectiva que a contagem em Câmara de Neubauer ainda é utilizada. Além de muitos desses métodos automáticos ainda subestimarem valores, necessitarem de aperfeiçoamento, como visto no estudo de Soares (2021) e Gomide; Cunha; Gomide (2022).

Quanto a análise de rendimento e pureza, no método 3 observa-se um aumento 'exponencial' dos ácidos nucleicos extraído em relação ao número de células, da amostra 1 à amostra 10, e uma pureza homogênea entre estas. O que não acontece nas amostras dos métodos 1 e 2 (Tabela 3), devido há um forte indicio da presença de contaminantes, como proteínas e fenol. Apesar, do rendimento não superar o método 2 devido ao número de células, o método 3 apresentou resultados de pureza superiores (Tabela 3).

Apesar das diferenças entre os métodos adaptados no presente estudo em relação ao protocolo padrão, segundo Beltrão et al. (2007) e Oliveira et al. (2016), razões A_{260}/A_{280} com valores entre 1,8 e 2,0 para DNA indicam a presença de uma amostra pura e livre da contaminação por proteínas, carboidratos e compostos fenólicos. Assim, razões $< 1,8$ podem ser um indicativo da contaminação por proteínas, enquanto valores $> 2,0$ indicam contaminação por reagentes, como o fenol. No entanto, no método de extração com SiC realizado por Rosa (2008), razões de absorvância de DNA entre 1,55 a 1,78 foram consideradas como de boa qualidade e com baixas concentrações de proteínas.

Em relação a pureza do RNA, são considerados ideais valores próximos a 2,0. (BARBAS III et al. 2007). Embora, para Petrucelli (2017) são limites aceitáveis, razões entre 1,8 a 2,0 ou até valores superiores, como 2,1. Portanto, o método 3 é o que mais compreende amostras consideradas puras tanto de DNA quanto de RNA simultaneamente, como fica evidente nas amostras 1, 2 e 3 desse método. Apesar de para MELLO et al. (2015), valores superiores a 30 ng/mL de material genético, como os obtidos em quase todas as amostras do método 2 e 3, já serem satisfatórios para aplicação em metodologias, como a PCR.

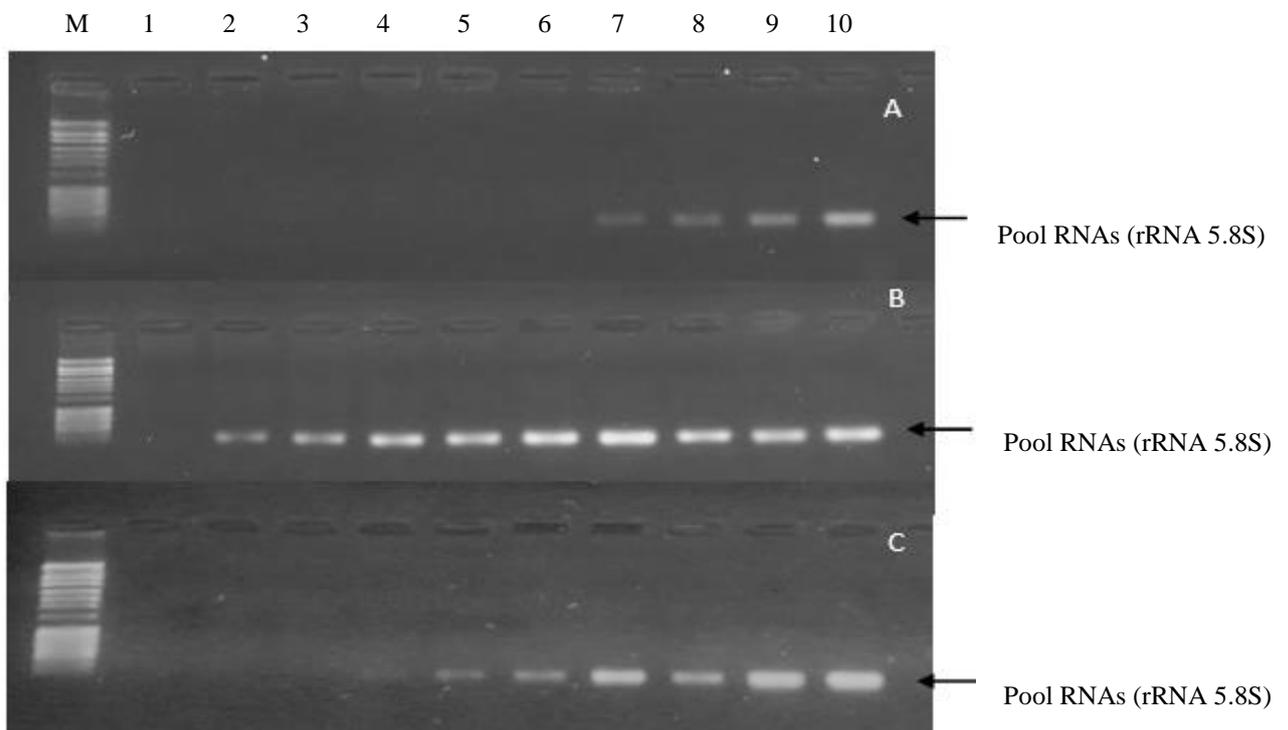
Em relação ao número de células e o rendimento, no método 1 a baixa concentração de DNA e RNA está correlacionada com o baixo número de células. Entretanto, em algumas amostras sugere-se que a baixa concentração de DNA e RNA é devido a uma ruptura da parede celular fúngica ineficiente, principalmente, na amostra 1 do método 2 (Tabela 3).

Assim, corrobora com Valadares-Ingliš; Melo (1998), pois o sucesso no isolamento é influenciado, sobretudo, por características celulares da amostra. Principalmente, a composição celular fúngica, que diverge de células eucarióticas animais, pela presença de uma parede celular que confere resistência e proteção (ZAITZ, 2010). Sendo a lise parcial das

amostras confirmada por Sambrook; Russel (2001), quando citam a obtenção de 5.000 a 10.000 ng de RNA por 10^6 células a depender do tecido. E evidenciado pelo rendimento máximo de RNA obtido pelo presente estudo que foi de 477.6 ng.

Em seguida, se encontram dispostos na forma de imagem os resultados obtidos através de eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras dos métodos 1, 2 e 3 a fim de comparação e posterior análise da integridade.

Figura 2: Análise de integridade dos ácidos nucleicos em gel de agarose a 1%



M) DNA Ladder 1 kb Plus – exACTGene Fischer BioReagente; A) Amostras de 1 a 10, método 1; B) método 2; C) método 3.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na avaliação da integridade das amostras isoladas por meio da eletroforese em gel de agarose 1%, é possível notar um pool pequeno formado a partir da amostra 7 a 10 método 1, da 2 a 10 método 2 e da 4 a 10 no método 3. Contudo, não são observados rastros nos géis, sugestivo de degradação ou deterioração, especialmente, do RNA. Deste modo, a eletroforese sugere integridade das amostras observadas. Ainda, é verificado nas amostras um pool de pequenos RNAs que correspondem em tamanho de pares de base como rRNA 5.8 S e tRNA (figura 2).

Apesar da presença da molécula de DNA não ser verificada nos géis, os resultados obtidos na eletroforese foram promissores. Além de corroborar com as análises de rendimento e pureza obtidos pela espectrofotometria no presente estudo. Haja vista, as particularidades do RNA. O qual, segundo Devlin (2011) torna esta molécula muito instável e facilmente degradada. Por esse motivo, Dettogni; Louro (2016) ratifica que o RNA é tão frágil que merece atenção especial durante o processo de extração. E métodos otimizados especificamente para sua proteção devido à dificuldade de laboratórios em isolar esse material genético em algumas amostras biológicas.

4 CONCLUSÃO

O protocolo adaptado nos métodos se mostrou extremamente promissor por obter amostras consideradas puras e integras inclusive para a utilização em diversas ferramentas moleculares e em um menor tempo. Assim, resultando no desenvolvimento de um método mais rápido e simples além de obter excelentes resultados utilizando quantidades mínimas de amostra biológica, tendo em consideração, a dificuldade dos laboratórios de pequeno porte em isolar materiais genéticos em algumas amostras biológicas, seja pela escassez de recursos ou pela demora dos protocolos padrões. Ou ainda, por características celulares de algumas amostras.

Sendo assim, o presente trabalho demonstra uma possibilidade de aplicação no dia a dia com a utilização de quantidades mínimas de amostras para análise e a liberação laudos. Além da liberação de exames mais agilmente e com uma maior precisão pelos laboratórios.

REFERÊNCIAS

- BARBAS III, C. F. et al. Quantitation of DNA and RNA. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2, n. 11, 2007. Disponível em: <<https://cshprotocols.cshlp.org/content/2007/11/pdb.ip47.full>>. Acesso em: 07 jun. 2023.
- BELTRÃO, F. A. S. et al. Avaliação da diversidade genética através de rapd de acessos de Maniçoba (*Manihot Pseudoglaziovii* Pax & Hoffm.) e de duas espécies afins de interesse forrageiro. **Revista Caatinga**, v. 20, n. 2, p. 118-126, 2007.
- BOOM, R. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503. 1990.
- 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**, v. 5, n. 3, p. 1-6. 2015.
- CORRÊA, A. A. P. et al. Análise quali-quantitativa da extração de DNA em *Jatropha spp.* **Científica**, v. 41, n. 2, p. 235-245, 2013.
- DADAR, M. et al. *Candida albicans* - biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – Na Update. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, n. 19, p. 128-138, 2018.
- DETTOGNI, R. S.; LOURO, I. D. Desafios da extração do RNA do vírus da dengue (ligação e extração ao DNA: métodos, aplicações e limitações). In: RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à Agro&Industria: fundamentos e aplicações – volume 4**. São Paulo: Blucher, 2016. p. 937-966.
- DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**, 7 ed. São Paulo: Blucher, 2011.
- GORG, A.; WEISS, W.; DUNN M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665–3685, 2004.
- GOMIDE, J. V. B.; CUNHA, E. V.; GOMIDE, G. B. Detecção e contagem automáticas de leveduras viáveis e inviáveis utilizando técnicas de visão computacional. **Conjecturas**, v. 22, n. 2, p. 401–418, 2022.
- GREGHI, S. Q. **Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para detecção de coliformes totais e coliformes fecais em amostras de água, em comparação com a técnica de fermentação em tubos múltiplos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas Câmpus Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2005.
- IBRAHIM, R. I. H. A modified CTAB protocol for DNA extraction from Young flower petals of some medicinal plant species. **Gene Conserve**, v. 10, n. 40, p. 165-182. 2011.

LI, Q. et al. Decreasing Cell Population of Individual *Candida* Species Does Not Impair the Virulence of *Candida albicans* and *Candida glabrata* Mixed Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1.600, p. 1-12, 2019.

MARTINS, S. S. O.; BARBOSA, A. M. Metodologia de coleta e extração de DNA da Acariquara-Branca (*geissospermum urceolatum* a.h. Gentry, 1984), no município de Manacapuru, km 60 – comunidade Nova Esperança. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 69130-69141, 2020.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MELLO, L. M. de. et al. Isolamento de DNA genômico a partir de folhas secas de *Erythrina crista-galli* L., FABACEAE (Corticeira-do-banhado). **Revista Thema**, v. 12, n. 1, p. 15-32. 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 7 ed. Porto Alegre: Artmed Editora LTDA, 2019.

OLIVEIRA, A. L. M. de; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, J. I. Extração Conjunta de DNA e RNA Bacteriano de alta Pureza. In: Unidade Descentralizada da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Comunicado técnico 75**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. ISSN:1517-8862.

OLIVEIRA, W. G. et al. GelRed TM na coloração de DNA em *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Revista Espacios**, v. 37, n. 25, p. 19-25, 2016.

PESSÔA, G. S. **Avaliação de procedimentos para contagem de *Saccharomyces Cerevisiae* em Sistemas De Análise Por Injeção Em Fluxo (Fia)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfazemas, 2008.

PETRUCELLI, M. F. **Avaliação do perfil transcricional de *Trichophyton rubrum* co-cultivado com queratinócitos humanos HaCat utilizando RNA-Seq**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Ribeirão Preto UNAERP, Ribeirão Preto, 2017.

PINHO, M. S. L. Pesquisa em Biologia Molecular: Como Fazer? **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 26, n. 3, p. 331-336, 2016.

PORTO, A. C. M.; SANTOS, M. L.; OLIVEIRA, A. C. Qualidade de variáveis fitopatômicas geradas a partir de escala de nota para o patossistema CABMV – maracujazeiro ‘amarelo’. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 12, n. 1, p. 58-67, 2018.

REIS, C. P. et al. Controle microbiológico de formulações farmacêuticas parentéricas. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 1, n. 9, p. 95-101, 2012.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**, 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SILVA, L. C. R. **Produção de Carbetto de Silício em escala piloto**. 2018. Monografia (Graduação em Engenharia de Minas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018a.

SILVA, R. C. F. **Desenvolvimento de kit e protocolos alternativos para a coleta e extração de DNA de amostras forenses e restos mortais degradados**. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018b.

SOARES, A. B. **Análise comparativa dos métodos de quantificação das formas morfológicas de *Candida albicans* em culturas planctônicas e biofilmes**. 2021. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2021.

SOUZA, M. R. de. et al. Comparação de métodos de extração de RNA aplicados a culturas de amiláceas utilizadas na produção de etanol: Uma revisão bibliográfica. **Revista Desafios**, v. 7, n. 3, p. 134-144, 2020.

STIPP, L. C. L. **Transformação genética de abobrinha-de-moita e melancia para resistência ao Papaya ringspot vírus – type Watermelon e ao Zucchini yellow mosaic vírus**. 2009. Tese (Doutorado em Ciência) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2009.

VALADARES-INGLIS, M. C.; MELO, I. S. de. Métodos de extração de DNA e suas aplicações em estudos genéticos e ecológicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 187-204.

VIANA, J. P. G. et al. Comparison of eight methods of genomic DNA extraction from babassu. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18003-18008, 2015.

WANG, Y. Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 307-308, 2015.

ZAITZ, C. et al. **Compêndio de Micologia Médica**, 2. ed. São Paulo: Grupo GEN, 2010.