

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MARIA RAÍSSA VIEIRA LOPES

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA DE *Candida albicans*

Juazeiro do Norte-CE
2023

MARIA RAÍSSA VIEIRA LOPES

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA DE *Candida albicans*

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. Dra. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Coorientadora: Esp. Francisca Alves dos Santos

Juazeiro do Norte – CE
2023

MARIA RAÍSSA VIEIRA LOPES

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA DE *Candida albicans*

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. Dra. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Coorientadora: Esp. Francisca Alves dos Santos

Data de aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a: Esp. Francisca Alves dos Santos
Coorientadora

Prof.^a. Ma. Tassia Thaís Al Yafawi
Examinador 1

Prof(a): Prof. Me. Plínio Bezerra Palácio
Examinador 2

Dedico esse trabalho a Deus, a minha família e a todos que estiveram comigo nessa jornada acadêmica, me dando forças para continuar.

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA DE *Candida albicans*

Maria Raíssa Vieira Lopes¹, Francisca Alves dos Santos², Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro²

RESUMO

Este trabalho otimizou os protocolos através da extração de RNA fúngico de *Candida albicans* com a finalidade de obter metodologias mais práticas, de baixo custo e boa qualidade. As cepas fúngicas foram cedidas pelo laboratório Vicente Lemos - unidade Crato e os testes para extração de RNA foram realizados no Centro Universitário Doutor Leão Sampaio. As metodologias empregadas nesta pesquisa foram: Tiocianato de guanidina fenol-clorofórmio, Tiocianato de guanidina fenol-clorofórmio associado ao carbeto de silício (SiC) e extração com TRI Reagente®. A análise da integridade do RNA extraído foi realizada por meio de Eletroforese em gel de agarose 1% e a avaliação do grau de pureza e quantificação do material extraído foi obtida em espectrofotômetro de microvolume da Agilent Bio Tek Synergy LX Multimode Reader modelo Cytation 7 através da placa Take 3, o qual foi realizado em colaboração com o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da URCA, situado no Crato-CE. Os resultados de rendimento obtidos foram baixos, podendo estar relacionados com a resistente parede celular fúngica, entretanto foram obtidos dados significativos quanto a integridade do material. A extração de RNA com TRI Reagente® é comumente utilizada para esse fim, mas, no presente estudo, esse método foi o que apresentou resultados mais insatisfatórios, com rendimento abaixo de 30ng de RNA total por mL. Na eletroforese em gel de agarose foi possível visualizar discretas bandas de RNAr 5.8S nas últimas amostras do método 1 e 2, além de observar que o material estava íntegro, sem formação de rastros nas bandas. Conclui-se, portanto, que apesar de não ter obtido resultados significativos quanto ao rendimento e pureza das amostras, foi possível obter, por meio de algumas adaptações, protocolos rápidos, econômicos e que extraem material íntegro. Propiciando, dessa forma, que as práticas de biologia molecular sejam ofertadas em laboratórios de pequeno porte como os de ensino, propiciando essa vivência ao aluno ainda na graduação.

Palavras-chave: Carbeto de silício. *Candida albicans*. RNA. Tiocianato de guanidina.

¹Discente do Curso de Biomedicina, mraissavl@gmail.com do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-Juazeiro do Norte-CE

² Técnica de laboratório do curso de Biomedicina, franciscaalves@leaosampaio.edu.br do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio- Juazeiro do Norte-CE

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

OPTIMIZATION OF METHODS FOR RNA EXTRACTION FROM *Candida albicans*

ABSTRACT

This work optimized the protocols through the extraction of fungal RNA from *Candida albicans* in order to obtain more practical methodologies, with low cost and good quality. The fungal strains were provided by the Vicente Lemos laboratory - Crato unit and the tests for RNA extraction were carried out at the Centro Universitário Doutor Leão Sampaio. The methodologies employed in this research were: phenol-chloroform guanidine thiocyanate, phenol-chloroform guanidine thiocyanate associated with silicon carbide (SiC) and extraction with TRI Reagent®. The analysis of the integrity of the extracted RNA was performed using 1% agarose gel electrophoresis and the evaluation of the degree of purity and quantification of the extracted material was obtained in a microvolume spectrophotometer from Agilent Bio Tek Synergy LX Multimode Reader model Cytation 7 through the Take 3 plate, which was carried out in collaboration with the Microbiology and Molecular Biology Laboratory of URCA, located in Crato-CE. The yield results obtained were low, which may be related to the resistant fungal cell wall, however, significant data were obtained regarding the integrity of the material. RNA extraction with TRI Reagent® is commonly used for this purpose, but in the present study, this method was the one that presented the most unsatisfactory results, with a yield below 30ng of total RNA per mL. In the agarose gel electrophoresis it was possible to visualize discrete bands of 5.8S rRNA in the last samples of method 1 and 2, in addition to observing that the material was intact, without formation of traces in the bands. It is concluded, therefore, that despite not having obtained significant results regarding the yield and purity of the samples, it was possible to obtain, through some adaptations, fast and economical protocols that extract intact material. In this way, enabling molecular biology practices to be offered in small laboratories such as teaching ones, providing this experience to the student still in graduation.

Keywords: *Candida albicans*. Guanidine thiocyanate. RNA. Silicon carbide.

1 INTRODUÇÃO

Fungos são seres eucariontes que possuem núcleo, mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático bem definidos. Ademais, possuem uma parede celular constituída principalmente de quitina e glucana e uma membrana plasmática composta por ergosterol, alvo de muitos antifúngicos. Podem ser encontrados de duas formas, leveduriforme, unicelulares, ou em forma de filamentos pluricelulares, os bolores (MURRAY, 2018).

Hodiernamente as espécies de *Candida* são as principais causadoras de micoses oportunistas, sendo a maior parte causada pela espécie *Candida albicans*. Trata-se de um fungo comensal que só representará problemas para pessoas imunodeprimidas, podendo causar infecções cutâneas, subcutâneas e sistêmicas. Além disso, em relação as outras espécies, apresenta uma maior capacidade de aderência e penetração, fato que facilita sua transformação de levedura a micélio (BERMÚDEZ, 2019).

Quanto ao RNA, ou ácido ribonucleico, tem-se que é uma molécula responsável pela síntese proteica das células do organismo e é encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma celular. Existem três principais tipos, RNA mensageiro, transportador e o ribossomal, e desempenham um importante papel na regulação e expressão gênica dos seres vivos. Vale salientar, que em relação a molécula de DNA, o RNA é mais instável, sendo mais difícil para manuseio (SCHAEFER; THOMPSON, 2015).

Com base na necessidade de se obter técnicas baratas, rápidas e eficientes para obtenção de material genético, vêm se buscando novos métodos. Um desses protocolos, que vem se mostrando eficaz, prático e de baixo custo, é o com carbeto de silício. Trata-se de um produto abrasivo que irá atuar na lise celular através de seu contato com a membrana, o qual acontece por meio de vigorosa agitação em vórtex (ROSA, 2008).

O carbeto de silício é um composto químico constituído por silício e carbono, é usado como abrasivo na fitopatologia, limpeza de metais e vem se mostrando eficaz na extração simultânea de DNA e RNA. A extração com o composto possui um bom rendimento, alta qualidade e é um método rápido e de baixo custo. A função do carbeto será basicamente atuar na lise celular, a qual ocorrerá pelo contato do composto com as células sob vigorosa agitação no vórtex (ROSA, 2008; SANTOS, 2022).

Ademais, destaca-se que apesar das técnicas já serem consolidadas há um tempo, ainda possuem desvantagens significativas. Hodiernamente, os protocolos mais utilizados para extração de RNA são as de coluna cromatográficas de sílica e a de o tiocianato de

glanidina/fenol-clorofórmio. Sendo que as de coluna cromatográficas são muito dispendiosas e a de tiocianato fenol-clorofórmio são corrosivas (YOSHINO; NISHIJIMA; KAWAKATSU,2020).

A eletroforese é uma técnica simples e bastante utilizada para separar fragmentos de material genético. Consiste em um método que utiliza a corrente elétrica para promover a separação de moléculas, como proteínas, fluidos e ácidos nucleicos. A migração dessas moléculas ocorre pela diferença de carga elétrica e pelo peso molecular. Ao final dessa separação, as bandas de cada amostra podem ser visualizadas através de radiação ultravioleta (SILVA NETO, 2019).

Tendo em vista a importância da extração de material genético para os estudos em biologia molecular, o aprimoramento de métodos que possibilitem uma extração de RNA com alto rendimento é relevante. O presente estudo objetivou o aprimoramento dos métodos de extração de RNA, obtendo um produto de alta pureza a partir de amostras de *Candida albicans*, utilizando tiocianato de guanidina e carboneto de silício como instrumento de rompimento mecânico da parede celular fúngica.

2 METODOLOGIA

2.1 CULTURA FÚNGICA

Para obtenção das amostras da espécie *Candida albicans*, foram utilizadas duas alçadas de uma cepa padrão identificada como NCP 3179 já semeada em ágar Sabouraud Dextrose obtida em colaboração com setor de microbiologia do Laboratório Vicente Lemos, situado no Crato-CE, foram inoculadas em 60 ml de meio Brain Heart Infusion (BHI) estéril preparado em frasco tratado com H₂O/DEPC 1:1000 (v/v). Logo após, o meio semeado foi incubado em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C e foram retiradas alíquotas do meio semeado para a preparação das amostras utilizadas (Tabela 1).

Assim, foram preparadas 12 amostras a partir de alíquotas de 3,0, 3,5 4,0 e 4,5mL, respectivamente, retiradas do meio BHI e transferidas para tubos do tipo Falcon de 15mL estéreis. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 5 min. Por conseguinte, o sobrenadante contendo o meio BHI foi descartado e as células foram ressuspensas em 10 mL de salina estéril. A seguir, 20uL de cada amostra ressuspensa em salina foi retirada para a contagem de células.

A contagem de células foi realizada no hemocitômetro central da Câmara de Neubauer através da contagem de 5 campos contendo 16 subcampos, em que os 5 campos escolhidos para a contagem obedeceram a uma linha imaginária traçada na diagonal. Após isso, o número de células encontradas foi multiplicado pelo volume comportado dentro do hemocitômetro central. E o número total de células em 1mL foi estimada através do cálculo com as células contidas em 10uL.

Por fim, as amostras suspensas em salina novamente centrifugadas a 3.500 rpm por 5 min, descartado o sobrenadante e armazenadas a – 20°C até uso posterior para as extrações.

Tabela 1: Volume inicial das amostras utilizadas nos métodos 1, 2 e 3.

<i>Amostras</i>	Cultura	Número de células
	Volume (mL)	10 ⁶ UFC/mL
<i>1</i>	3,0	0,66x10 ⁶
<i>2</i>	3,5	1,1x 10 ⁶
<i>3</i>	4,0	1,74x10 ⁶
<i>4</i>	4,5	2,02x10 ⁶

Fonte: elaborada pela autora.

2.2 TRATAMENTO DO CARBETO DE SILÍCIO

Na utilização dessa metodologia, o carbetto de silício (SiC) foi tratado de acordo com protocolo utilizado por Rosa (2008), em que 10 gramas de SiC foi acrescido de uma solução de 50mL de ácido clorídrico 10M, por um período de 2 horas a uma temperatura aproximadamente de 30°C, e, por conseguinte, o carbetto foi continuamente lavado por 12 horas em água DEPC 0,01% 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.

Todas as soluções foram preparadas com água tratada com Diethyl pyrocarbonate-DEPC, para inibição de RNAses, assim garantindo a integridade do material extraído. Além disso, todos os plásticos utilizados no processo de extração foram certificados de que eram livres de RNAses.

2.3 MÉTODOS UTILIZADOS PARA ROMPIMENTO DA PAREDE CELULAR FÚNGICA

2.3.1 MÉTODO 1: Tiocianato de Guanidina/ fenol-clorofórmio

Para aplicação dessa metodologia os testes foram fundamentados no protocolo de Chomczynski et al. (1987). Nele é abordado que após o crescimento em meio de cultura líquido, foi transferido 1mL da cultura para tubos de poliestireno de 1,5ml devidamente estéreis, livres de RNases. Após a coleta o material foi mantido no gelo quando em repouso, bem como os reagentes, soluções e a água foram previamente resfriados, exceto quando discriminado o contrário. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C (adaptação/rotor no gelo).

Nos tubos contendo as células precipitadas e sem o meio residual, foi adicionado 0,5mL de solução D (4 M tiocianato de guanidina, citrato de sódio 25mM, pH 7,0, 0,5% (p/v) CTAB e 2-mercaptoetanol 0,1M) por $0,66 \times 10^6$ células no tubo 1, $1,1 \times 10^6$ células no tubo 2, $1,74 \times 10^6$ células no tubo 3 e $2,02 \times 10^6$ células no tubo 4, como visto na tabela 1. Foi ressuspendido o lisado dez vezes com uma pipeta de 1mL, usado ponteira estéril e livre de RNases. Ao fazer isso, o DNA foi fragmentado, minimizando assim sua presença da fase aquosa. Em seguida foi adicionado a 0,5mL do lisado: 0,05mL de acetato de sódio 2 M, pH 4,0, misturando bem; adicionado 0,5mL de fenol saturado com água/DEPC em um pH em torno de 5,2. Foi misturado bem por inversão e adicionado 0,1mL de clorofórmio/álcool isoamílico (49:1), foi agitado vigorosamente em vórtex por 30 segundos. As amostras foram incubadas em gelo por 15 minutos e posteriormente centrifugadas por 20 minutos a 10.000g. Durante as centrifugações, o rotor da centrifuga foi previamente resfriado a -20°C.

Precipitação: o sobrenadante foi transferido com auxílio de uma pipeta cuidadosamente para um novo tubo estéril. Foi adicionado a fase aquosa 1mL de isopropanol para precipitar o RNA e as amostras foram incubadas por 1 hora a -20°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000g e é descartado o sobrenadante. O pellet de RNA foi dissolvido em 0,3 ml de solução D, adicionado 0,3mL de isopropanol, incubado por 30 minutos a -20°C, em seguida centrifugado por 10 minutos a 10.000g e foi descartado o sobrenadante.

Lavagem e solubilização do RNA: após a lavagem as amostras podem ser armazenadas por uma semana ou até por um ano (a -20°C). Foi adicionado ao pellet de RNA 0,5mL de etanol 75% em DEPC e vortexado por alguns segundos. Após isso as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente, para remover possíveis vestígios de guanidina. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000g, descartado o sobrenadante e deixado o pellet de RNA secar a temperatura ambiente por 30 minutos. O pellet de RNA é dissolvido em 50µL de água tratada com DEPC (inibidor de RNase fraco). Posteriormente as amostras foram quantificadas em gel de agarose 1% seguida de eletroforese a 100V por 20 minutos.

2.3.2 MÉTODO 2: Tiocianato de guanidina com Carbetto de silício

Nessa metodologia foram realizados todos os passos da metodologia 1, baseada no protocolo de Chomczynski et al. (1987), porém com a adição do carbeto de silício após a adição do acetato de sódio, o qual atuou na lise celular. O método utilizando o SiC foi baseado no protocolo utilizado por Rosa (2008). Nele o sedimento com as células fúngicas foi ressuspensionado em 1ml do tampão a ser utilizado na extração, foi adicionado o carbeto de silício já tratado, foram agitados no vórtex por 2 minutos e posteriormente a isso foi seguido o protocolo do método 1.

2.3.3 MÉTODO 3: Extração com TRI Reagente®

Foi adicionado 750µL de Trizol® no tubo contendo as células fúngicas e o pellet ressuspensionado e incubadas por 7 minutos. Logo após foi adicionado 700µL de clorofórmio, seguida de agitação manual vigorosa por 15 segundos, incubadas por mais 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000rpm por 14 minutos, transferindo após o sobrenadante para novos tubos livres de RNase e estéreis.

Feito esses passos, foi adicionado 750µL de álcool isopropílico, agitando as amostras gentilmente e as incubando por -20°C overnight. Prosseguindo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos, foi descartado o sobrenadante por inversão.

Posteriormente, foi adicionado 1mL de etanol 75% DEPC, em seguida ligeiramente agitadas em vórtex e posteriormente centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco a temperatura ambiente. Por fim, o pellet foi ressuspensionado em 50 µL de água/DEPC.

2.4 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%

A metodologia tida como base para realização da eletroforese em gel de agarose a 1%, foi a de Sambrook; Russel 2001. Para realização da técnica os acessórios que foram utilizados e a cuba foram tratados com água DEPC 1:1000 (v/v). Em seguida é preparado o gel de agarose a 1% de tamanho 20x20x0.5, para essa proporção foram utilizados 2 gramas de agarose. Logo após pesado, foi transferido para um Erlenmeyer de 300 mL e acrescentado 200 mL de TAE 1X/DEPC. Posteriormente a mistura foi aquecida em forno micro-ondas de 30 em 30 seg. e

homogeneizada até que o líquido se tornasse translúcido. Somente após esfriar, o gel foi adicionado à placa montada e acrescida dos acessórios.

Após a montagem do sistema de eletroforese foram misturados 8uL da amostra em 1uL do agente intercalante Blue Green Loading Buffer Dye de acordo com a recomendação do fabricante. O gel com as amostras empoçadas foi submetido a uma voltagem de 100 volts por 20 min. em tampão TAE 1X/DEPC. Por fim, o gel foi levado ao transluminador de luz UV 260 nm para avaliação da integridade do material extraído.

2.5 QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DO MATERIAL

O grau de pureza e a quantificação de RNA isolados foram avaliados por meio de um espectrofotômetro de microvolume da Agilent Bio Tek Synergy LX Multimode Reader modelo Cytation 7 através da placa Take 3, o qual foi realizado em colaboração com o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da URCA, situado no Crato-CE. Para essa finalidade foi utilizado 2 µL de cada amostra. Sendo a razão OD 280nm/260nm, o índice de pureza e rendimento obtidos pela leitura tabelados nos resultados (Tabela 2).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, é apresentada a tabela 2, a qual dispõe os dados obtidos na quantificação das amostras, o rendimento e o índice de pureza de cada amostra nos métodos 1, 2 e 3 a fim de comparação. Sendo o método 1 a extração com tiocianato de guanidina fenol-clorofórmio, o método 2 a tiocianato de guanidina fenol-clorofórmio associada ao carbeto de silício e o método 3 a com TRI Reagente®.

Tabela 2: Concentração e pureza de RNA purificado de *Candida albicans*.

Métodos	Amostra	N° células/mL (x 10 ⁶ UFC)	Rendimento (ng/µL)	Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₃₀)
			RNA	RNA
Método 1	1	0,66	25.6	2.2
	2	1,1	59.5	2.0
	3	1,74	103.2	1.6
	4	2,02	91.6	1.6

Método 2	1	0,66	59.0	2.0
	2	1,1	66.8	1.6
	3	1,74	81.2	1.7
	4	2,02	85.6	1.4
Método 3	1	0,66	20.6	2.2
	2	1,1	7.9	1.8
	3	1,74	8.3	2.6
	4	2,02	6.7	1.8

Fonte: Elaborada pela autora

Quanto a quantificação de células de microrganismos por amostra, nota-se que aumentaram de forma crescente em conjunto com o volume de amostra disponível em cada tubo. Sendo o menor volume os das amostras 1 de cada método, com 3mL e $0,66 \times 10^6$ células por mL, e o maior volume as amostras 4 de cada método, com 4,5mL e $2,02 \times 10^6$ células por mL.

Os métodos testados permitiram a extração de RNA fúngico de baixo rendimento, porém com uma boa pureza, como visto na tabela 2 e justificado pelo estudo de Petrucelli (2017), o qual considera como limites aceitáveis razões de RNA em amostras fúngicas de 1,8 a 2,0, sendo ainda considerado valores superiores como 2,1.

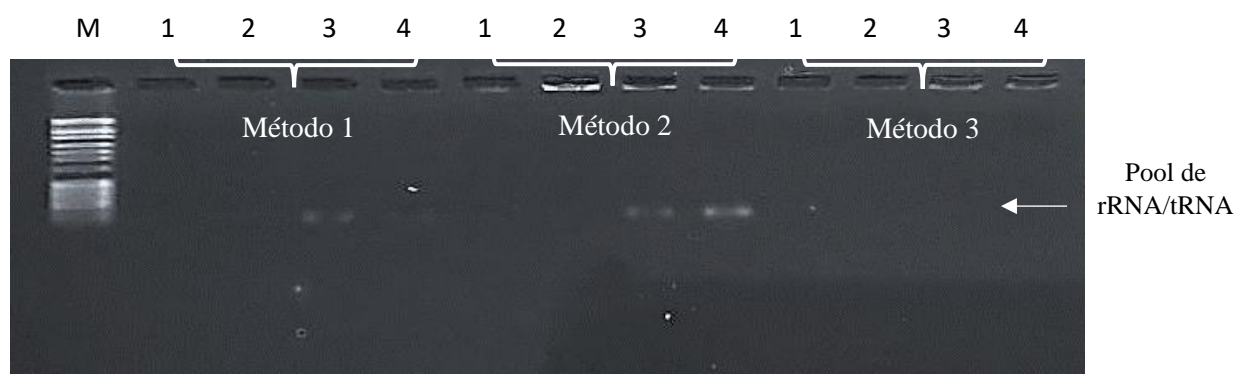
Ao observar a tabela é possível constatar que apesar de não ter sido alcançado resultados promissores, o método 2, tiocianato de guanidina/fenol-clorofórmio associado ao carbeto de silício, em comparação com os outros dois métodos, foi o único que apresentou rendimento exponencial, não verificando o mesmo padrão na pureza. O carbeto de silício é um composto abrasivo que tem mostrado bons resultados na extração simultânea de material genético como no estudo de Santos (2022). Contudo, vale salientar que no estudo da pesquisadora os microrganismos utilizados foram bactérias, deixando a hipótese da ineficiência na ruptura da parede celular fúngica do presente estudo.

Dentre os três métodos, o terceiro, utilizando o TRI Reagente®, foi o que apresentou um menor rendimento. Apesar de ser um reagente tradicionalmente utilizado para extração de RNA. Fato que também ocorreu no estudo de Gouveia (2011), o qual comparou três metodologias para extração de RNA em células do linfonodo humano, e no estudo de Sousa (2020), que testou três métodos para extração de RNA em artrópode.

Ainda seguindo a linha de raciocínio quanto ao rendimento, no estudo de Morgante (2015), considera-se 30ng de RNA total por mL como uma média aceitável de rendimento, podendo ser destacado no presente estudo a amostra 2 do método 1 e a amostra 1 do método 2, ambas com rendimento aceitável e boa pureza.

Em sua pesquisa sobre métodos para extração de RNA fúngico, Cortés (2020) discute sobre as dificuldades enfrentadas para se obter uma extração de RNA de qualidade e em boa quantidade. Salientando que se torna ainda mais dificultosa em se tratado de fungos, devido sua resistente parede celular e a fragilidade da molécula alvo.

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras de RNA obtidas por três métodos.



Canaletas M= DNA Ladder 1 kb Plus - exACTGene Fischer BioReagente; amostras 1, 2, 3, 4 método 1; amostras 1, 2, 3, 4 Método 2; amostras 1, 2, 3, 4 Método 3;

Fonte: imagem obtida através dessa pesquisa.

Na avaliação da integridade das amostras visualizadas por meio da eletroforese em gel de agarose é possível observar discretas bandas de RNAr 5.8s formado na amostra 3 e 4 do método 1 e 2, sendo as do método 2 um pouco mais fortes, figura 1. Ademais também é possível notar que foram obtidos materiais íntegros, sendo justificado pela ausência de rastros no gel. Essa etapa, segundo Brammer (2001), é de suma importância para os estudos moleculares sendo uma técnica versátil, simples, rápida e que contém muitas informações.

É de suma importância a obtenção de amostras íntegras e de boa qualidade para possíveis avanços na pesquisa. Fleige (2006), discute em seu estudo que o uso de RNA de boa qualidade é fundamental para aplicações bem-sucedidas de métodos moleculares modernos como qRT-PCR e análise de microarray. Ainda quanto a importância de materiais íntegros, segundo Vermeulen (2011), a qualidade do RNA que garante aos resultados confiabilidade.

4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados, conclui-se que com a pesquisa, foi possível, por meio de adaptações realizadas nos protocolos, obter métodos rápidos, econômicos e com uma boa integridade. Tornando dessa forma viável a realização de tais metodologias em laboratórios de pequeno porte, como os de instituições de ensino, proporcionando tal vivência aos alunos desde a formação acadêmica. Quando comparados os três métodos, o associado ao carbeto de silício foi o que apresentou melhor rendimento, podendo ser um método promissor em posteriores estudos. Torna-se evidente também que é necessário que haja modificações nos protocolos, principalmente quando se tratar de extração de RNA em células fúngicas, visto que a ruptura da parede celular ainda é um entrave para a obtenção de amostras de boa qualidade e quantidade. Para possíveis alterações de método seria interessante testar em uma maior quantidade de células e em um maior tempo de agitação em vórtex, para que haja uma ruptura efetiva da parede celular fúngica.

REFERÊNCIAS

- BRAMMER, S. P. **A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas**. 2001.
- BERMUDEZ, G.P. et al. **Mecanismos de resistência de Candida albicans, ferramentas para sua análise. Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, v. 38, n. 3, pág. 86-92, 2019.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Método de etapa única de isolamento de RNA por extração ácida de tiocianato de guanidínio-fenol-clorofórmio. **Bioquímica analítica**, v. 162, n. 1, pág. 156-159, 1987.
- CORTÉS-MALDONADO, L. et al. Um método para a extração de RNA fúngico de alta qualidade adequado para RNA-seq. **Jornal de métodos microbiológicos**, v. 170, p. 105855, 2020.
- FLEIGE, S.; PFAFFL, M.W. Integridade do RNA e o efeito no desempenho do qRT-PCR em tempo real. **Aspectos moleculares da medicina**, v. 27, n. 2-3, pág. 126-139, 2006.
- GOUVEIA, G.R. et al. Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, p. 649-654, 2011.

MORGANTE, C. V. et al. **Protocolo de extração de RNA total de Arachis spp. e avaliação do efeito de contaminantes por meio de análises espectrofotométricas.** 2015.

MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica Básica.** São Paulo: Grupo GEN, 2018.

ROSA, A.T. Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão e microanálise com raios-x de filmes dielétricos crescidos termicamente sobre carbeto de silício. 2008.

PETRUCELLI, M.F. **Avaliação do perfil transcricional de Trichophyton rubrum cocultivado com queratinócitos humanos HaCat utilizando RNA-Seq.** 2017.

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

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

SANTOS, T.O. Otimização de protocolos de extração de DNA e RNA bacteriano, 2022.
SCHAEFER, G.B.; THOMPSON, J. **Genética Médica.** Porto Alegre: Grupo A, p. 77-80, 2015.

SILVA NETO, G.F. **Avaliação do uso de imagens digitais para determinações quantitativas em eletroforese em gel.** 2019.

SOUSA, T.T.C. **Perfil de expressão gênica na glândula salivar e no intestino de Thaumastocoris peregrinus.** 2020.

VERMEULEN, J. et al. Impacto mensurável da qualidade do RNA na expressão gênica resulta de PCR quantitativo. **Pesquisa de ácidos nucleicos**, v. 39, n. 9, pág. e63-e63, 2011.

YOSHINO, K; NISHIJIMA, R; KAWAKATSU, T. **Low-cost RNA extraction method for highly scalable transcriptome studies.** **Breeding science**, p. 19170, 2020.