

Comparação de métodos de isolamento do DNA em *Handroanthus Serratifolius*

Comparison of insulation methods of the DNA in *Handroanthus Serratifolius*

DOI:10.34117/bjdv7n4-168

Recebimento dos originais: 07/03/2021

Aceitação para publicação: 07/04/2021

Júlio César Furtado Filho

Biólogo

Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

e-mail: juliocesarfurtadofilho@gmail.com

Jailson do Nascimento Silva

Biólogo

Instituto Federal do Piauí, Valença, PI, Brasil

e-mail: jaysilva.bio@gmail.com

João Paulo Gomes Viana

Doutor em Genética e Biologia Molecular

Postdoctoral Research Associate, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA

e-mail: joaopaulogomesviana@gmail.com

Marcones Ferreira Costa

Mestre em Genética e Melhoramento

Universidade Federal do Piauí, Floriano, PI, Brasil

e-mail: marconescosta@ufpi.edu.br

Camila Campêlo de Sousa

Doutora em Ciências (Genética e Melhoramento de Plantas)

Universidade Federal do Maranhão, Codó, MA, Brasil

e-mail: camila.campelo@ufma.br

Maria Fernanda da Costa Gomes

Mestre em Genética e Melhoramento

Universidade Estadual do Piauí, São Raimundo Nonato, Piauí, PI, Brasil

e-mail: fernanda_mf2@hotmail.com

Ângela Celis de Almeida Lopes

Doutora em em Genética e Melhoramento de Plantas

Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

e-mail: acalopes@ufpi.edu.br

Sérgio Emílio dos Santos Valente

Doutor em Ciências Biológicas

Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

e-mail: svalente@ufpi.edu.br

RESUMO

O ipê-amarelo (*Handroanthus serratifolius*) é uma espécie com grande potencial econômico devido ao uso da sua madeira e de diversos compostos com propriedades medicinais. Devido a sua importância econômica faz-se necessário o desenvolvimento de estudos moleculares que visam a caracterização genética dessa espécie. Uma vez que os estudos moleculares requerem um DNA puro e íntegro, o objetivo desse trabalho foi avaliar cinco métodos de extração de DNA genômico total em *H. serratifolius*: Dellaporta et al. (1983), Doyle e Doyle (1987), Clarke et al. (1989), Ferreira e Grattapaglia (1995) e Romano e Brasileiro (1998), com o objetivo de modificá-los e identificar o protocolo mais eficiente. O DNA foi extraído do tecido foliar e do caule de árvores de *H. serratifolius* e foi realizada na presença e na ausência de nitrogênio líquido. Com base nos resultados, foi possível identificar que o protocolo mais eficiente para a extração de DNA em *H. serratifolius* foi o descrito por Clarke et al. (1989), utilizando-se nitrogênio líquido na maceração. O DNA foliar apresentou uma concentração de 889,4ng/μl, com relação $A^{260/280}$ de 2,03 e relação $A^{260/230}$ de 0,64. Nos protocolos descritos por Dellaporta et al. (1983), Ferreira e Grattapaglia (1995) e Romano e Brasileiro (1998) obteve-se, respectivamente, os seguintes valores médios de concentração de DNA: 446,3ng/μl, 773,9ng/μl e 529,2ng/μl. A relação $A^{260/280}$ foi de 1,87, 1,70 e 2,09; já para a relação $A^{260/230}$ os valores obtidos foram 0,73, 1,20 e 0,68, respectivamente. O método descrito por Doyle e Doyle (1987) não apresentou ácido nucleico nas amostras analisadas. Nas extrações em que não utilizou-se nitrogênio líquido, o protocolo mais eficiente também foi o descrito por Clarke et al. (1989), gerando um DNA com concentração de 1371ng/μl, a relação $A^{260/280}$ foi de 1,75 e a relação $A^{260/230}$ foi de 0,95. Entretanto, os outros quatro protocolos também apresentaram resultados satisfatórios em relação à pureza do DNA. Para a extração de DNA a partir do caule, o protocolo mais eficiente, quantitativamente, para a extração de DNA de *H. serratifolius* foi o descrito por Dellaporta et al. (1983), na ausência de nitrogênio líquido durante a maceração. Sugere-se também o protocolo de Clarke et al. (1989) por ter sido o mais eficiente qualitativamente, na extração de DNA a partir do caule, sem a utilização de nitrogênio líquido.

Palavras-Chave: CTAB, ipê-amarelo, extração, isolamento de DNA; SDS.

ABSTRACT

The yellow ipe (*Handroanthus serratifolius*) is a species with great economic potential due to the use of its wood and various compounds with medicinal properties. Due to its economic importance, it is necessary to develop molecular studies aimed at the genetic characterization of this species. Since molecular studies require pure and intact DNA, the objective of this work was to evaluate five methods of extracting total genomic DNA in *H. serratifolius*: Dellaporta et al. (1983), Doyle and Doyle (1987), Clarke et al. (1989), Ferreira and Grattapaglia (1995) and Romano e Brasileiro (1998), in order to modify them and identify the most efficient protocol. The DNA was extracted from the leaf tissue and from the stem of *H. serratifolius* trees and was carried out in the presence and absence of liquid nitrogen. Based on the results, it was possible to identify that the most efficient protocol for the extraction of DNA in *H. serratifolius* was the one described by Clarke et al. (1989), using liquid nitrogen for maceration. The leaf DNA showed a concentration of 889.4ng / μl, with an $A^{260} / 280$ ratio of 2.03 and an $A^{260} / 230$ ratio of 0.64. In the protocols described by Dellaporta et al. (1983), Ferreira and Grattapaglia (1995) and Romano and Brasileiro (1998) obtained the following average DNA concentration values, respectively: 446.3ng / μl, 773.9ng / μl and 529.2ng / μl. The $A^{260} / 280$ ratio was 1.87, 1.70 and 2.09; for the $A^{260} / 230$ ratio, the values obtained were 0.73, 1.20 and 0.68,

respectively. The method described by Doyle and Doyle (1987) did not present nucleic acid in the analyzed samples. In extractions in which liquid nitrogen was not used, the most efficient protocol was also the one described by Clarke et al. (1989), generating DNA with a concentration of 1371ng / μ l, the A260 / 280 ratio was 1.75 and the A260 / 230 ratio was 0.95. However, the other four protocols also showed satisfactory results regarding DNA purity. For the extraction of DNA from the stem, the most efficient protocol, quantitatively, for the extraction of DNA from *H. serratifolius* was the one described by Dellaporta et al. (1983), in the absence of liquid nitrogen during maceration. The protocol by Clarke et al. (1989) for having been the most qualitatively efficient, in the extraction of DNA from the stem, without the use of liquid nitrogen.

Keywords: CTAB, yellow ipe, extraction, DNA isolation; SDS.

1 INTRODUÇÃO

Handroanthus serratifolius (Vahl) S. O. Grose conhecida popularmente como ipê-amarelo destaca-se pelo grande potencial madeireiro, ornamental e medicinal. O principal produto dessa espécie é a madeira que é amplamente utilizada na construção civil, sendo também utilizada em paisagismo e arborização urbana por causa de suas atrativas flores amarelas (SANTOS et al., 2020). Além disso, é uma árvore utilizada na produção de medicamentos, onde identificou-se substâncias dotadas de forte atividade bactericida (PARK et al., 2005), fungicida (PORTILLO et al., 2001), antifúngica (NÚÑEZ et al., 2004), anti-tumoral (CHENNA et al., 2001) e anti-inflamatória (WANICK, BANDEIRA e FERNANDES, 1970). *H. serratifolius* também é utilizada na produção de tinturas e néctar (FERREIRA, CHALUB e MUXFELDT, 2004).

Em decorrência da importância econômica do ipê-amarelo faz-se necessário a aplicação de estudos moleculares que permitam compreender melhor as características genéticas e fisiológicas dessa espécie. A caracterização molecular é extremamente importante tanto para estabelecer estratégias de manejo e conservação como aos programas de melhoramento genético (LOZIER; ZAYED, 2017; JANNI et al., 2020).

Uma etapa crucial em estudos moleculares é o isolamento e purificação do DNA. A obtenção de um DNA íntegro e puro em plantas muitas vezes é um desafio, principalmente por apresentarem altos níveis de polissacarídeos, polifenóis e metabólitos secundários que atrapalham o processo (ABOUL-MAATY; ORABY, 2019).

Inúmeros são os protocolos de extração de DNA genômico disponíveis, devido à grande variabilidade na composição bioquímica existente nas diferentes espécies vegetais (ROMANO e BRASILEIRO, 1998). Em linhas gerais, o objetivo de qualquer protocolo de extração consiste na obtenção de um DNA de alta qualidade e com boa concentração,

de forma rápida, pouco onerosa e eficiente. Dessa forma, estudos básicos sobre métodos de extração de DNA de alta qualidade são cruciais para o desenvolvimento de técnicas moleculares (ALMEIDA et al., 2017; LIMA et al., 2020; SOUSA et al., 2014; VIANA et al., 2015). Esses estudos podem resultar em novas metodologias visando aperfeiçoar a extração do DNA de uma determinada espécie (WALDSCHMIDT, 1997).

O objetivo desse estudo foi avaliar cinco diferentes protocolos de extração de DNA em amostras de tecido foliar de *H. serratifolius*, maceradas na presença e na ausência de nitrogênio líquido, e amostras do caule, na ausência de de nitrogênio líquido, visando identificar o protocolo mais eficiente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A identificação da espécie depende da disponibilidade, principalmente, dos órgãos reprodutivos. No entanto, a presença destes órgãos é passageira na árvore, dificultando a sua identificação, como é o caso do ipê-amarelo que floresce nos meses correspondentes ao término do Inverno e início da Primavera no Hemisfério Sul. Sendo assim, realizou-se a identificação dessa espécie por meio de um estudo comparativo de outras características morfológicas (caule, folhas, etc) disponíveis na época da coleta do material para identificação.

Coletou-se aproximadamente dez folhas jovens e raspas do caule de um exemplar de *H. serratifolius* localizado no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI. O uso de folhas jovens é recomendado pois esse tecido apresenta menos substâncias fenólicas que prejudicam a obtenção de um DNA puro (AZÊVEDO et al., 2019). Optou-se também pela utilização de raspas do caule pois indivíduos adultos de *H. serratifolius* podem atingir mais de 20 m de altura, o que pode dificultar a coleta das folhas na natureza. A coleta do material foliar foi realizada com o auxílio de um podão e as raspas do caule foram coletadas por meio de um cutelo. Transportou-se o material coletado até o laboratório em caixas de isopor contendo gelo.

Foram avaliados cinco protocolos de extração de DNA genômico total: Clarke et al. (1989), Dellaporta et al. (1983), Doyle e Doyle (1987), Ferreira e Grattapaglia (1995) e Romano e Brasileiro (1998). As extrações foram realizadas a partir da maceração de folhas, tanto na presença quanto na ausência de nitrogênio líquido. Já a maceração a partir do caule ocorreu apenas sem o uso de nitrogênio líquido. As quantidades e concentrações do tampão de extração para cada protocolo foram ajustadas proporcionalmente para a quantidade de 40 mg de folhas jovens e de raspas do caule macerados (os protocolos

originais utilizam 150 mg de tecido). Transferiu-se o macerado para tubos *ependorfs* de 1,5 mL e para cada um dos cinco protocolos de extração de DNA (descritos abaixo) utilizou-se três amostras de cada um dos três tipos de maceração utilizada.

Protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983) modificado: após a maceração, para cada 40 mg de tecido, o material foi transferido para três tubos *ependorfs* contendo 80 μ L de tampão de extração (0,5 M NaCl; 0,05 M ácido etilenodiamino tetra-acético, EDTA; 0,1 M Tris-HCl; pH 8,0; β -mercaptoetanol a 0,2 %). Adicionou-se 8 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20 %, agitando-se vagarosamente por cerca de 5 minutos. Incubou-se os tubos a 65°C por 30 minutos, agitando-os a cada 10 minutos. Adicionou-se 33 μ L de acetato de potássio e 0,6 volumes de isopropanol gelado, em seguida fez-se a inversão dos tubos. As amostras foram incubadas a -20°C por pelo menos 1h. Em seguida centrifugou-se as amostras a 2500 rpm por cerca de 12 minutos e transferiu-se o sobrenadante para outros novos três tubos. Adicionou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e mais 0,7 volume de isopropanol gelado, misturou-se o conteúdo dos tubos com inversões. Incubou-se os tubos por mais 1 hora a -20°C. As amostras foram então, centrifugadas por 12 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 30 μ L de etanol gelado a 70% e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se 20 μ L de TE (1 mM EDTA, 10 mM TrisHCl, pH 8,0).

Protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987) modificado: após a maceração, para cada 40 mg de tecido, adicionou-se 175 μ L de tampão de extração (brometo de cetiltrimetilamônio, CTAB, a 2%; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl; β -mercaptoetanol a 0,2%), previamente aquecido a 65°C. Misturou-se os tubos invertendo-os por 50 vezes e em seguida colocou-se em banho-maria, a 65°C, por 30 minutos, misturando frequentemente para homogeneizar a solução. Após esse processo, adicionou-se 175 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico, preparados numa proporção de 24:1, invertendo-se os tubos até formar uma emulsão. Os tubos foram centrifugados, por 10 minutos, a 6500 rpm. Coletou-se a fase aquosa superior e transferiu-a para novos tubos. Em seguida, foi adicionado 175 μ L de isopropanol gelado, invertendo-se o tubo cuidadosamente por cerca de 50 vezes. Deixou-se secar a -20°C por aproximadamente 4 horas. O precipitado foi então lavado com 100 μ L de etanol a 70% e descartou-se o álcool. Ressuspendeu-se o DNA em 30 μ L de tampão TE e armazenou-se a -20°C.

Protocolo descrito por Clarke et al. (1989) modificado: após a maceração adicionou-se 266 μ L de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 150 mM, CTAB a 2%, Polivinilpirrolidona, PVP, a 2%, NaCl 2100 mM; β -mercaptoetanol 140

mM) para cada 40 mg de tecido. Depois do macerado ser misturado com o tampão, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 40 minutos e agitados a cada 10 minutos. Feita a incubação, após o resfriamento das amostras, realizou-se a desproteinização com a adição de 266 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram submetidas a suaves inversões durante 5 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante foi transferido para outros tubos, onde foi adicionado, em cada tubo, 20 µL de NaCl e 266 µL de etanol absoluto a -20°C para que ocorresse a precipitação do DNA. Homogeneizou-se a amostra em suaves inversões por cerca de 20 minutos e centrifugando-os a 6000 rpm por 5 minutos. O etanol foi descartado e o precipitado foi colocado a temperatura ambiente para a evaporação do etanol residual. O DNA foi ressuscitado em 30 µL de TE e estocado a -20°C.

Protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1995) modificado: após a maceração adicionou-se 186,66 µL do tampão de extração (CTAB a 2%; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl; β-mercaptoetanol a 0,2%; PVP a 1%) para cada 40 mg de tecido. Colocou-se os tubos em banho-maria a uma temperatura de 65°C por 30 minutos, onde nesse intervalo de tempo, fez-se inversão dos tubos a cada 10 minutos. Posteriormente, deixou-se esfriar a temperatura ambiente e adicionou-se 160 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1); em seguida os tubos foram agitados 20 vezes através do processo de inversão. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos e pipetou-se a fase superior dos tubos para novos tubos. A essa fase superior aquosa contida nos novos tubos foi adicionada 1/10 do volume com uma solução de 10 % de CTAB, 1,4 M NaCl. Misturou-se até formar uma solução homogênea. Repetiu-se a operação de 160 µL de clorofórmio:álcool isoamílico, retirou-se o sobrenadante para outro tubo. Adicionou-se 2/3 do volume da solução de isopropanol gelado e armazenouse a -20°C por 30 minutos. Centrifugou-se os tubos em uma microcentrífuga durante 3 minutos lavando o *pellet* duas vezes, em 248 µL de etanol 70 %. Deixou-se o *pellet* imerso por 10 minutos e logo após o etanol foi retirado e o *pellet* lavado em 270 µL de etanol absoluto por 3 minutos. Usando-se uma micropipeta retirou-se o etanol e deixou-se a amostra secar durante 2 horas. Ressuscitou-se o *pellet* em 10 µL de TE, e armazenou-se os *eppendorfs* a -20°C.

Protocolo descrito por Romano e Brasileiro (1998) modificado: transferiu-se 40 mg do material e para cada eppendorf colocou-se 200 µL de tampão de extração (cujas concentrações finais continham CTAB a 2%, 1,4 mM NaCl, 100 mM Tris HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA, β-mercaptoetanol a 0,2 %) pré-aquecido, em banho-maria a 65°C. Os tubos

foram fechados e a solução foi misturada vagarosamente até ficar distribuída de forma homogênea. As amostras foram incubadas em banho-maria a 60°C, por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 5 minutos para manter o extrato ressuspensionado. Retirou-se os tubos do banho-maria e esperou até que eles atingissem a temperatura ambiente, em seguida foi adicionado 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), invertendo-se os tubos cuidadosamente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, por 10 minutos, a temperatura ambiente, para separar a fase orgânica da aquosa. Removeu-se a fase aquosa superior para novos tubos *ependorfs* de 1,5 mL e repetiu-se a extração com clorofórmio:álcool isoamílico mais duas vezes. Adicionou-se 0,6 volumes de isopropanol a -20°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado e lavou-se com 0,6 µL de etanol a 70%. Retirou-se o excesso de umidade à temperatura ambiente e dissolveu-se o precipitado em 30 µL de TE para cada uma das amostras, incubando-se os tubos a 4°C por meia hora e armazenando-os a -20°C.

A concentração e a pureza do DNA extraído foram quantificadas em um espectrofotômetro (*NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer*).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aspecto do *pellet* formado no final do processo de extração de DNA é o primeiro indicativo para se avaliar a presença de impurezas nas amostras (ROMANO e BRASILEIRO, 1998). Os protocolos descritos por Dellaporta et al. (1983) e Ferreira e Grattapaglia (1995), na extração de DNA a partir do tecido foliar, macerado na presença e na ausência de nitrogênio líquido, geraram um precipitado final límpido e esbranquiçado, sugerindo que o DNA extraído não estava contaminado por compostos secundários.

No protocolos de Clarke et al. (1989) e Romano e Brasileiro (1998), houve a formação de um precipitado de coloração esverdeada, provavelmente devido às poucas lavagens com clorofórmio e álcool isoamílico. De acordo com Khanuja et al. (1999), ao se extrair o DNA de plantas com altos níveis de compostos secundários e óleos essenciais, além de modificações nos tampões de extração, é necessário que sejam realizadas várias lavagens com clorofórmio e álcool isoamílico para que se obtenha um DNA livre de contaminação. O protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987) não apresentou *pellet* visível, indicando ausência de DNA.

Após a adição de TE, as amostras resultantes da extração de folhas por meio dos protocolos de Doyle e Doyle (1987) com a utilização de nitrogênio líquido no processo

de maceração e Romano e Brasileiro (1998) sem a utilização de nitrogênio líquido, apresentaram alta viscosidade; que, segundo Ferreira e Grattapaglia (1995), sugerem a presença de polissacarídeos. Como solução, Romano e Brasileiro (1998) sugerem a precipitação com acetato de Sódio 3M ou cloreto de cério.

Já na extração a partir do caule, somente o *pellet* obtido por meio do protocolo de Clarke et al. (1989) ficou visualmente límpido. Nos demais protocolos, o *pellet* apresentou-se esverdeado, o que pode indicar a presença de um DNA não puro.

Os resultados obtidos por espectrofotometria, com relação à concentração de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e as relações $A^{260/280}$ e $A^{260/230}$, do DNA extraído das folhas jovens maceradas na presença e ausência de nitrogênio líquido de *H. serratifolius*, foram analisados e comparados (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração e pureza das amostras de DNA genômico total em *H. serratifolius* obtidas a partir de 40 mg de tecido foliar fresco, por meio de cinco diferentes protocolos de extração, macerado sem e com o uso de nitrogênio líquido (NL).

Protocolo	Concentração de ácidos nucleicos (ng/μl)		Relação $A^{260/280}$		Relação $A^{260/230}$	
	Sem NL	Com NL	Sem NL	Com NL	Sem NL	Com NL
Dellaporta et al. (1983)	446,3a	707,1a	1,87	1,90	0,73	1,33
Doyle e Doyle (1987)	0,0	740,7a	0,00	1,85	0,00	1,55
Clarke et al. (1989)	889,4a	1371a	2,03	1,75	0,94	0,95
Ferreira e Grattapaglia (1995)	773,9a	1475a	1,70	1,63	1,20	1,24
Romano e Brasileiro (1998)	529,2a	279,3a	2,09	1,85	0,68	0,92

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 1%.

Na espectrofotometria, onde as amostras são submetidas à luz ultra-violeta (espectros de 210 a 280nm), uma absorbância de 260nm igual a 1, representa cerca de 50μg/mL de ácidos nucleicos. As proteínas tem uma absorbância medida à 280nm. O fenol ou clorofórmio é absorvido à 270-272nm. Resíduos de peptídeos, aminoácidos e reagentes do tampão de extração tem absorbância em 210nm, o que causa uma variação à 230nm, aumentando seu valor de absorbância (HOLT, 1990).

A razão entre A^{260nm} e A^{280nm} fornece a principal estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. Soluções puras de DNA possuem valores de $A^{260/280}$ entre 1,8 e 2,2 respectivamente. Se existe contaminação por proteínas, essa relação será muito menor e a precisão nas quantidades de ácidos nucleicos será baixa. Se a relação for maior que a estimada sugere-se a contaminação com fenol (NANODROP TECHNOLOGIES, 2007).

A razão calculada entre $A^{260/230}$ provê uma estimativa secundária na determinação das purezas as amostras, ou seja, se a relação $A^{260/280}$ não está dentro dos

valores limites, $A^{260/230}$ pode ser relevante. A razão deve situar-se entre 2 e 2,2 para que o DNA esteja puro. Um valor superior a 2,2 indica possível contaminação do DNA por peptídeos, aminoácidos, ou componentes de lise presentes no tampão de extração (NANODROP TECHNOLOGIES, 2007).

Em relação à extração do DNA de folhas jovens maceradas na ausência de nitrogênio líquido de *H. serratifolius*, o método de Dellaporta et al. (1983) apresentou média de concentração de ácidos nucleicos (DNA e RNA) igual a 446,3 ng/μl e a relação $A^{260/280}$ foi de 1,87, indicando a ausência de impurezas nas amostras. Já a Relação $A^{260/230}$ foi de 0,73, valor abaixo do intervalo esperado, que vai de 2 a 2,2, sugerindo a contaminação por RNA. Isso é explicável tendo em vista que em nenhum dos protocolos houve a adição de RNase, com o intuito de tornar o processo menos oneroso. Obteve-se uma baixa concentração de ácidos nucleicos (446,3 ng/μl) em relação aos demais protocolos, porém ainda assim uma quantidade passível de ser utilizada em procedimentos moleculares posteriores. Essa diferença pode ter ocorrido porque esse método é o único que utiliza o SDS como detergente e de acordo com Souza, Peres e Moraes (2010), o CTAB apresenta melhor potencial de solubilização em comparação com o SDS.

Não houve detecção de ácidos nucleicos nas amostras obtidas por meio do protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), sugerindo não ser um protocolo eficiente para a extração do DNA em *H. serratifolius*. Além disso, na precipitação do DNA, logo depois da adição do isopropanol gelado, o DNA pode ser visto como um emaranhado de fios; entretanto, isso não foi observado na extração por meio do protocolo de Doyle e Doyle (1987). Esses dados sugerem que provavelmente o DNA foi perdido durante as lavagens com álcool.

A partir do método de Clarke et al. (1989) obteve-se a maior média da concentração de ácidos nucleicos (889,4 ng/μl), configurando-o como o melhor protocolo no quesito quantitativo sem a utilização de nitrogênio líquido. Esse método é o que utiliza a maior quantidade do detergente CTAB o que pode explicar a alta concentração obtida, uma vez que esse detergente tem a finalidade de solubilizar polissacarídeos e ácidos nucléicos (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). A média da razão $A^{260/280}$ foi de 2,03; valor dentro dos valores aceitáveis para se qualificar o DNA como sendo puro. Contudo, a pureza das amostras foi comprometida pela razão $A^{260/230}$ que apresentou média abaixo do aceitável (0,64), possivelmente indicando contaminação por RNA.

Já o método proposto por Ferreira e Grattapaglia (1995) forneceu amostras com concentração média de ácidos nucleicos de 773,9 ng/μl. A relação $A^{260/280}$ (1,70) sugere que o DNA estava puro; além disso, o aspecto das amostras no final da extração era límpido. Entretanto, a relação $A^{260/230}$ se aproximou dos valores limites (1,20), o que pode indicar contaminação no DNA.

No método relatado por Romano e Brasileiro (1998), a razão $A^{260/280}$ (2,09) sugere um DNA puro; entretanto, a razão $A^{260/230}$ (0,68) indica a presença de contaminantes no DNA, pois o valor obtido ficou muito abaixo do intervalo considerado ótimo, de 2 a 2,2. Porém, a concentração de ácidos nucleicos, apesar de baixa em relação aos outros protocolos (529,29 ng/μl), é aceitável para futuros experimentos envolvendo marcadores moleculares.

Tanto o protocolo de Dellaporta et al. (1983) quanto o de Doyle e Doyle (1987) demonstraram médias de concentração de DNA e RNA adequadas. As médias das amostras para a razão $A^{260/280}$ estão dentro do proposto pela literatura e as médias para $A^{260/230}$ apresentaram valores abaixo do intervalo de 2 e 2,2, justificável pela não adição de RNases, todavia são as que mais se aproximaram desse intervalo.

Já para as amostras de DNA extraído de folhas jovens de *H. serratifolius*, maceradas com o uso de nitrogênio líquido, a técnica descrita por Clarke et al. (1989) foi a mais eficiente, fornecendo um DNA puro e em grande quantidade. A média de concentração de ácidos nucleicos foi de 1371 ng/μl. A relação $A^{260/280}$ sugere um DNA puro (1,75) e a relação $A^{260/230}$ (média de 0,95) indica contaminação por polifenóis.

Com o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1995), obteve-se uma alta concentração de ácidos nucleicos (1475 ng/μl). Porém, a razão $A^{260/280}$ foi de 1,63, menor que o valor limite estabelecido para essa relação (1,70). Esse valor indica uma possível contaminação por proteínas, o que pode ser solucionado com mais etapas de lavagem com clorofórmio e álcool isoamílico. Já para a razão $A^{260/230}$ (1,24), as médias ficaram distantes do intervalo ideal (entre 2 e 2,2), indicando contaminação por RNA.

Uma baixa concentração de ácidos nucleicos (279,3 ng/μl) foi observada nas amostras obtidas por meio do protocolo de Romano e Brasileiro (1998), com a utilização de folhas jovens de *H. serratifolius*, maceradas com o uso de nitrogênio líquido. Porém, analisando-se a razão $A^{260/280}$ (média de 1,85), sugere-se que o DNA estava puro. A razão $A^{260/230}$, por ser uma segunda alternativa de pureza, pode ser desconsiderada, uma vez que a razão $A^{260/280}$ indicou um DNA puro e, além disso, o DNA obtido apresentou-se límpido.

Na extração de DNA genômico total em *H. serratifolius*, obtidas a partir de 40mg do caule sem uso de nitrogênio líquido, os protocolos descritos por Dellaporta et al. (1983), Ferreira e Grattapaglia (1995) e Romano e Brasileiro (1998) foram os que apresentaram as melhores médias de concentração de DNA e de RNA nas três amostras quantificadas. O método de Dellaporta et al. (1983) apresentou a maior concentração de ácidos nucleicos (2767,2 ng/μl). Já os protocolos relatados por Doyle e Doyle (1987) e Clarke et al. (1989) resultaram em menores concentrações de DNA, porém ainda adequadas para estudos moleculares (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração e pureza das amostras de DNA genômico total em *H. serratifolius* obtidas a partir de 40mg do caule sem uso de nitrogênio líquido, por meio de cinco diferentes protocolos de extração.

Protocolo	Concentração de ácidos nucleicos (ng/μl)	Relação A ^{260/280}	Relação A ^{260/230}
Dellaporta et al. (1983)	2767,2a	1,65	0,71
Doyle e Doyle (1987)	553,1b	1,53	0,56
Clarke et al. (1989)	689b	1,72	0,90
Ferreira e Grattapaglia (1995)	1001,5b	1,65	0,66
Romano e Brasileiro (1998)	1777,3ab	1,63	0,58

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 1%.

O protocolo de Clarke et al. (1989) apresentou o melhor valor para a relação A^{260/280} (1,72), sendo um indicativo de um DNA livre de contaminantes. Todos os demais protocolos apresentaram valores um pouco abaixo de 1,7, indicando uma maior contaminação por proteínas e compostos secundários.

Segundo Holt (1990), a razão A^{260/230} deve apresentar valores entre 2 e 2,2. O protocolo que mais se aproximou deste intervalo foi o de Clarke et al. (1989), com valor de 0,90. RNAs devem ser inibidos pela adição de enzimas RNases, todavia não houve acréscimo dessas enzimas nas amostras com o objetivo de se tornar o processo menos oneroso. O valor de A^{260/230} é uma alternativa relevante para verificação da pureza do DNA quando a relação A^{260/280} não se encontra dentro dos limites de pureza.

Para a extração de DNA de tecido foliar utilizando-se nitrogênio líquido no processo de maceração, sugere-se a utilização do protocolo descrito por Clarke et al. (1989) por ter apresentado a maior concentração de ácidos nucleicos (DNA e RNA) com nível de pureza adequado. Como alternativa, pode-se optar pela técnica de Ferreira e

Grattapaglia (1995) que revelou ótima pureza apesar da concentração ter sido menor que a obtida por meio da técnica de Clarke et al. (1989).

A extração realizada a partir do tecido do caule, comparada com a extração de folhas jovens, forneceu maiores concentrações de DNA e RNA, porém com um maior nível de contaminação. O protocolo desenvolvido por Dellaporta et al. (1983) foi o que resultou em uma maior concentração de ácidos nucleicos sendo que o protocolo de Clarke et al. (1989) foi o mais eficiente em relação à pureza do DNA. Verificou-se contaminação por RNA em todas as amostras analisadas, uma vez que não se utilizou RNase. Ciampi, Azevedo e Silva (2003), trabalhando com extração do DNA coletado do caule de ipê-roxo) conseguiram obter um DNA com pouca degradação e com baixa quantidade de compostos secundários, ou seja, de boa qualidade e com adequada concentração.

4 CONCLUSÕES

Com exceção do método de Doyle e Doyle (1987) sem a utilização de nitrogênio líquido na maceração, os demais protocolos testados foram eficientes na obtenção de DNA com concentração e pureza satisfatórias quando avaliados por espectrofotômetro para a aplicação em diversos experimentos em Biologia Molecular. A extração de DNA é eficiente mesmo sem o uso do nitrogênio líquido na maceração de folhas jovens de *H. serratifolius*, o que tornaria a técnica de extração menos onerosa. Apesar dos resultados satisfatórios na extração do DNA do caule e deste método poder tornar a coleta mais rápida e fácil, a extração do DNA a partir de tecido foliar jovem se mostrou mais eficiente na obtenção de um DNA com maior grau de pureza e em maior quantidade. Com base nos resultados, foi possível identificar que o protocolo mais eficiente para a extração de DNA em *H. serratifolius* foi o descrito por Clarke et al. (1989), utilizando-se folhas jovens e nitrogênio líquido na maceração.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Piauí - FAPEPI (Teresina, PI - Brasil) pelo apoio.

REFERÊNCIAS

ABOUL-MAATY, N. A. F.; ORABY, H. A. S. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, v. 43, n. 1, p. 1-10, 2019.

ALMEIDA, V. M.; LUZ, G. A.; MARTINS, P. P.; GOMES, M. F. C.; COSTA, M. F.; LIMA, P. S. C.; VALENTE, S. E. S. Comparison of eight methods to isolate genomic DNA from *Hancornia speciosa*. *Genetics and Molecular Research*. 2017, 16(3), 1-7. <https://doi.org/10.4238/gmr16039724>.

AZÊVEDO, H. S. F.; RUFINO, P. B.; AZEVEDO, J. M. A.; SILVA, L. M.; WADT, L. H. CAMPOS, T. Preservation and maceration of amazon açai leaflet tissue to obtain genomic DNA. *Bioscience Journal*. 2019, 35(4), 1188-1197. <https://doi.org/10.14393/BJ-v35n4a2019-42190>.

CHENNA, P. H.; BENEDETTI-DOCTOROVICH, V.; BAGGIO, R. F.; GARLAND, M. T.; BURTON, G. Preparation and Cytotoxicity toward Cancer Cells of Mono (arylimino) Derivatives of α -Lapachone. *Journal Medical Chemistry*, v. 44, p. 2486-2489, 2001.

CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; SILVA, V. P. Análise genética populacional de *Tabebuia impetigiosa* utilizando marcadores moleculares RAPD. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*. Brasília, DF, v.1, n.1, dez. 2003.

CLARKE, B. C.; MORAN, L. B.; APPELS, R. DNA analyses in wheat breeding. *Genome*. v. 32, p. 334-339, 1989.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Report*. 1983, 1(4), 19-20. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>. ISSN 0735-9640.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987, 19(1), 11-15. ISSN 0898-3437.

FERREIRA, L.; CHALUB, D.; MUXFELDT, R. Ipê-amarelo: *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols. *Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia*, Manaus, v. 5, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. 1a ed. Brasília: EMBRAPA-CERNARGEN, 1995. ISBN 574.87328.

HOLT, M. S. Appendix: Using the Beckman UD-6 Spectrophotometer. 1990. Disponível em: <http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/12/12_12.html>.

JANNI, M.; GULLÌ, M.; MAESTRI, E.; MARMIROLI, M.; VALLIYODAN, B., NGUYEN, H. T.; MARMIROLI, M. Molecular and genetic bases of heat stress responses in crop plants and breeding for increased resilience and productivity. *Journal of Experimental Botany*, v. 71, n. 13, p. 3780-3802, 2020.

KHANUJA, S. P. S.; SHASANY, A. K.; DAROKAR, M. P.; KUMAR, S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary

metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1999,17(1):1-7. doi:10.1023/A:1007528101452

LIMA, L. O.; SILVA, M. R.; MAGALHÃES, L. O.; MORAIS, G. C.; SILVA, R. N. O. Comparison of genomic DNA extraction protocols of *Capsicum* spp. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 5, p. 26419-26434, 2020.

LOZIER, J. D.; ZAYED, A. Bee conservation in the age of genomics. *Conservation Genetics*, v. 18, n. 3, p. 713-729, 2017.

NANODROP. Technical Support Bulletin. NanoDrop Technologies, Inc, 2007.

NÚÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; SALDARRIAGA, M.; OSORIO, R. G.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; DÍAZ, A.; QUINTANA, J. C. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *Brazilian Journal Medical Biology Research*, v. 37, n. 7, p. 969-977, July 2004.

PARK, B. S.; KIM, J. R.; LEE, S. E.; KIM, K. S.; TAKEOKA, G. R.; AHN, Y. J.; KIM, J. H. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. *Journal Agricultural Food Chemistry*, Easton, v. 53, p. 1152-1157, 2005.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p. 93-98, 2001.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed). *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA- CENARGEN, p.163-177, 1998.

SANTOS, M. F.; SANTOS, L. E.; COSTA, D. L.; VIEIRA, T. A.; LUSTOSA, D. C. *Trichoderma* spp. on treatment of *Handroanthus serratifolius* seeds: effect on seedling germination and development. *Heliyon*, v. 6, n. 6, p. e04044, 2020.

SOUSA, C. C.; GOMES, S. O.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; BRITTO, F. B.; Lima, P.S.C.L.; VALENTE, S. E. S. Short Communication Comparison of methods to isolate DNA from *Caesalpinia ferrea*. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, p. 4486-4493, 2014.

SOUZA, E. F.; PERES, M. R. & MORAES, S. B. Avaliação do desempenho de surfactantes para a solubilização de fases líquidas não aquosas em meio aquoso. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 3, 2010.

VIANA, J. P. G.; BORGES, A. N. C.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. F. L.; BRITTO, F. B.; LIMA, P. S. C.; VALENTE, S. E. S. Comparison of eight methods of genomic DNA extraction from babassu. *Genetics and Molecular Research*. 2015, 14: 18003-18008. <https://doi.org/10.4238/2015.december.22.26>. ISSN 1676-5680.

WALDSCHMIDT, A. M.; SALOMÃO, T. M. F.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics*., Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, p. 421-423, 1997.

WANICK, M. C.; BANDEIRA, J. A.; FERNANDES, R. V. Ação anti-inflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico do Líber do Pau d'arco Roxo (*Tabebuia avellanedae*), em pacientes portadores de Cervicites e Cérvico-vaginites. Rev. Inst. Antibióticos, Recife, v.10, n. 1/2: p.41-46, 1970.