



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**Thaís de Oliveira Campos**

**ESPECTROFOTOMETRIA E ANÁLISE DE IMAGENS:  
CORRELAÇÃO ENTRE MÉTODOS APLICADOS A QUANTIFICAÇÃO  
DE DNA**

**Prof. Dr. PEDRO CORRÊA DAMASCENO JUNIOR  
Orientador**

SEROPÉDICA, RJ  
Novembro – 2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**Thaís de Oliveira Campos**

**ESPECTROFOTOMETRIA E ANÁLISE DE IMAGENS:  
CORRELAÇÃO ENTRE MÉTODOS APLICADOS A QUANTIFICAÇÃO  
DE DNA**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

**Prof. Dr. PEDRO CORRÊA DAMASCENO JUNIOR**  
**Orientador**

SEROPÉDICA – RJ  
Novembro – 2014

**ESPECTROFOTOMETRIA E ANÁLISE DE IMAGENS:  
CORRELAÇÃO ENTRE MÉTODOS APLICADOS A QUANTIFICAÇÃO  
DE DNA**

**Thaís de Oliveira Campos**

Comissão Examinadora:

Monografia aprovada em 21 de novembro de 2014

---

Prof. Dr. Pedro Corrêa Damasceno Junior  
UFRRJ / Instituto de Agronomia / Departamento de Fitotecnia  
Orientador

---

Prof. Dr. Marco Andre Alves de Souza  
UFRRJ / Instituto de Ciências Exatas / Departamento de Química  
Membro

---

Msc. Isabela Pereira Diegues  
UFRRJ / Instituto de Agronomia / Departamento de Fitotecnia  
Membro

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela infinita graça e misericórdia para com a minha vida.

Aos meus pais pelo incentivo, e pelo esforço em me oferecer condições para estudar.

À minha família pelo carinho, amizade e companheirismo. Em vocês sempre encontro forças para continuar e também motivos de inúmeras risadas. Em especial aos meus avós, que várias vezes ficaram sem carro para que eu não precisasse estudar de ônibus.

Aos meus amigos Aimê, Vanessa e Álvaro. Depois de tantos anos nossa amizade ainda persiste e, tenho certeza de que será eterna. Obrigada pelos incontáveis momentos de alegria, de risos e de palhaçadas. Vocês moram no meu coração.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por ter me permitido alcançar um sonho, além de me proporcionar infinitas experiências que contribuíram para formar a pessoa que sou agora.

Ao Laboratório de Nutrição de Plantas, do Departamento de Solos da UFRRJ por disponibilizar o espaço e os equipamentos para realização deste trabalho.

Ao professor Pedro Corrêa Damasceno Junior pela orientação, pelas oportunidades oferecidas e, pelo aprendizado durante o curso de graduação.

Ao professor Marco André pela atenção e pela ajuda durante a realização deste trabalho.

A todos os meus queridos amigos e colegas do Laboratório de Marcadores Moleculares, Isabela, Nathália, Janaína e Daniel que estão sempre dispostos a me ajudar e, Fernanda que com tão pouco tempo nos conquistou a todos com sua meiguice e disponibilidade para trabalhar.

Ao Marcus, nem sei como agradecer as inúmeras dicas. Obrigada pela grande ajuda e pela paciência!

À Thamires, que se tornou uma grande amiga. Um presente para ajudar a passar os momentos difíceis e de medo nos trabalhos de campo da vida e, para compartilhar problemas e reclamações, mas também muitas alegrias.

À minha amiga Nathália pelo carinho, amizade e compreensão. Pelos muitos almoços e noites no alojamento, obrigada pela sua amizade e que Deus abençoe você, sua família e o pequeno Samuel.

A todos da minha turma 2009-II, pelos muitos momentos de diversão, risadas e pelos estudos de última hora que sempre me ajudaram nas provas. Em especial à Mayan, à Fabrizia, pela convivência e amizade e, ao Tafarel pelas incontáveis vezes em que me socorreu, pela sua amizade e, pela enorme contribuição na minha formação mesmo depois de formado.

Aos professores e funcionários do curso de Engenharia Florestal, pela dedicação e pelos ensinamentos.

A todos que não foram citados aqui, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

## RESUMO

A correta determinação da concentração de DNA, assim como a qualidade do mesmo, é essencial para estudos em biologia molecular. Para isto, várias técnicas vêm sendo desenvolvidas, entre as quais pode-se citar, análise de imagens computacionais, fluorímetros (que realizam a quantificação de DNA, RNA e proteínas através da utilização de corantes fluorescentes), e equipamentos como nanodrop e espectrofotômetro. As análises de imagens podem ser empregadas em estimativas de área foliar e em controle de qualidade em diagnósticos laboratoriais, com menor custo. O objetivo deste trabalho foi estimar a correlação entre a quantificação de DNA em espectrofotômetro e nanodrop, com intensidade de pixels via análise de imagens digitais de géis de agarose obtidos na eletroforese, visando permitir a padronização futura da diluição das amostras de DNA extraídas. Com o intuito de estimar as concentrações de DNA bruto de 20 acessos de *Lippia alba* pertencentes à Coleção de Germoplasma da UFRRJ, via análise imagens, efetuou-se a quantificação através da delimitação de uma área retangular na região onde se encontrava DNA, e utilizando o software *ImageJ* através da ferramenta *Plot Profile* obteve-se um gráfico informando as variações no tom de cinza obtidos na imagem, e posteriormente, através do ícone *List* obteve-se a lista referente aos valores de pixels que podem variar de 0 a 255; através do nanodrop as concentrações foram obtidas em  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , assim como em espectrofotômetro. Para estimação da pureza das amostras, através do nanodrop e do espectrofotômetro foram realizadas leituras de absorvidade nos comprimentos de onda 230, 260 e 280nm, pelos quais foi possível obter a concentração de DNA ( $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) e estimar a pureza das amostras pela relação  $A_{260}\cdot A_{230}^{-1}$  e  $A_{260}\cdot A_{280}^{-1}$ . Os valores das razões destes comprimentos de onda indicam os níveis ideais de pureza das amostras. Os dados referentes às concentrações adquiridas por nanodrop apresentaram maior coeficiente de variação (43,03%), enquanto a análise de imagens apresentou o menor valor (17,69%). As correlações mostraram uma maior equivalência entre análise de imagens e espectrofotômetro visto que o valor foi mais significativo sendo de 0,84, enquanto o valor entre análise de imagens e nanodrop apresentou valor mais baixo, sendo de 0,01. Este fato pode ser respaldado pela percentagem de correlações negativas obtidas entre as metodologias de análise de imagem e espectrofotometria, sendo de 55 e 15% entre análise de imagens e nanodrop e, análise de imagens e espectrofotômetro respectivamente. Para a variável pureza, os valores encontrados mostraram-se mais próximos quando associado análise de imagem à nanodrop e espectrofotômetro no comprimento de onde  $A_{260}\cdot A_{230}^{-1}$  (0,36 e 0,40 respectivamente), e bastante diferentes quando considerado o comprimento de onda  $A_{260}\cdot A_{280}^{-1}$  (0,16 e -0,15 respectivamente). Estas correlações baixas e/ou negativas podem ser devidas a detecções de RNA nas amostras que não são captadas nas imagens relativas à eletroforese em forma de intensidade de pixels. A quantificação através de análise de imagens utilizando-se a intensidade de pixels, como forma de inferir sobre a qualidade do DNA, mostrou-se bastante viável quando comparada com os demais equipamentos utilizados. A quantificação da intensidade de pixels das imagens correlacionou-se de forma mais relevante com o espectrofotômetro.

**Palavras-chaves:** Quantificação de DNA, Correlação, Pureza e Análise de imagens.

## ABSTRACT

The correct determination of DNA concentration, as well as its quality, is essential for studies in molecular biology. For this, several techniques have been developed, among which may be mentioned, computational analysis of images, fluorometers (that perform quantification of DNA, RNA and protein by the use of fluorescent dyes), and equipment such as NanoDrop and spectrophotometer. The image analysis can be used in leaf area estimates and quality control in laboratory diagnostics, with less cost. The aim of this study was to estimate the correlation between the quantification of DNA in a spectrophotometer and NanoDrop, with intensity of pixels by analysis of digital images of agarose gels obtained in electrophoresis, in order to allow for future standardization of dilution of the extracted DNA samples. In order to estimate the concentrations of crude DNA from 20 accessions of *Lippia alba* belonging to Germplasm Collection of UFRRJ by image analysis, we performed quantification by delimiting a rectangular area in the region where it was DNA, and using the ImageJ software through the tool Profile Plot, there was obtained a graph reporting the variations in gray level in the image, and subsequently through the List icon a list was given with the values of pixels that can vary from 0 to 255; the NanoDrop concentrations were obtained in  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , so as in spectrophotometer. To estimate the purity of the samples, using the NanoDrop and the spectrophotometer absorptivity readings were taken at wavelengths of 230, 260 and 280nm, by which it was possible to obtain the concentration of DNA ( $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) and estimate the purity of the samples by the ratio  $A_{260}\cdot A_{230}^{-1}$  and  $A_{260}\cdot A_{280}^{-1}$ . The values of the reasons on these wavelengths indicate the optimal levels of purity of the samples. The data relating to concentrations obtained by NanoDrop showed higher coefficients of variation (43,03%), while the image analysis showed the lowest value (17,69%). The correlations showed greater equivalence between image analysis and spectrophotometer since the value was more significant being 0,84, while the value of image analysis and NanoDrop showed lowest value being 0.01. This fact can be supported by the percentage of negative correlations between the methodologies of image analysis and spectrophotometry, being 55 and 15% of image analysis and NanoDrop, and image analysis and spectrophotometer respectively. For the purity variable, the values found were more close when associated image analysis to NanoDrop and spectrophotometer at the wavelength of  $A_{260}\cdot A_{230}^{-1}$  (0.36 and 0.40 respectively), and very different when considering the wavelength  $A_{260}\cdot A_{280}^{-1}$  (0, 16 and -0.15 respectively). These low and/or negative correlations may be due to detection of RNA in samples that are not captured in the images relative to electrophoresis in the form of pixel intensity. Quantitation by image analysis using the pixel intensity, in order to infer the quality of DNA proved to be quite viable when compared with other equipment used. The quantify of the intensity of pixels of images correlated in a more relevant way to the spectrophotometer.

**Keywords:** DNA quantitation, correlation, purity and image analysis

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. HIPÓTESES CIENTÍFICAS</b>	2
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	2
3.1. Ácidos Nucleicos	2
3.2. Extração de DNA	3
3.3. Técnicas para quantificação de DNA	3
3.3.1. Análise de Imagens	3
3.3.2. Espectrofotômetro	4
3.3.3. Nanodrop	5
3.3.4. Fatores que interferem na quantificação de DNA	6
3.4. Utilização das análises de DNA na pesquisa científica	7
3.4.1. Eletroforese	7
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	7
4.1. Local das análises e material vegetal	7
4.2. Coleta, extração e purificação do DNA genômico	7
4.3. Quantificação do DNA genômico	8
4.3.1. Análise de Imagem/eletroforese	8
4.3.2. Densidade óptica em Espectrofotômetro	10
4.3.3. Espectrofotometria em Nanodrop	11
4.4. Análise Estatística	12
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	12
<b>6. CONCLUSÕES</b>	17
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	17

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise descritiva do conteúdo de DNA extraído em 20 acessos de <i>Lippia alba</i> da Coleção de Germoplasma da UFRRJ e, quantificados via nanodrop (em $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ), espectrofotômetro (em $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) e por análise de imagens em géis de agarose provenientes de eletroforese, quantificado pela média do valor de pixels na imagem.....	13
Tabela 2: Correlação obtida entre eletroforese/análise de imagem, nanodrop e espectrofotômetro para quantificação de DNA. ....	14
Tabela 3: Percentagem de correlações negativas para quantificação de DNA entre nanodrop, espectrofotômetro e eletroforese. ....	14
Tabela 4: Descrição das estimativas de pureza do DNA nos comprimentos de onda $A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$ e $A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$ , obtidos via nanodrop e espectrofotômetro.....	15
Tabela 5: Correlação entre pureza nos diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ) a partir de nanodrop e espectrofotômetro e, intensidade de pixels na eletroforese. ....	16

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cuba eletrolítica para corrida em gel de agarose. ....	9
Figura 2: Fotodocumentador MiniBis Pro, utilizado para captura de imagens em gel de agarose. ....	9
Figura 3: Imagem da quantificação de DNA obtida através do programa <i>ImageJ</i> , com o respectivo gráfico informando as tonalidades de cinza na área demarcada e, lista contendo estas variações que podem assumir valores de 0 a 255 de intensidade de pixel. ....	10
Figura 4: Espectrofotômetro Bio-Rad SmartSpec™ 3000, utilizado para quantificação da concentração e grau de pureza de DNA. ....	10
Figura 5: Spectrophotometer Nanodrop 2000c Thermo Scientific, utilizado para quantificação da concentração e grau de pureza de DNA.....	11
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose realizado com amostras de DNA bruto de 20 acessos, para quantificação do conteúdo de DNA através de intensidade de pixels de imagem. ....	17

## 1. INTRODUÇÃO

A determinação da concentração de DNA é de grande importância para a análise do material genético, por exemplo, no uso dessas amostras em análises com marcadores moleculares, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e STS (*Sequence Tagged Sites*), nas análises que compreendam a síntese de cDNA (DNA complementar) para produção de bibliotecas genômicas, na purificação de fragmentos de DNA para subclonagem, na quantificação de produtos amplificados, detecção de moléculas de DNA em preparações de drogas e para reações de PCR em estudos filogenéticos (SILVA, 2010). Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) combinam a facilidade do RAPD com a robustez dos marcadores AFLP e SSR sendo assim recomendados para trabalhos que requerem confiabilidade sem alto custo para as análises (PRECZENHAK, 2013). Estes marcadores podem ser utilizados para inúmeras finalidades, como por exemplo, em estudos genéticos básicos e em programas de melhoramento genético de plantas, animais e microrganismos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

O advento de técnicas baseadas em PCR (“Polymerase Chain Reaction”) apresentou uma nova opção ao uso de marcadores moleculares (BRAMMER, 2000). Desenvolvida no ano de 1985 por Saiki et al., a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica da biologia molecular que permite a replicação exponencial de uma sequência de nucleotídeos (segmentos de DNA) em tempo bastante reduzido, na presença da enzima DNA polimerase termo-estável (Taq polimerase) e de *primers* específicos ou não, que delimitam a sequência de DNA a ser amplificada, permitindo que pequenas quantidades de material genético sejam amplificadas em poucas horas, obtendo-se grande quantidade do fragmento de DNA de interesse. Esta técnica requer material genético puro e livre de RNA residual (CORDEIRO, 2003).

Algumas técnicas e equipamentos têm sido utilizados na quantificação dos ácidos nucleicos, como por exemplo, a análise de imagens computacionais obtidas a partir de géis de agarose ou poliacrilamida provenientes da eletroforese, bem como equipamentos como o espectrofotômetro, nanodrop e fluorímetros (que realiza a quantificação de DNA, RNA e proteínas utilizando corantes fluorescentes). A eletroforese em gel de agarose é uma técnica eficiente para quantificação do DNA, além de fornecer informações sobre a qualidade nas amostras. A espectrofotometria por outro lado, é bastante utilizada na quantificação de ácidos nucleicos e também fornece um bom indicativo de qualidade das amostras no que se refere à presença de proteínas, metabólitos secundários e componentes do tampão de extração. Porém, muitas vezes os valores observados podem estar alterados pela presença de RNA, além disso, pela espectrofotometria não é possível identificação de DNA degradado através dos valores emitidos (VIANA et. al., 2012). Além da eficiência e particularidades dos equipamentos utilizados na quantificação do DNA, a qualidade dos ácidos nucleicos também pode sofrer interferência a partir da metodologia de extração, qualidades dos equipamentos e reagentes químicos utilizados nesta etapa de trabalho.

As análises de imagens digitais além de permitirem a quantificação eficiente de DNA, podem ainda ser utilizadas para fornecer estimativas de área foliar (GODOY et al., 2007) com menor custo (ADAMI et al., 2008). Além desta utilização, a citometria de imagem pode ser usada como um método de controle da qualidade em diagnósticos histológicos e citológicos.

Esta técnica tem se tornado um método laboratorial proveitoso e de baixo custo para estabelecer, objetivamente e com reprodutibilidade, diagnósticos com alto nível de qualidade (GONÇALVES et al., 2007).

Devido à importância de uma quantificação adequada do conteúdo de DNA extraído, o objetivo do presente trabalho foi estimar a correlação entre a quantificação de DNA em espectrofotômetro e nanodrop, com intensidade de pixels via análise de imagens digitais obtidas em géis de agarose em eletroforese, visando permitir no futuro o uso da análise de imagens digitais na análise de DNA no Laboratório de Marcadores de DNA do Departamento de Fitotecnia/UFRRJ.

## **2. HIPÓTESES CIENTÍFICAS**

Abaixo são descritas as hipóteses científicas levantadas no presente trabalho:

- A estimativa de correlação entre espectrofotômetro e nanodrop será a maior;
- A estimativa de correlação entre espectrofotômetro e análise de imagens será a maior;
- A estimativa de correlação entre nanodrop e análise de imagens será a maior;
- A quantificação de DNA em  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  realizada no espectrofotômetro será estatisticamente diferente da quantificação no nanodrop;
- A estimativa de correlação da variável pureza será maior entre análise de imagem e nanodrop;
- A estimativa de correlação da variável pureza será maior entre análise de imagem e espectrofotômetro;
- A estimativa de correlação da variável pureza será maior entre nanodrop e espectrofotômetro.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. Ácidos Nucleicos**

O DNA, molécula responsável pelo armazenamento e transmissão das informações biológicas de cada indivíduo, é composta pela sequência dos nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por três subunidades, um grupamento fosfato, uma desoxirribose e uma base nitrogenada, sendo as purinas adenina e guanina e, as pirimidinas citosina e timina. Estes nucleotídeos são ligados covalentemente e agrupados através de ligações fosfodiéster, que são ligações entre o grupamento fosfato do carbono 5' de uma unidade nucleotídica, com a hidroxila do carbono 3' do nucleotídeo seguinte (LEHNINGER, 2002).

Em 1953 Watson e Crick apresentaram um modelo tridimensional para a molécula de DNA, onde duas cadeias helicoidais se unem formando uma dupla hélice (ARIAS, 2004). Os grupos negativamente carregados, que são hidrofílicos (grupamento fosfato e desoxirribose) estão voltados para a parte externa da estrutura estando envoltas na água circundante e, as bases purinas e pirimidinas, que são hidrofóbicas, se encontram na parte interna da cadeia. As fitas são antiparalelas e complementares e, as ligações de pontes de hidrogênio possibilitam que A se ligue especificamente com T (ou U no caso de RNA) e, G com C, proporcionando a forma helicoidal da molécula de DNA, além de proporcionar os meios para duplicação da informação genética uma vez que através da separação das suas fitas, pode-se obter a síntese de novas fitas complementares às originais, ou seja, cada fita serve como molde para a síntese de uma nova fita complementar.

A molécula de RNA, possibilita a expressão da informação genética que está contida no DNA e, diferentemente deste, esta molécula apresenta fita simples, o açúcar é uma ribose e, em substituição à timina a base utilizada é a uracila (LEHNINGER, 2002). Podem ocorrer na forma de mensageiro, ribossômico e transportador. Em 1961 as observações de Jacob e Monod levaram a conclusão de que as proteínas são sintetizadas através da transcrição de genes estruturais do DNA em fitas complementares de RNA mensageiro (mRNA), e estes mRNA associando-se com os ribossomos dirigem a síntese de polipeptídeos (VOET, 2013).

A replicação do DNA ocorre de forma semiconservativa, ou seja, cada fita de DNA funciona como molde para a síntese de uma nova fita, resultando em duas novas moléculas sendo cada uma, formada por uma fita original e outra cópia (LEHNINGER, 2002). Na transcrição uma molécula de RNA é sintetizada a partir de um molde de DNA e através deste processo são sintetizados RNA mensageiro (mRNA), RNA ribossômico (rRNA) e RNA transportador (tRNA). O mRNA transfere a informação genética do DNA durante o processo de tradução, onde ocorre a decodificação deste nos ribossomos. O tRNA irá transportar os aminoácidos até os ribossomos possibilitando a formação de cadeias polipeptídicas.

### **3.2. Extração de DNA**

Os protocolos de extração de DNA devem permitir a obtenção de DNA de boa qualidade. A maioria dos protocolos de extração para diferentes espécies é baseado no detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (ROMANO & BRASILEIRO, 1999) descrito por Doyle e Doyle em 1990. O processo tem início através da quebra da parede celular da célula, que se dá de forma mecânica utilizando-se nitrogênio líquido para congelamento dos tecidos. A ruptura das membranas celulares é realizada para que ocorra a liberação do DNA, utilizando-se detergentes como o CTAB, e após a lise das células o DNA deve ser separado dos restos celulares e dos demais componentes como RNA, proteínas, polissacarídeos e organelas. As organelas e os restos celulares, como as membranas, são eliminados por meio de centrifugação, pois como são mais pesadas, tendem a se precipitar enquanto DNA, RNA e proteínas permanecem no sobrenadante. Para a remoção das proteínas são utilizados agentes como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, pois estes desnaturam estes componentes que tendem a precipitar em soluções aquosas (CORDEIRO, 2003).

Para se evitar a ação de DNAses que degradam o DNA, são utilizados tampões de extração que mantêm o pH numa faixa diferente do valor ótimo para ação destas, e juntamente ao tampão de extração pode ser adicionado o EDTA (ácido etileno diamono tetracético), substância que inibe a ação das DNAses. Também é adicionado ao tampão de extração agentes anti-oxidantes como  $\beta$ -mercaptoetanol, para evitar o efeito oxidativo de polifenóis que tornam o DNA inacessível às enzimas de restrição. Por fim, o DNA necessita ser separado de polissacarídeos, que tornam a amostra excessivamente viscosa e interferem na migração do DNA em corridas de eletroforese, o detergente CTAB também é utilizado para este fim uma vez que polissacarídeos e ácidos nucleicos possuem solubilidade diferente na presença deste (ROMANO & BRASILEIRO).

Uma extração de DNA inadequada poderá interferir negativamente na subsequente análise de PCR, uma vez que os contaminantes presentes nas amostras irão causar prejuízos na amplificação do DNA genômico.

### **3.3. Técnicas para quantificação de DNA**

#### **3.3.1. Análise de Imagens**

Atualmente, análises de imagens vem sendo utilizadas para diversos fins. A citometria de imagens, por exemplo, pode ser utilizada como método de controle da qualidade em diagnósticos histológicos e citológicos (GONÇALVES, 2007). Este método é utilizado para aumentar a acurácia de diagnósticos e prognósticos de algumas doenças como carcinoma cervical, sendo ainda, um procedimento de baixo custo. Avanços recentes na análise de citometria de imagem proporcionaram uma nova técnica, alternativa para a quantificação do DNA.

Na análise de imagem de densitometria, as imagens são exibidas como uma série de pixels, que estão relacionadas a uma cor e uma intensidade específicas. As diferentes intensidades de pixel podem ser convertidas em valores de absorvância por um software de análise de imagem. Uma imagem colorida de núcleos corados, pode ser convertida em tons de cinza utilizando-se luz monocromática ou analisando apenas um dos três “canais” constituintes (verde, vermelho ou azul), que compõem o pixel de cor. Em cada um dos casos, a intensidade de pixels varia numa escala de 0 (preto) a 255 (branco). Os valores de densidade óptica são calculados através dos valores de pixels desta escala utilizando-se uma fórmula matemática (HARDIE et al., 2002).

Uma outra aplicação refere-se a detecção de danos ao DNA. O método conhecido como ensaio cometa alcalino, permite verificar a ocorrência de danos ao DNA, pois o DNA celular que não está danificado aparece como um núcleo fluorescente enquanto o DNA que sofreu algum dano, que resultaram em quebras de fita, migram na direção do ânodo e por isso apresentam a forma de um cometa. Essa quantificação pode ser feita de forma manual onde através da observação, esses cometas são marcados visualmente e classificados de acordo com a forma. Porém, outro método utilizado é o sistema de análise de imagens sendo uma alternativa atual às análises manuais, fornecendo uma ampla gama de parâmetros quantitativos para descrever as propriedades geométricas e densitométricas do cometa que não estão disponíveis por análise manual, como percentagem de cauda de DNA, comprimento da cauda, momento da cauda (MCCARTHY, 1997).

As análises de imagens que utilizam marcadores de peso molecular (ladder), permitem uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA. O ladder consiste em uma mistura de fragmentos de DNA com tamanhos e concentrações conhecidos, gerados a partir da digestão de plasmídeos (tipo de DNA circular presente em bactérias) com enzimas de restrição. Permite concluir, por comparação, sobre o tamanho dos fragmentos presentes na amostra analisada.

Softwares vem sendo desenvolvidos, como o GelQuant.NET, que trabalha com imagens nos formatos JPEG, PNG e TIFF quantificando a intensidade de uma banda ou de um segmento de imagem, sendo uma ferramenta de estimativa de tamanho de banda em tempo real (BIOCHEMLABSOLUTIONS).

### **3.3.2. Espectrofotômetro**

A espectroscopia é um ramo da física que estuda a composição das radiações eletromagnéticas absorvidas, emitidas, dispersas e refletidas pelas substâncias químicas. A radiação eletromagnética divide-se em diversos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) e níveis energéticos, formando o espectro eletromagnético (GONZÁLES & SILVA, 2008).

A Espectrofotometria é um método utilizado para a determinação da concentração de compostos cromógenos presentes em uma solução, por meio da transmissão ou absorção de luz. É fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético (ROCHA, 2004). A absorção

de radiação nos referidos espectros depende da estrutura de cada molécula. De acordo com essa lei, quando um raio de luz de comprimento de onda específico ( $I_0$ ) passa através de uma solução, parte da luz é absorvida e parte é transmitida ( $I_t$ ). A quantidade de luz absorvida depende de dois fatores, sendo a distância que deve percorrer o feixe de luz dentro do líquido e a concentração da substância que absorve luz na solução.

A medição de valores de absorbância através do espectrofotômetro é usada para detectar, identificar e quantificar moléculas numa determinada solução.

O princípio do espectrofotômetro UV-VIS está relacionado às transições eletrônicas em átomos e moléculas. O espectro é produzido quando as moléculas se movem de um nível de energia menor para outro maior. Os compostos que absorvem os fótons de energia da região visível do espectro são coloridos, enquanto os que absorvem apenas na região do ultravioleta são incolores.

Segundo Lopes 2007, o espectrofotômetro possui como componentes principais uma fonte de radiação, um monocromador e um detector. É um equipamento utilizado na espectroscopia, capaz de transmitir luz num determinado comprimento de onda e de detectar a quantidade de luz que é absorvida por uma amostra. Geralmente um espectrofotômetro UV-VIS possui duas fontes de radiação, uma de luz visível e outra ultravioleta. Um espelho direciona a luz para um monocromador podendo ser este, um prisma, filtro ou uma rede de difração que separa a luz nos comprimentos de onda que a compõem. Os diferentes comprimentos de onda correspondem a diferentes cores, o vermelho, por exemplo, corresponde à 700 nm, o azul à 400 nm e, os comprimentos de onda inferiores a 300 nm são os ultravioleta.

A fonte de luz emite radiação em todos os comprimentos de onda, logo o instrumento escaneia a amostra utilizando diferentes comprimentos de onda em sequência através da rede de difração. No caso de um instrumento de duplo feixe, um comprimento de onda passa por um modelador que divide a luz em dois raios, um passando pela amostra e outro pela testemunha ou branco. Os raios são então direcionados por espelhos a um detector que compara suas intensidades e fornece a quantidade de transmitância (quantidade de luz que passa completamente pela amostra) e absorbância (que é a medida de quanta luz é absorvida pela amostra em um comprimento de onda) da amostra.

Uma desvantagem deste tipo de equipamento está na interferência com material para extração e na inability de diferenciar entre DNA e RNA. Contudo, uma vantagem e uma das razões para sua ampla utilização, é ser uma técnica espectroscópica quantitativa (GALO, 2009).

### 3.3.3. Nanodrop

Este equipamento possui seu princípio de funcionamento semelhante ao espectrofotômetro, porém a pequena quantidade de amostra necessária é uma grande vantagem do instrumento, sendo requeridos volumes de amostras de 1  $\mu\text{l}$  a 2  $\mu\text{l}$  (SILVA, 2014). Também é capaz de quantificar amostras com concentrações variando de 2  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  até 3700  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , além do espectro de comprimento de onda de 220 nm a 750 nm. Através das tensões superficiais a amostra é retida entre duas fibras óticas que quantificam sua absorbância (LOPES, 2010).

Além das medidas de absorbância nos comprimentos de onda 260 nm, 280 nm e 230 nm, faixas onde se tem a absorção de luz pelo DNA, proteínas e RNA respectivamente, o equipamento fornece as razões  $A_{260}\cdot A_{280}^{-1}$  e  $A_{260}\cdot A_{230}^{-1}$  indicando o grau de pureza do DNA, caracterizando assim a qualidade de extração do mesmo. Outra vantagem do equipamento é a

facilidade geral de utilização que aumenta grandemente a velocidade à qual as amostras podem ser processadas (THERMO SCIENTIFIC, 2010), possibilitando um grande número de amostras mensuradas em pequeno intervalo de tempo, o que é de grande importância para laboratórios que possuem rotina intensa de trabalho e necessitam realizar a quantificação de grande número de amostras.

### 3.3.4. Fatores que interferem na quantificação de DNA

A presença de impurezas afeta negativamente a amplificação do ácido nucleico através de PCR (MARQUES, 2011). Segundo Milach (1998) o DNA obtido através dos protocolos de extração necessitam estar íntegros, livres de impurezas e serem passíveis de amplificação. Porém, vários problemas durante o isolamento e purificação do DNA podem ocorrer devido à presença de polissacarídeos, proteínas, substâncias fenólicas e compostos secundários. Esses contaminantes se ligam ao ácido nucleico durante o isolamento do DNA e interferem direta ou indiretamente nas reações enzimáticas.

Os tecidos foliares de diversas espécies vegetais apresentam níveis variados de polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários que representam o principal problema no processo de purificação de DNA vegetal. Contudo, esses metabólitos secundários servem para proteger as plantas contra os herbívoros e doenças patogênicas (HARBONE et al., 1991). Tecidos maduros de várias espécies de plantas podem conter estes compostos fenólicos, e estes podem interferir nos procedimentos de extração de DNA. Geralmente estes compostos estão ausentes ou encontram-se em baixas concentrações, em folhas jovens, sementes ou pólen (MITTON et al., 1979).

Em folhas maduras, principalmente, podem ocorrer compostos polifenólicos e terpenóides, que são liberados durante a lise celular e aderem irreversivelmente ao DNA, podendo inibir a amplificação do DNA através de PCR (COUCH & FRITZ, 1990). O rompimento celular também libera polissacarídeos, que podem se coprecipitar com o DNA após a adição do álcool durante a extração, resultando em solução viscosa (SHARMA et al., 2002) de coloração marrom, imprópria para pesquisas que envolvem PCR. São de difícil separação do DNA e inibem a ação de DNA polimerases e a ação de enzimas de restrição (LODHI et al., 1994).

Os polifenóis são também agentes de oxidação presentes em muitas espécies de plantas e reduzem o rendimento e a qualidade de DNA extraído, pois durante a homogeneização dos tecidos no processo de isolamento de DNA, os compostos polifenólicos são oxidados irreversivelmente, ligando-se à proteínas e ácidos nucleicos (POREBSKI et al., 1997).

Tendo em vista a importância de um material de qualidade para as análises moleculares, se faz necessária a observação dos parâmetros relacionados à pureza do DNA de amostras extraídas. De acordo com Viana et. al (2012), para a razão comprimento de onda  $A_{260}.A_{280}^{-1}$  os valores entre 1,8 e 2,0 são ideais de pureza. Abaixo de 1,8 provavelmente há contaminação por proteínas, enquanto que acima de 2,0, a contaminação provável é por metabólitos secundários ou componentes do tampão de extração. Para a razão  $A_{260}.A_{230}^{-1}$  os valores ideais se encontram na faixa de 2,0 e 2,2. No nanodrop, valores próximos a 1,8 são geralmente aceitos para DNA puro, e em valores próximos a 2,0, geralmente tem-se RNA puro. Portanto, quando se trabalha com DNA, o parâmetro pureza deve estar sempre próximo do valor 1,8, enquanto que para RNA, o ideal é aproximar-se ao máximo do valor 2,0 (THERMO SCIENTIFIC, EUA).

Logo, a escolha do tecido vegetal a ser utilizado na extração de ácidos nucleicos e principalmente o protocolo de extração adequado para cada espécie, devem considerar a possível presença ou ausência destas substâncias, pois estas dificultarão a purificação do DNA extraído, podendo influenciar assim na sua correta quantificação.

### **3.4. Utilização das análises de DNA na pesquisa científica**

#### **3.4.1. Eletroforese**

Na eletroforese as moléculas são separadas pelo tamanho, carga elétrica e forma. Sob a influência de campos elétricos, as moléculas carregadas migram em direção ao polo oposto, ou seja, moléculas com carga negativa migram para o polo positivo (cátodo) e, moléculas com carga positiva migram para o polo negativo (ânodo) (BRAMMER, 2001). Os ácidos nucleicos, por exemplo, por possuírem carga negativa devido ao grupamento fosfato, migram na direção do polo positivo (CORDEIRO, 2003). A carga e a massa das moléculas proporcionam diferentes velocidades de migração possibilitando a sua separação. O aperfeiçoamento desta técnica no decorrer dos anos, tornou-a indispensável nas mais diversas áreas da biologia molecular.

Moléculas como aminoácidos, proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e nucleotídeos possuem grupos funcionais ionizáveis, logo, adquirem cargas positivas ou negativas em determinado pH, por isso cria-se a necessidade de manter o pH constante pelo uso de soluções-tampão.

A concentração do gel define o tamanho dos poros aos quais as moléculas estão submetidas, pois géis muito concentrados oferecem maior resistência ao deslocamento.

A eletroforese pode ser conduzida em solução com gradiente de densidade ou em diferentes meios-suporte, tais como papel de filtro, sílica gel, membranas de acetato de celulose, gel de agarose, amido ou poliacrilamida, entre outros (BRAMMER, 2001).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Local das análises e material vegetal**

O trabalho foi conduzido nos laboratórios de Marcadores de DNA e de Nutrição de Plantas respectivamente pertencentes ao Departamento de Fitotecnia e de Solos, ambos pertencentes ao Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no município de Seropédica, RJ.

Foram utilizados 20 clones de *Lippia alba* pertencentes a Coleção de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ.

### **4.2. Coleta, extração e purificação do DNA genômico**

Foram coletadas folhas jovens, estas foram envolvidas em papel alumínio, colocadas em caixas de isopor contendo gelo e levadas imediatamente para o Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, onde foi extraído o DNA genômico. Foram maceradas cerca de 250 mg de tecido vegetal, e a seguir, o pó gelado foi transferido imediatamente para tubos *ependorf* de 1,5 ml, e depositados em nitrogênio líquido. A seguir as amostras foram identificadas e armazenadas em ultrafreezer a  $-72^{\circ}\text{C}$  até o início da extração do DNA.

O DNA genômico foi extraído utilizando-se o método CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas

modificações. Aos tubos *ependorf* contendo as amostras, foram adicionados 1.000 µl de tampão de extração, a seguir, o preparado foi incubado em banho-maria a 65°C por 40 minutos. Após a incubação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados por aproximadamente 5 minutos a 14.000 rpm. No passo seguinte, o sobrenadante foi transferido para novos tubos também identificados, e foram adicionados 800 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados com suaves inversões, por aproximadamente 10 minutos, até a solução atingir uma coloração turva e, em seguida, a solução foi novamente centrifugada, como citado anteriormente. Transferiu-se a solução aquosa localizada na parte superior do tubo para outro tubo devidamente identificado, onde foram adicionados 650 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) ao sobrenadante, e os tubos foram novamente agitados e centrifugados como já mencionado. A fase aquosa foi novamente transferida para um novo tubo e adicionou-se 2/3 do volume de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos algumas vezes e incubados a -20°C por 2,5 horas. Em seguida, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 14.000 rpm. Após removido o sobrenadante, foram realizadas 3 lavagens (etanol 70% e 95%) do precipitado branco formado no fundo do tubo depois todos os tubos foram secos à temperatura ambiente por cerca de 20 minutos.

O precipitado obtido foi ressuspensionado em 200 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo *RNAse* na concentração final de 40 µg.ml<sup>-1</sup>. A solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos, com o objetivo de ressuspender todo o DNA. A seguir foram adicionados NaCl (cloreto de sódio) a 5M na proporção de 1:10 (NaCl : DNA ressuspensão) e, em seguida, adicionou-se 2/3 do volume de isopropanol gelado com o objetivo de precipitar o DNA novamente. Os tubos com a solução foram incubados em geladeira a uma temperatura de 4°C, durante a noite. O precipitado de coloração branca foi novamente lavado em etanol 70% após retirada do sobrenadante e, a seguir, lavado em etanol 90%, e seco em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, o precipitado final de cada amostra foi ressuspensionado em 200 µl de TE e armazenado em microtubos *ependorf* (1,5 ml) acondicionados em *freezer* até o momento de utilização.

### **4.3. Quantificação do DNA genômico**

A quantificação do DNA genômico foi realizada utilizando três diferentes equipamentos, sendo nanodrop e espectrofotômetro por espectrofotometria e fotodocumentador na obtenção de imagens digitais em gel de agarose.

#### **4.3.1. Análise de Imagem/eletroforese**

De posse do DNA bruto extraído de 20 amostras de *L. alba*, preparou-se o gel de agarose 2%, utilizando-se 4g de agarose para 400mL de tampão TBE (Tris-borato-EDTA). Após a polimerização retirou-se o pente e mergulhou-se a cuba em outro recipiente contendo tampão de corrida (TBE). De cada uma das 20 amostras de DNA utilizou-se a quantidade de 5µl, aos quais foram acrescidos 8µl da solução corante que é composta por GelRed, um corante fluorescente de ácidos nucleicos, e *Blue Juice* (azul de bromofenol), utilizado como um marcador de cor para monitorar a migração de moléculas durante a eletroforese. O GelRed utilizado foi diluído 2000x, colocando-se 1µl em 1999µl de água ultrapura. Foram então transferidos um total de 13µl para a corrida em gel de agarose 2%. Conectou-se à fonte e submeteu-se as amostras a uma corrida de 130V por aproximadamente 2 hora e 30 minutos (Figura 1).



Figura 1: Cuba eletrolítica para corrida em gel de agarose.

Após a corrida do DNA no gel foram obtidas imagens de alta resolução e qualidade no fotodocumentador Bio-Imaging Systems MinibisPro (Figura 2), e capturadas no Programa GelCapture. Todas as imagens capturadas foram analisadas no Programa *ImageJ*, versão 2006.02.01. Para tal as imagens foram transformadas para 8bit. Em cada ponto do gel contendo DNA bruto (locais corados com GelRed) delimitou-se um retângulo de 12 pixels de largura por 3 pixels de altura. Este espaço correspondeu à área da quantificação do DNA na imagem. Após estabelecer a referida área, utilizou-se a função *Plot Profile* no *Analyze* do software *ImageJ*, de onde foi obtido um gráfico informando as tonalidades de cinza (*Gray value*) contidos na área de quantificação (local da banda no gel).



Figura 2: Fotodocumentador MiniBis Pro, utilizado para captura de imagens em gel de agarose.

Em seguida, as tonalidades de cinza, que podem variar de 0 a 255, respectivamente, tons de preto e branco, contidas no gráfico foram conhecidas quantitativamente após se clicar no ícone *List*, na mesma janela do gráfico (Figura 3). O procedimento seguinte foi exportar estes valores para o Excel, onde foi extraída a média de cada área de quantificação que continha o DNA bruto corado com GelRed. Assim sendo, para cada área de quantificação analisado,

calculou-se a média de intensidade de tons de cinza para cada um dos 20 genótipos de *Lippia alba* aqui trabalhado.

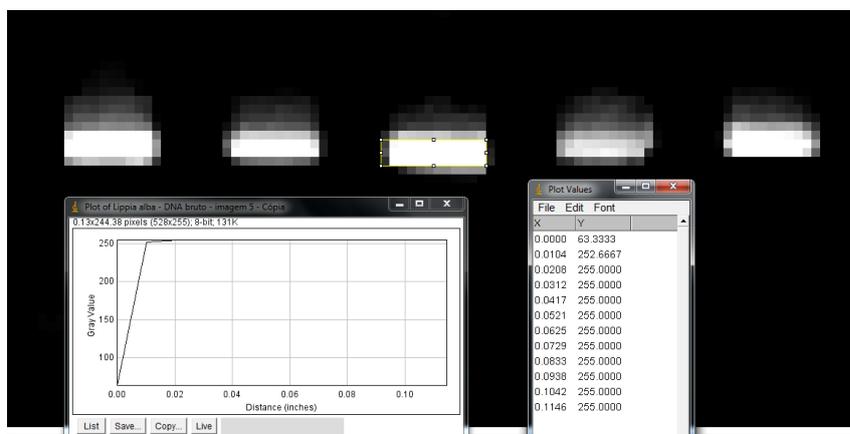


Figura 3: Imagem da quantificação de DNA obtida através do programa *ImageJ*, com o respectivo gráfico informando as tonalidades de cinza na área demarcada e, lista contendo estas variações que podem assumir valores de 0 a 255 de intensidade de pixel.

#### 4.3.2. Densidade óptica em Espectrofotômetro

As amostra de DNA bruto extraído de 20 acessos de *L. alba* foram avaliadas quanto a sua concentração por meio de densidade óptica em Espectrofotômetro Bio-Rad SmartSpec™3000 (Figura 4). Inicialmente selecionou-se no equipamento as opções de leitura de ácidos nucleicos nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230nm e realizou-se a leitura do branco onde preencheu-se uma cubeta com 50 µl de água ultrapura. Posteriormente, para mensuração das amostras foram adicionados 5 µl de DNA bruto à 45 µl de água ultrapura, totalizando 50 µl de solução e resultando em uma diluição de 1:10. De cada amostra obteve-se as leituras nos comprimentos de onda 260 nm, 280 nm e 230 nm. Para cada amostra foram feitas 4 repetições e, entre cada repetição procedeu-se com a mensuração do branco.



Figura 4: Espectrofotômetro Bio-Rad SmartSpec™ 3000, utilizado para quantificação da concentração e grau de pureza de DNA.

Para a estimativa da concentração de DNA utilizou-se a seguinte relação:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g de DNA por ml de solução}$$

Onde: 1  $\text{OD}_{260}$  (densidade óptica) corresponde a 50  $\mu\text{g}$  de DNA dupla hélice por ml de solução. A concentração de DNA na amostra foi então obtida da seguinte forma:

$$\text{Valor da leitura em OD} * 50 \mu\text{g/ml} = X$$

$$\text{Conc. DNA} = X * \text{fator de diluição}$$

As concentrações foram então obtidas em  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Para transformação para  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  multiplicou-se o resultado por 1000  $\mu\text{l}$ , equivalente a 1 mL. Através deste cálculo a concentração resultante apresentou unidade em  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , multiplicando-se o resultado por 1000  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  resultou na conversão para a unidade em  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ .

Adicionalmente, foram calculadas as relações  $A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$  e  $A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$ , fornecendo um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos.

Foram utilizadas cubetas de acrílico para as medições. Estas possuem baixa absorvidade, logo, são próprias para a utilização uma vez que os valores obtidos não sofrerão grandes alterações devido ao recipiente.

### 4.3.3. Espectrofotometria em Nanodrop

Através do equipamento Spectrophotometer Nanodrop 2000c Thermo Scientific (Figura 5), obteve-se a concentração de DNA bruto em  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  de 20 amostras de *L. alba* e, os respectivos valores de absorbância nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, assim como as relações  $A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$  e  $A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$ . Um computador acoplado ao medidor utiliza um software operacional (*operating software for NanoDrop 2000c*) que permite a aquisição imediata dos referidos valores.



Figura 5: Spectrophotometer Nanodrop 2000c Thermo Scientific, utilizado para quantificação da concentração e grau de pureza de DNA.

Primeiramente para a leitura das amostras foi selecionada a opção ácidos nucleicos. Com um lenço macio fez-se a limpeza dos sensores superior e inferior do equipamento, e posteriormente foi depositado no sensor inferior 1  $\mu\text{l}$  de água ultrapura para aferição do branco, selecionando a opção de leitura do mesmo no software. Após a leitura, foi feita

novamente a limpeza dos sensores e prosseguiu-se com a quantificação das amostras adicionando-se 1 µl no sensor inferior, e preenchendo o local de identificação com o código da amostra. Depois de mensurada, procedeu-se com o mesmo procedimento para o restante das amostras, sendo que foram realizadas quatro repetições de cada e no intervalo das repetições realizou-se a mensuração do branco.

#### 4.4. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no Programa R, versão 2.14.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Foram testadas duas metodologias, sendo análise de imagens através da quantificação do DNA utilizando-se imagens digitais obtidas a partir de géis de agarose contendo DNA bruto, dado em intensidade de pixels, e espectrofotometria através dos equipamentos nanodrop e espectrofotômetro, cuja concentração de DNA bruto foi dado em  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . As variáveis aqui trabalhadas foram DNA bruto em  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  e intensidade de pixels; e pureza de DNA, estimado indiretamente pela relação de comprimento de ondas ( $\lambda$ )  $A_{260}\cdot A_{280}^{-1}$  e  $A_{260}\cdot A_{230}^{-1}$ , estimadas apenas no nanodrop e espectrofotômetro.

Inicialmente efetuou-se uma análise descritiva dos dados para as variáveis DNA bruto em  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  e intensidade de pixels, estimando-se a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação, obtido em percentagem. Também foram apresentados para a mesma variável os valores mínimos e máximos. Posteriormente, procedeu-se com o cálculo destes parâmetros para a variável pureza.

Utilizando-se o Teste “t” comparou-se as médias da variável DNA bruto, em  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , entre dois equipamentos, nanodrop e espectrofotômetro. A comparação com a análise de imagem não foi possível pela variável responsável pela quantificação do DNA possuir natureza distinta. Prosseguindo, também foram estimados os coeficientes de correlação de Pearson entre os dados obtidos pelas duas metodologias, utilizando-se para tal as concentrações de DNA bruto em  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  (obtidos através de nanodrop e espectrofotômetro) e intensidade de pixels (provenientes de imagens adquiridas em fotodocumentador). Ou seja, intensidades de pixels maiores corresponderão a concentrações maiores de DNA em  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Entre as metodologias, utilizou-se também para as estimativas de correlação a variável pureza. A partir da análise de correlação entre as metodologias, considerando a variável referente à quantificação do DNA, foi apresentada também no presente trabalho uma tabela contendo o percentual de correlações negativas obtidas (Tabela 3).

No presente trabalho, as repetições dentro de cada metodologia foram referentes às médias de cada um genótipo de *Lippia alba* aqui utilizado, e cada uma dessas médias, foi obtida a partir de quatro análises. Assim sendo, no nanodrop e no espectrofotômetro, a média de um genótipo correspondeu a quatro quantificações do mesmo DNA no mesmo equipamento. No caso da análise de imagem, cada média dentro do genótipo correspondeu a análise do mesmo genótipo em quatro géis de agarose distintos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 observa-se que a média da concentração de DNA quantificada no espectrofotômetro foi superior a do nanodrop, sendo respectivamente, de 27,69 e 26,41  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Estatisticamente pelo Teste “t” comparando médias duas a duas a quantificação de DNA realizada nos referidos equipamentos diferiram. Obviamente a comparação da quantificação realizada na análise de imagem com a quantificação no nanodrop e espectrofotômetro não se

faz necessária e viável, devido à natureza da variável ser totalmente distinta. Dessa forma, análises de correlações onde se pode verificar a tendência de uma variável com outra, mesmo sendo de naturezas distintas, são realmente as análises mais apropriadas no presente caso.

Tabela 1: Análise descritiva do conteúdo de DNA extraído em 20 acessos de *Lippia alba* da Coleção de Germoplasma da UFRRJ e, quantificados via nanodrop (em  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), espectrofotômetro (em  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) e por análise de imagens em géis de agarose provenientes de eletrofore, quantificado pela média do valor de pixels na imagem.

	Nanodrop	Espectrofotômetro	Análise de imagem
Média	26,41	27,69	172,41
Mínimo	13,43	14,50	76,69
Máximo	50,18	48,38	211,08
$\sigma$	11,37	10,64	30,50
$\text{CV}_{(\%)}$	43,03	38,41	17,69

Legenda:  $\sigma$  = desvio-padrão;  $\text{CV}_{(\%)}$  = coeficiente de variação em percentagem.

A correlação requer duas variáveis quantitativas, e mensura a direção e a força da relação linear entre estas duas variáveis. É usualmente representada pela letra  $r$  e este valor é positivo quando há uma associação positiva entre as variáveis, do mesmo modo, podemos dizer que  $r$  é negativo quando a associação entre as variáveis é negativa (MOORE, 2003).

Ainda segundo Morre (2003), o coeficiente de correlação é adimensional, por este motivo, o uso na comparação das variáveis em estudo, que apresentam diferentes unidades, se torna apropriado e, seu valor varia na faixa de  $-1 \leq r \leq 1$ , onde próximo a  $-1$  tem-se uma relação forte porém negativa e, valores próximos a  $1$  indicam relação forte e positiva. Valores próximos a zero indicam uma relação linear bastante fraca, ou seja, não implica na falta de relação, porém reflete uma ausência de relação linear, enquanto valores próximos a  $-1$  ou  $1$  indicam que a distribuição dos pontos se encontram aproximados a uma linha reta. Valores extremos iguais a  $-1$  e  $1$  ocorrem somente em casos de relação linear perfeita, quando os pontos se encontram exatamente ao longo de uma linha reta.

Observa-se que a variação estimada pelo desvio-padrão foi maior no nanodrop ( $\sigma = 11,37$ ) quando comparado com o espectrofotômetro ( $\sigma = 10,64$ ). Tal fato é facilmente observado através das estimativas do coeficiente de variação ( $\text{CV}_{(\%)}$ ), sendo este superior em nanodrop. A quantificação via análise de imagens apresentou um  $\text{CV}_{(\%)}$  de 17,69, variação esta bastante inferior às demais, observadas em nanodrop e espectrofotômetro, porém, não se pode deixar de mencionar que a natureza dos dados obtidos são completamente diferentes. Também o fato de que os diferentes genótipos tenham sido considerados como repetições no presente trabalho, pode ter resultado em maior variação tanto no nanodrop como no espectrofotômetro. O valor mínimo e máximo quantificados no nanodrop foi de 13,43 e 50,18, respectivamente, enquanto que no espectrofotômetro foi de 14,50 e 48,38, respectivamente.

De forma geral, observa-se uma maior variação nos processos de quantificação em espectrofotômetro e nanodrop, que via análise de imagens, dessa forma, pode-se inferir que as análises em imagens são mais estáveis e, portanto, podem demandar um número menor de repetições. Porém, como já citado anteriormente, o conteúdo de DNA quantificado no espectrofotômetro foi superior ao do conteúdo no nanodrop. Isto pode ser consequência de erros no procedimento de leitura em espectrofotômetro, quando da limpeza insuficiente do recipiente entre as amostras quantificadas alterando assim, as concentrações reais de DNA existentes.

Observa-se na Tabela 2 as correlações de Pearson entre as duas metodologias. Todas as correlações entre as variáveis foram positivas. A correlação entre nanodrop e espectrofotômetro foi estimada em 0,55, enquanto que a maior correlação estimada foi entre análise de imagem e espectrofotômetro, sendo, portanto a estimativa de maior relevância, com valor de 0,84. Como as variáveis são positivamente correlacionadas, conclui-se que ambos os equipamentos estão realizando a quantificação de DNA de forma similar. O coeficiente de correlação obtido através da associação entre nanodrop e análise de imagem apresentou valor bastante inexpressivo, sendo estimado em 0,01. Portanto, pode-se inferir que as variáveis não estão correlacionadas, ou seja, os resultados atingidos pela quantificação de DNA por ambos os equipamentos não coincidem.

Tabela 2: Correlação obtida entre análise de imagem, nanodrop e espectrofotômetro para quantificação de DNA.

Metodologia	Análise de imagem	Nanodrop	Espectrofotômetro
Análise imagem	1.00	0.01	0.84
Nanodrop		1.00	0.55
Espectrofotômetro			1.00

As estimativas apresentadas na Tabela 2 já poderiam ser esperadas, visto que, conforme a Tabelas 3, a percentagem de correlações negativas obtidas entre análise de imagem e nandrop, e entre análise de imagem e espectrofotômetro, foram estimadas respectivamente em 55 e 15%. Dessa forma, foi realmente esperada uma correlação muito menor entre os primeiros. A percentagem de correlações negativas entre nanodrop e espectrofotômetro foi de 45%, justificando a correlação intermediária, porém, baixa, entre estes dois equipamentos.

Tabela 3: Percentagem de correlações negativas para quantificação de DNA entre nanodrop, espectrofotômetro e eletroforese.

Metodologia	Análise de imagem	Nanodrop	Espectrofotômetro
Análise de imagem	1.00	0.55	0.15
Nanodrop		1.00	0.45
Espectrofotômetro			1.00

Na Tabela 4, encontram-se os valores correspondentes ao parâmetro pureza das amostras aqui utilizadas. Os valores médios obtidos nos comprimentos de onda  $A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$  e  $A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$ , foram 1,88 e 0,53, e 1,98 e 0,70, respectivamente, para nanodrop e espectrofotômetro. Assim como os valores mínimos foram de 1,76 e 0,33, e 1,67 e 0,50, e os máximos de 2,24 e 0,82, e 2,40 e 0,94. Os coeficientes de variação apresentaram diferença significativa entre os dois equipamentos tanto para a razão de comprimento de onda  $A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$  quanto  $A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$ , sendo 5,33 e 29,05 para nanodrop, e 9,68 e 18,33 para espectrofotômetro, o que demonstra uma variação entre os equipamentos quanto à quantificação do grau de pureza em ambas as razões de comprimento de onda. Os valores de desvio-padrão foram maiores em espectrofotômetro em relação ao comprimento de onda  $A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$  (0,19), e maiores em nanodrop no comprimento de onda  $A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$  (0,15).

Tabela 4: Descrição das estimativas de pureza do DNA nos comprimentos de onda  $A_{260}.A_{280}^{-1}$  e  $A_{260}.A_{230}^{-1}$ , obtidos via nanodrop e espectrofotômetro.

	Nanodrop $A_{260}.A_{280}^{-1} - A_{260}.A_{230}^{-1}$	Espectrofotômetro $A_{260}.A_{280}^{-1} - A_{260}.A_{230}^{-1}$
Média	1,88 – 0,53	1,98 – 0,70
Mínimo	1,76 – 0,33	1,67 – 0,50
Máximo	2,24 – 0,82	2,40 – 0,94
$\sigma$	0,10 – 0,15	0,19 – 0,13
CV(%)	5,33 – 29,05	9,68 – 18,33

Legenda:  $\sigma$  = desvio-padrão; CV(%) = coeficiente de variação em percentagem.

Como tem-se os valores na faixa de 2,0 – 2,2 como ideais na razão  $A_{260}.A_{230}^{-1}$ , valores abaixo desta faixa podem ser resultado de carregamento de carboidratos, resíduos de fenol provenientes da extração, resíduos de guanidina e glicogênio usado para precipitação (THERMO SCIENTIFIC, EUA). Os baixos resultados obtidos podem ser devido à contaminação da amostra por contaminantes que absorvem luz no comprimento de onda de 230 nm ou inferior, podendo indicar problemas com a amostra ou com o procedimento de extração.

Na faixa de absorbância de  $A_{260}.A_{280}^{-1}$ , valores inferiores podem ser resultantes da presença de contaminantes que absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm ou inferior. Observando-se a média obtida, o DNA apresentou grau de pureza apropriada. Os valores mínimos encontrados podem representar contaminação das amostras por proteína ou por um reagente como o fenol ou ainda, que houve algum problema com a medição.

De forma geral, as correlações relacionadas aos níveis de pureza no DNA avaliados foram maiores entre nanodrop e espectrofotômetro no comprimento de onda  $A_{260}.A_{230}^{-1}$  (Tabela 5). No mesmo comprimento de onda citado anteriormente, observa-se também, na mesma Tabela, que a correlação para verificação do nível de pureza entre análise de imagem e nanodrop, e análise de imagem com espectrofotômetro foram muito semelhantes, sendo estas estimadas, respectivamente, em 0,36 e 0,40. Para as mesmas variáveis, porém considerando apenas o comprimento de onda de  $A_{260}.A_{280}^{-1}$ , as correlações obtidas foram de 0,16 e -0,15, sendo estas muito baixas e/ou negativas. Correlações baixas ou negativas entre as diferentes formas de quantificação são explicadas pela baixa relação linear ou tendência de redução ou aumento dos valores quantificados, e podem ser devidas a detecções de RNA nas amostras que não são captadas nas imagens relativas à eletroforese em forma de intensidade de pixels.

Tabela 5: Correlação entre pureza nos diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ) a partir de nanodrop e espectrofotômetro e, intensidade de pixels na eletroforese.

	Eletroforese	$\lambda_{\text{nanodrop}} A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$	$\lambda_{\text{nanodrop}} A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$	$\lambda_{\text{espectrofotômetro}} A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$	$\lambda_{\text{espectrofotômetro}} A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$
Eletroforese	1.00	0.16	0.36	-0.15	0.40
$\lambda_{\text{nanodrop}} A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$		1.00	0.70	-0.25	0.51
$\lambda_{\text{nanodrop}} A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$			1.00	-0.17	0.93
$\lambda_{\text{espectrofotômetro}} A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$				1.00	-0.25
$\lambda_{\text{espectrofotômetro}} A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$					1.00

Dessa forma, pode-se concluir que as tendências lineares de detecção de impurezas na razão  $A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$  nm são muito semelhantes entre as imagens e as detecções no espectrofotômetro, apesar da correlação negativa, e um pouco menos verdadeiro entre imagens e nanodrop, porém, ainda uma correlação não negativa mas muito baixa. Tal fato pode estar indicando que o aumento na intensidade de pixels nas imagens corresponde a um DNA mais puro, pois o corante utilizado (GelRed) funciona como corante de ácidos nucleicos e pode corar tanto DNA quanto RNA, porém, devido à diferença de peso entre as moléculas, DNA e RNA migram em velocidades diferentes quando submetidos à técnica de eletroforese. Logo, pode-se concluir que os valores de pixels adquiridos através da análise de imagens referem-se a DNA. Isto pode ser explicado ainda pelo fato de parâmetros que se aproximam do valor 1,8 no nanodrop e espectrofotômetro corresponderem a amostras com maior teor de DNA, e menos de RNA.

Na Tabela 4 observa-se que os valores para o referido parâmetro ficaram sempre próximos aos valores 1,8 e 2,0, portanto, a tendência negativa na correlação correspondeu a valores tendendo a 1,8.

Considerando o comprimento de onda na razão  $A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$  nm, nota-se na Tabela 5 que a correlação entre análise de imagem e nanodrop, e com espectrofotômetro foram relativamente baixas, porém, positivas, sendo respectivamente de 0,36 e 0,40. Tal tendência pode estar indicando que intensidades de pixels maiores nas imagens realmente correspondem a valores menores de impurezas dos tipos fenóis, polissacarídeos, proteínas e compostos secundários, pois a tendência linear é positiva, logo o parâmetro pureza no nanodrop e espectrofotômetro estão também aumentando (juntamente com a intensidade de pixels = maior concentração de DNA). Valores que se aproximam de 2,0 para o parâmetro referido, tendem a possuir um menor grau de impurezas (THERMO SCIENTIFIC), dessa forma, conclui-se que intensidades de pixels próximas de 255 correspondem a uma amostra de DNA mais puro. Porém, a média do parâmetro pureza no comprimento de onda na razão  $A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$  foi de 0,53 e 0,70 (Tabela 4), respectivamente no nanodrop e espectrofotômetro, indicando amostras com certo grau impurezas. Mediante estes resultados pode-se inferir que tanto o nanodrop quanto o espectrofotômetro são equipamentos mais sensíveis na detecção de compostos fenólicos, polissacarídeos, entre outros, porém, que não interferem de forma direta na qualidade do DNA observado nas imagens, visto que arrastes não foram observados nestas (Figura 6).

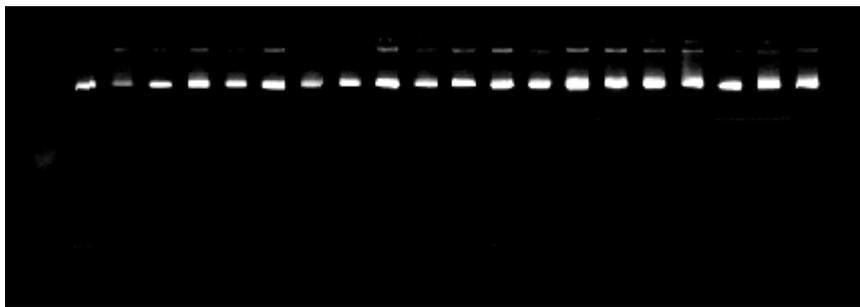


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose realizado com amostras de DNA bruto de 20 acessos, para quantificação do conteúdo de DNA através de intensidade de pixels de imagem.

Valores médios ou baixos de pixels correspondem a amostras de DNA com certos níveis de impurezas.

Para a aplicação de técnicas moleculares, é necessária a obtenção de metodologias adequadas para o isolamento de DNA, com bom rendimento e qualidade. O DNA isolado deve estar livre de contaminantes, como polissacarídeos, proteínas e substâncias fenólicas. Nesse sentido, a forma de coleta e acondicionamento dos tecidos vegetais, assim como seu manuseio durante extração são fundamentais (MAZZA e BITTENCOURT, 2000).

## 6. CONCLUSÕES

A quantificação da intensidade de pixels nas imagens como forma de inferir sobre a qualidade do DNA mostrou-se bastante viável quando comparado com os equipamentos Spectrophotometer Nanodrop 2000c Thermo Scientific e Espectrofotômetro Bio-Rad SmartSpec<sup>TM</sup>3000, porém, a quantificação da intensidade pixel nas imagens digitais considerando que uma maior intensidade de pixels corresponde a maior quantidade de DNA na amostra, correlacionou-se de forma satisfatória apenas com o espectrofotômetro. Desta forma, o método de análise de imagens apresenta uma alternativa viável, podendo ser utilizada no futuro nas análises de DNA no Laboratório de Marcadores Moleculares do Departamento de Fitotecnia/UFRRJ.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMI, M. et al. Estimativa de área de folíolos de soja usando imagens digitais e dimensões foliares. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.4, p.1053-1058, 2008.
- ARIAS, G. **Em 1953 foi descoberta a estrutura do DNA: Etapas de um grande avanço científico**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2004.
- ARRIEL, N. H. C. et al. Análise comparativa de quatro protocolos de extração de DNA genômico, em Gergelim. **Rev. bras. ol. fibros**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 525-535, maio-ago. 2002.

BIOTIUM, Nucleic Acid Detection Technologies “**Safety Report of GelRed and GelGreen**”. [Consultado em 09.11.2014]. Disponível em <http://www.biotium.com>.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2000.

BRAMMER, S. P. **A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2001.

CORDEIRO, M. C. R. **Engenharia genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicações**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003.

COSTA, C. B. **Análise da expressão de uma cromodomínio-helicase no parasito cestódeo *Mesocestoides corti***. 2011. 43 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

COUCH, J.A.; FRITZ, P.J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 8, p. 8-12, 1990.

DANNER, M. A. et al. Proposta de protocolo para extração de DNA de Jaboticabeira. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 363-367, abr.-jun., 2011.

DESHMUKH, V. P. et al. A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight and Argot. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 468-472, 2007.

DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, vol. 12, no. 1, p. 13-15.

FERREIRA, M. G.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1996. 220p.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova**, São Paulo, vol. 32, n. 2, 2009.

GELQUANT.NET, Software provided by [biochemlabsolutions.com](http://biochemlabsolutions.com). [Consultado em 10.11.2014]. Disponível em <http://biochemlabsolutions.com>.

GODOY, L. J. G. et al. Análise da imagem digital para estimativa da área foliar em plantas de laranja “pêra”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 3, p.420-424, 2007.

GONÇALVES, S. et al. Citometria de imagem do conteúdo de DNA nuclear de células epiteliais do colo uterino. **RBAC**, vol. 39(1): 71-78, 2007.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Patologia clínica veterinária: texto introdutório**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 342 p.

HARBONE, J. B.; PALO, R. T.; ROBBINS, C. T. **Plant defenses against mammalian herbivore**. Boca Raton: CRC PressLLC, 1991. 192p.

HARDIE, D. C., GREGORY, T.R.; HEBERT, P.D.N. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n. 6, p. 735-749, 2002.

LIMA, R. S. N.; LEÃO, P. C. S.; SANTOS, C. A. F. Quantificação e Pureza do DNA de Videira por Meio de Espectrofotometria. In.: Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semi-Árido, I, 2006, Petrolina, PE. **Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semi-Árido**, 2006.

LODHI, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and -Vitis species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, p. 6-13, 1994.

LOPES, D. E. C. **Espectroscopia óptica: histórico, conceitos físicos e aplicações**. 2007. 38f. Monografia (Especialização) - Curso de Licenciatura em Física Com ênfase em Física Ambiental, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2007. Cap. 2.

LOPES, A. F. R. **Procedimentos e Técnicas em Laboratório de Investigação Médica em Inflamação e Osso**. 2010. 67 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biomédicas, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2010.

MARQUES, A. I. A. **Pesquisa de fitoplasmas das pomóideas e prunóideas em Portugal**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Agrônômica, Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

MCCARTHY P.J., S.F. SWEETMAN, P.G. MCKENNA, and V.J. MCKELVEY-MARTIN (1997): Evaluation of manual and image quantification of DNA damage in the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 12, 249-251.

MILLACH, S.C.K. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: S.C.K. Millach, 1998. 141p.

MITTON, J.B.; LINHART, Y.B.; STURGEON, K.B.; HAMRICK, J.L. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of Ponderosa pine. *Journal of Heredity*, v. 70, n. 2, p. 86-89, 1979.

MOORE, David S. (2003), *The Basic Practice of Statistics*. New York, Freeman.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1009 p.

OLIVEIRA, M. C. S. et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos, Sp: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

POREBSKI, S.; BAILEY, L. G. & BAUM, B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Pant Molecular Biology Reporter**, v.15, p.8-15, 1997.

PRECZENHAK, A. P. **Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Estadual do Centro-oeste, Unicentro, Guarapuava - PR, 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011. Disponível em: URL <http://www.r-project.org/>.

REIS JÚNIOR, F. B. et al. **Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microrganismos do Solo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002.

ROCHA, F. P. R.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, Vol. 27, No. 5, 807-812, 2004.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia*, v.2, n.9, p.40-43, 1999. In.: MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p. 12-17, 2000.

ROUX, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. **Cold Spring Harbor Protocols**, (4).

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. A. et al. Enzymatic amplification of  $\beta$  globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science*, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, dec.1985.

SILVA, M. N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, v. 34, n. 6, Viçosa, nov./dec. 2010.

SILVA, V. G. **Implementação de um método de validação do controlo de qualidade em amostras de DNA armazenadas no Biobanco-IMM Vanessa Gonçalves**. 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Molecular em Saúde, Escola Superior de Saúde Egas Moniz, Caparica, Portugal, 2014.

SHARMA, A. D.; GILL, P. K.; SINGH, P. DNA Isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. **Pant Molecular Biology Reporter**, v.20, p.415a-415f, 2002.

Thermo Scientific, T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers (s.d) "Assessment of Nucleic Acid Purity". [Consultado em 04.11.2014]. Disponível em <http://www.nanodrop.com>.

VIANA, J. P. G. et al. Comparação de seis métodos de extração de DNA genômico em Babaçu. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2, 2012, Belém, Pará. **Anais do II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos**, 2012.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.