

# Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 2

José Max Barbosa de Oliveira Junior  
(Organizador)

José Max Barbosa de Oliveira Junior  
(Organizador)

# Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 2

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Executiva: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Natália Sandrini  
Edição de Arte: Lorena Prestes  
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof.<sup>a</sup> Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof.<sup>a</sup> Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
A532	Análise crítica das ciências biológicas e da natureza 2 [recurso eletrônico] / Organizador José Max Barbosa de Oliveira Junior. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza; v. 2)  Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-358-3 DOI 10.22533/at.ed.583192705  1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Série.  CDD 610.72
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

A obra *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com 96 capítulos apresenta uma visão holística e integrada da grande área das Ciências Biológicas e da Natureza, com produção de conhecimento que permeiam as mais distintas temáticas dessas grandes áreas.

Os 96 capítulos do livro trazem conhecimentos relevantes para toda comunidade acadêmico-científica e sociedade civil, auxiliando no entendimento do meio ambiente em geral (físico, biológico e antrópico), suprimindo lacunas que possam hoje existir e contribuindo para que os profissionais tenham uma visão holística e possam atuar em diferentes regiões do Brasil e do mundo. As estudos que integram a *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* demonstram que tanto as Ciências Biológicas como da Natureza (principalmente química, física e biologia) e suas tecnologias são fundamentais para promoção do desenvolvimento de saberes, competências e habilidades para a investigação, observação, interpretação e divulgação/interação social no ensino de ciências (biológicas e da natureza) sob pilares do desenvolvimento social e da sustentabilidade, na perspectiva de saberes multi e interdisciplinares.

Em suma, convidamos todos os leitores a aproveitarem as relevantes informações que o livro traz, e que, o mesmo possa atuar como um veículo adequado para difundir e ampliar o conhecimento em Ciências Biológicas e da Natureza, com base nos resultados aqui dispostos.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
AS LIBÉLULAS (ODONATA: INSECTA) DE CONCEIÇÃO DA BARRA, ESPÍRITO SANTO, DEPOSITADAS NA COLEÇÃO ZOOLOGICA NORTE CAPIXABA / CZNC	
Karina Schmidt Furieri Carolini Cavassani Arianny Pimentel Storari	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5831927051</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>10</b>
FORMIGAS (Hymenoptera: Formicidae) ASSOCIADAS ÀS ÁREAS DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE DE UMA HIDRELÉTRICA DO SUL DO BRASIL	
Junir Antonio Lutinski Cladis Juliana Lutinski	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5831927052</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>23</b>
IDENTIFICAÇÃO DA HERPETOFAUNA DO INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS CERES	
Alexandre Pereira de Oliveira Filho Marcos Vitor dos Santos Almada Jorge Freitas Cieslak	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5831927053</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>32</b>
CRIAÇÃO DE PACAS ( <i>Cuniculus paca</i> ) COMO ALTERNATIVA DE DIVERSIFICAÇÃO DE PRODUÇÃO E RENDA EM RIO BRANCO - ACRE	
Francisco Cildomar da Silva Correia Reginaldo da Silva Francisco Valderi Tananta de Souza Vania Maria Franca Ribeiro Fábio Augusto Gomes	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5831927054</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>46</b>
FISCALIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO: AVIFAUNA RESGATADA PELO MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DA BAHIA	
Diego Silva Macedo Alanna Barreto dos Santos Lucas Gabriel Souza Santos	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5831927055</b>	
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>56</b>
LEVANTAMENTO DA AVIFAUNA EM AMBIENTE URBANO E RURAL NO MUNICÍPIO DE NOVO HAMBURGO, RS, BRASIL	
Brenda Silveira de Souza Marcelo Pereira de Barros	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5831927056</b>	

**CAPÍTULO 7 ..... 68**

ASPECTOS PSICOLÓGICOS NO ESPORTE: REFLEXÕES, QUESTIONAMENTOS E INFLUÊNCIAS DO ESTRESSE E ANSIEDADE NOS ATLETAS DE HANDEBOL

Rômulo Dantas Alves  
Taís Pelição  
Marcos Gabriel Schuindt Acácio  
Luan Henrique Roncada  
Debora Gambary Freire Batagini  
Rubens Venditti Júnior

**DOI 10.22533/at.ed.5831927057**

**CAPÍTULO 8 ..... 81**

EFEITO DO TAMANHO DA QUADRA SOBRE AÇÕES TÉCNICAS E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM JOVENS JOGADORES DE FUTSAL

Matheus Luiz Penafiel  
Alexsandro Santos da Silva  
Dagnou Pessoa de Moura  
Osvaldo Tadeu da Silva Junior  
Bruno Jacob de Carvalho  
Yacco Volpato Munhoz  
Julio Wilson Dos-Santos

**DOI 10.22533/at.ed.5831927058**

**CAPÍTULO 9 ..... 90**

EFEITOS DO ALONGAMENTO AGUDO SOBRE A FORÇA DE MEMBROS SUPERIORES NO ARREMESSO DO ATLETISMO

Fernando Barbosa Carvalho  
Márcio Pereira da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.5831927059**

**CAPÍTULO 10 ..... 100**

INFLUÊNCIA DA CARGA TABAGÍSTICA SOBRE O TRANSPORTE MUCOCILIAR NASAL DE TABAGISTAS ATIVOS

Alessandra Mayumi Marques Masuda  
Iara Buriola Trevisan  
Tamara Gouveia  
Caroline Pereira Santos  
Guilherme Yassuyuki Tacao  
Tamires Veras Soares  
Ercy Mara Cipulo Ramos  
Dionei Ramos

**DOI 10.22533/at.ed.58319270510**

**CAPÍTULO 11 ..... 110**

LESÃO RENAL AGUDA POR VANCOMICINA: ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE A INCIDÊNCIA, FATORES DE RISCO E MORTALIDADE EM PACIENTES CRÍTICOS

Lais Maria Bellaver de Almeida  
Isabella Gonçalves Pierri  
Karina Zanchetta Cardoso Eid  
Welder Zamoner  
Daniela Ponce  
André Balbi

**DOI 10.22533/at.ed.58319270511**

**CAPÍTULO 12 ..... 121**

LESÃO RENAL AGUDA POR VANCOMICINA: ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE A INCIDÊNCIA, FATORES DE RISCO E MORTALIDADE EM PACIENTES NÃO CRÍTICOS

Isabella Gonçalves Pierri  
Lais Maria Bellaver de Almeida  
Karina Zanchetta Cardoso Eid  
Welder Zamoner  
André Balbi  
Daniela Ponce

**DOI 10.22533/at.ed.58319270512**

**CAPÍTULO 13 ..... 133**

POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO CORTICAL EM BEBÊS A TERMO E PRÉ-TERMO

Dayse Mayara Oliveira Ferreira  
Letícia Sampaio de Oliveira  
Rafaela Cristina da Silva Bicas  
Yara Bagali Alcântara  
Brena Elisa Lucas  
Ana Cláudia Figueiredo Frizzo

**DOI 10.22533/at.ed.58319270513**

**CAPÍTULO 14 ..... 146**

PROCEDÊNCIA DOS ENCAMINHAMENTOS À MATERNIDADE DO HC- FMB-UNESP DOS CASOS GRAVES E DE MORTE MATERNA ASSOCIADOS À HIPERTENSÃO ARTERIAL

Eduardo Minoru Nomura  
Victoria de Carvalho Zaniolo  
Ariel Althero Zambon  
Ana Débora Souza Aguiar  
Eduarda Baccari Ferrari  
José Carlos Peraçoli

**DOI 10.22533/at.ed.58319270514**

**CAPÍTULO 15 ..... 160**

SERIA A ANESTESIA UMA INTERFERÊNCIA NO TRATAMENTO DE ELETROACUPUNTURA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Strongyloides venezuelensis*?

Maria Teresa da Silva Bispo  
Luana dos Anjos Ramos

**DOI 10.22533/at.ed.58319270515**

**CAPÍTULO 16 ..... 175**

ESTUDANTES DE ODONTOLOGIA CANHOTOS E OS DESAFIOS ENFRENTADOS EM ATIVIDADES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Julio Martinez Alves Oliveira  
Suzely Adas Saliba Moimaz  
Artênio José Isper Garbin  
Tânia Adas Saliba

**DOI 10.22533/at.ed.58319270516**



**CAPÍTULO 17 ..... 181**

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DE *MYRTACEAE* CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

Juliana Barbosa Succar  
Gabriele Marques Pinto  
Tauana de Freitas Pereira  
Ida Carolina Neves Direito  
Maria Cristina de Assis  
Cristiane Pimentel Victório

**DOI 10.22533/at.ed.58319270517**

**CAPÍTULO 18 ..... 193**

ATIVIDADE DE CELULASES, BETA-GLICOSIDASES E XILANASES DE *Trichoderma harzianum* E *Trichoderma asperellum* EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

Mariane Cristina Mendes  
Cristiane Vizioli de Castro Ghizoni  
Fabiana Guillen Moreira Gasparin  
Maria Inês Rezende

**DOI 10.22533/at.ed.58319270518**

**CAPÍTULO 19 ..... 206**

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA E TEMPO DE REAÇÃO NA HIDRÓLISE DA LACTOSE

Poline Wilke  
Karen Jaqueline Haselroth  
Raquel Ströher

**DOI 10.22533/at.ed.58319270519**

**CAPÍTULO 20 ..... 223**

AVALIAÇÃO DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE QUITINASE EXTRACELULAR POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Victoria Pommer  
Letícia Mara Rasbold  
Jorge William Fischdick Bittencourt  
Alexandre Maller  
Marina Kimiko Kadowaki

**DOI 10.22533/at.ed.58319270520**

**CAPÍTULO 21 ..... 231**

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus rhamnosus* V5 CONTRA *SALMONELLA ENTERICA* sorovariedade *Typhimurium*.

Carina Terumi Tsuruda  
Patrícia Canteri De Souza  
Erick Kenji Nishio  
Ricardo Sérgio Couto de Almeida  
Luciano Aparecido Panagio  
Ana Angelita Sampaio Baptista  
Sandra Garcia  
Renata Katsuko Takayama Kobayashi  
Gerson Nakazato

**DOI 10.22533/at.ed.58319270521**

**CAPÍTULO 22 ..... 241**

BIOFILME BACTERIANO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS : TEM COMO EVITAR?

Natara Favaro Tosoni  
Naiele Mucke  
Márcia Regina Terra  
Márcia Cristina Furlaneto  
Luciana Furlaneto Maia

**DOI 10.22533/at.ed.58319270522**

**CAPÍTULO 23 ..... 258**

BIOFILTRO DE RESÍDUO ORGÂNICO APLICADO NA DESSALINIZAÇÃO DE ÁGUA SALOBRA

Francielle Fernandes Gonçalves de Barros  
Rebecca Carvalho Mendes e Silva  
Charles Albert Moises Ferreira  
Juliana Parolin Ceccon

**DOI 10.22533/at.ed.58319270523**

**CAPÍTULO 24 ..... 270**

BIOLOGIA E APLICAÇÕES PRÉ-CLÍNICAS DO MODELO EXPERIMENTAL SARCOMA 180

Paulo Michel Pinheiro Ferreira  
Renata Rosado Drumond  
Carla Lorena Silva Ramos  
Rayran Walter Ramos de Sousa  
Débora Caroline do Nascimento Rodrigues  
Ana Paula Peron

**DOI 10.22533/at.ed.58319270524**

**CAPÍTULO 25 ..... 288**

BIORREPOSITÓRIO DE SALIVA EM ESTUDOS GENÉTICO-MOLECULARES: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA APÓS LONGOS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO

Natália Ramos  
Thais Francini Garbieri  
Thiago José Dionísio  
Carlos Ferreira dos Santos  
Lucimara Teixeira das Neves

**DOI 10.22533/at.ed.58319270525**

**CAPÍTULO 26 ..... 302**

CONTROLE DA ESTERILIZAÇÃO DE AUTOCLAVES DO BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIOESTE E DE UM ABRIGO PARA IDOSOS, CASCAVEL, PR

Helena Teru Takahashi Mizuta  
Fabiana André Falconi  
Sara Cristina Sagae Schneider  
Rodrigo Hinojosa Valdez  
Leanna Camila Macarini

**DOI 10.22533/at.ed.58319270526**

<b>CAPÍTULO 27</b> .....	<b>309</b>
ELEIÇÃO DE SISTEMAS MICROEMULSIONADOS PARA INCORPORAÇÃO DE CAFEÍNA PARA TRATAMENTO DE LIPODISTROFIA GINÓIDE	
Julia Vila Verde Brunelli Maria Virgínia Scarpa Flavia Lima Ribeiro Maccari Tayara Luísa Paranhos de Oliveira Ribeiro de Almeida	
<b>DOI 10.22533/at.ed.58319270527</b>	
<b>CAPÍTULO 28</b> .....	<b>316</b>
ESTATÍSTICA PARAMÉTRICA E NÃO PARAMÉTRICA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA FERMENTAÇÃO DO CAFÉ	
Deusélio Bassini Fioresi Wilton Soares Cardoso Weliton Barbosa de Aquino Luzia Elias Ferreira Vinícius Serafim Coelho	
<b>DOI 10.22533/at.ed.58319270528</b>	
<b>CAPÍTULO 29</b> .....	<b>326</b>
ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SUGARCANE BAGASSE PRE-TREATED BY ALKALINE SOLUTION IN FLUIDIZED BED REACTOR	
Felipe A. F. Antunes Guilherme F. D. Peres Thaís. S. S. Milessi Letícia E. S. Ayabe Júlio C. dos Santos Silvio S. da Silva	
<b>DOI 10.22533/at.ed.58319270529</b>	
<b>CAPÍTULO 30</b> .....	<b>331</b>
ESTUDO DESCRITIVO SOBRE O USO DE FOLHAS DA BATATA-DOCE E POTENCIAL PARA REDUÇÃO DE EFEITOS OXIDATIVOS	
Thaís Cristina Coelho de Ornelas Salazar Roberta Cattaneo Horn Rodrigo Fernando dos Santos Salazar Diego Pascoal Golle Jana Koefender Andreia Quatrin Carolina Peraça Pereira Regis	
<b>DOI 10.22533/at.ed.58319270530</b>	
<b>CAPÍTULO 31</b> .....	<b>339</b>
FITOTOXICIDADE INDUZIDA PELA CO-EXPOSIÇÃO A NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO E ARSÊNIO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE CRESPA ( <i>L. sativa</i> var. <i>crispa</i> )	
Flávio Manoel Rodrigues Da Silva Júnior Eduarda De Moura Garcia Rodrigo De Lima Brum Silvana Manske Nunes Mariana Vieira Coronas Juliane Ventura Lima	
<b>DOI 10.22533/at.ed.58319270531</b>	

<b>CAPÍTULO 32</b> .....	<b>345</b>
FOTOBIOREATOR DE MICROALGAS PARA O TRATAMENTO DE EMISSÕES GASOSAS UTILIZANDO MATERIAIS ALTERNATIVOS	
Ana Beatriz Medeiros Dantas	
Luana Valezi	
Vitória Luciana de Souza	
Roberto Shiniti Fujii	
<b>DOI 10.22533/at.ed.58319270532</b>	
<b>CAPÍTULO 33</b> .....	<b>355</b>
HIDRÓLISE ENANTIOSSELETIVA DE $\alpha$ - E $\beta$ -BUTIRILOXIFOSFONATOS MEDIADAS POR LIPASE DE CANDIDA RUGOSA	
Lucidio Cristovão Fardelone	
José Augusto Rosário Rodrigues	
Paulo José Samenho Moran	
<b>DOI 10.22533/at.ed.58319270533</b>	
<b>CAPÍTULO 34</b> .....	<b>365</b>
IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS NOS EXTRATOS DAS CASCAS E AMÊNDOAS DO TUCUMÃ POR MEIO DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO POR BIOFILMES COM <i>C. ALBICANS</i>	
Luis Fhernando Mendonça da Silva	
Ana Cláudia Rodrigues de Melo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.58319270534</b>	
<b>CAPÍTULO 35</b> .....	<b>376</b>
INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE TANASE POR FUNGO ISOLADO DE CACAU NO SUL DA BAHIA	
Priscilla Macedo Lima Andrade	
Julyana Stoffel Britto	
Camila Oliveira Bezerra	
Ana Paula Trovatti Uetanabaro	
Andrea Miura da Costa	
<b>DOI 10.22533/at.ed.58319270535</b>	
<b>SOBRE O ORGANIZADOR</b> .....	<b>381</b>

## BIORREPOSITÓRIO DE SALIVA EM ESTUDOS GENÉTICO-MOLECULARES: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA APÓS LONGOS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO

### **Natália Ramos**

Universidade Estadual Paulista- Júlio de Mesquita Filho.  
Bauru- SP

### **Thais Francini Garbieri**

Universidade de São Paulo- Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB-USP.  
Bauru- SP

### **Thiago José Dionísio**

Universidade de São Paulo- Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB-USP.  
Bauru- SP

### **Carlos Ferreira dos Santos**

Universidade de São Paulo- Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB-USP.  
Bauru- SP

### **Lucimara Teixeira das Neves**

Universidade de São Paulo- Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB-USP.  
Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais HRAC-USP.  
Bauru- SP

**RESUMO:** No campo das análises genéticas e moleculares é de fundamental importância o uso de materiais biológicos eficazes no que tange a qualidade dos resultados. No caso do DNA, dentre os materiais biológicos nos quais é possível isolá-lo para estudos, o sangue é, até então, o mais utilizado, porém sua coleta é

invasiva e necessita de pessoal especializado para o procedimento. Nesse contexto, a saliva vem ganhando reconhecimento como uma fonte alternativa para o isolamento de DNA, pois além do método de coleta não ser invasivo, sendo tolerado pela maioria dos indivíduos, apresenta também menor o risco de contaminação. As amostras de saliva, diferente do sangue, podem ser congeladas por longos períodos, possibilitando a implementação de biorrepositório com a finalidade de pesquisa na área de genética. Portanto, o intuito deste estudo foi analisar a qualidade e quantidade de DNA extraído a partir de amostras de saliva total armazenada por congelamento pelo período de 2 e 6 anos, utilizando dois protocolos de extração. Após a extração, o DNA genômico foi submetido à análise espectrofotométrica e genotipagem do polimorfismo rs12532, do gene *MSX1*, a fim de, verificar a influência do congelamento das amostras de saliva a  $-20^{\circ}\text{C}$  e do protocolo de extração utilizado nos experimentos de genotipagem por PCR Real Time.

Os resultados encontrados possibilitam inferir que a concentração e qualidade do DNA analisado foram viáveis para estudos de genotipagem.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biorrepositório, Saliva, DNA e PCR.

**ABSTRACT:** In the field of genetic and molecular analyzes it is of fundamental importance the use of biological materials effective in what concerns the quality of the results. In the case of DNA, among the biological materials in which it is possible to isolate it for studies, blood is the most used up until now, but its collection is invasive and requires specialized personnel for the procedure. In this context, saliva has been gaining recognition as an alternative source for DNA isolation, since besides the non-invasive collection method, being tolerated by the majority of individuals, it also presents a lower risk of contamination. Samples of saliva, other than blood, can be frozen for long periods, allowing the implementation of a biorepository for the purpose of genetic research. Therefore, the purpose of this study was to analyze the quality and quantity of DNA extracted from samples of total saliva stored by freezing for the period of 2 and 6 years using two extraction protocols. After extraction, the genomic DNA was subjected to spectrophotometric analysis and genotyping of the rs12532 polymorphism of the MSX1 gene in order to verify the influence of the freezing of the saliva samples at -20 ° C and the extraction protocol used in the genotyping experiments by Real Time PCR. The results obtained allow us to infer that the concentration and quality of the analyzed DNA were feasible for genotyping studies.

**KEYWORDS:** Biorepository, Saliva, DNA and PCR.

## 1 | INTRODUÇÃO

Os princípios básicos da biologia celular e molecular tiveram início em 1665, com a construção do primeiro microscópio óptico por Robert Hooke permitindo a visualização de pequenas delimitações que ele nomeou de célula, e descobriu ser um constituinte fundamental dos organismos, responsáveis por exercer funções características como o crescimento e por transmitir informações vitais para a sobrevivência de todas as espécies na reprodução (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; FARAH, 2007).

O material responsável por comandar as funções celulares foi devidamente elucidado em 1953, por James Watson e Francis Crick que divulgaram suas pesquisas sobre a descoberta da estrutura molecular do DNA. A partir de então, foi possível explicar sobre o fundamento da hereditariedade e definir o responsável pela informação gênica que carregamos (SNUSTAD; SIMMONS, 2010; MICKOS et al., 2005).

O desenvolvimento de metodologias para análises moleculares têm sido de grande importância para a genética humana e médica. Essas técnicas visam buscar desde métodos acessíveis para coleta e armazenamento de materiais biológicos que forneçam bons resultados, até métodos de identificação e mapeamento de genes envolvidos com inúmeras patologias, auxiliando no prognóstico e futuros aconselhamentos genéticos (ZAMBUZZI, et al., 2012; KUHLER, et al., 2001; ABRÃO, et al., 2005; YI; HUANG; WU, 2013; PRAMANIK, et al., 2012; PANDESHWAR, et al., 2013). Essas técnicas desenvolvidas são também utilizadas em análises forenses, na qual técnicas testadas foram capazes de identificar indivíduos por meio de pequenas amostras biológicas de DNA coletadas em locais de delitos, por isso a relevância de se testar várias

metodologias e padronizar esses meios para estudos genéticos (CARVALHO, et al., 2009; KHARE, et al., 2014; PANDESHWAR, et al., 2013; PANDESHWAR, et al., 2013).

Um DNA com bom rendimento é essencial para que os resultados dos experimentos moleculares sejam satisfatórios. O sangue periférico é o material biológico mais utilizado nas pesquisas envolvendo análises moleculares investigando a etiologia de patologias, porém para obtenção desse material de partida são necessários profissionais capacitados para a coleta, além de ser um método invasivo, com difícil acesso ao público, como bebês, crianças e idosos (CARVALHO, et al. 2009; KHARE, et al., 2014; NUNES, et al., 2012; YI, HUANG, WU, 2013). Outro ponto a ser destacado, é que o sangue necessariamente deve ser processado para extração do DNA em até uma semana após a coleta. (QUINQUE et al., 2006).

Assim, devido a essas dificuldades, aventou-se a utilização de saliva como fonte alternativa para obtenção de DNA genômico, por meio das células do epitélio bucal, e observou-se ser um material de fácil obtenção, manejo e armazenamento, além de não necessitar de pessoas especializadas para proceder à coleta, não sendo um método invasivo, o que minimiza também o risco de contaminação. Em vários estudos, o DNA obtido de saliva apresentou pureza e rendimento semelhante aos obtidos a partir de sangue, confirmando a eficiência desse material como fonte de DNA genômico (EHLI et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; WALTRICK - ZAMBUZZI et al., 2012; KHARE, et al., 2014; YI, HUANG, WU, 2013; PANDESHWAR, et al., 2013). Além disso, a saliva contém um grande número de células descamadas do epitélio bucal o que garante a concentração de DNA necessária para as análises moleculares (POLGÁROVÁ; BEHULIAK, CELEC, 2010; QUINQUE, et al., 2006).

As células do epitélio bucal podem ser coletadas de diversas formas, além da saliva total, há coletas por meio de *swabbing*, *cotton swabs*, *foam swabs*, *flocked swabs*, *cytobrushes*, *cotton spit wads*, entre outros meios. Estudos realizados observaram que o meio de coleta pode interferir na quantidade e qualidade do DNA obtido, no entanto, os valores de concentração considerados adequados podem variar dependendo do tipo de técnica de extração que será realizada, portanto, é necessário padronizar essas técnicas de acordo com as análises a serem realizadas posteriormente. (VERDON, et al., 2014; WALTRICK-ZAMBUZZI, et al., 2012; EHLI, et al., 2008).

A técnica de extração de DNA consiste em várias etapas laboratoriais que buscam o isolamento e a purificação do DNA genômico a ser estudado. Os protocolos de extração variam de acordo com o tipo de material biológico de partida utilizado (células animais e vegetais, vírus e bactérias); no entanto, existem etapas básicas e comuns a todos. Inicialmente é necessário que ocorra a ruptura das membranas celulares, sendo que essa lise deve ser realizada de maneira eficiente e de modo que não danifique a estrutura do DNA, a ruptura pode ser realizada utilizando enzimas em combinação com soluções detergentes que solubilizam as membranas e uma substância inibidora de DNase, que evita a degradação do DNA. A próxima etapa é a purificação dos ácidos nucleicos da mistura onde se encontram dispersas moléculas que não serão utilizadas

para análises como o RNA, proteínas, lipídeos, polissacarídeos e que também podem interferir nas fases seguintes (FARAH, 2007; PANDESHWAR, et al., 2013).

A concentração e a pureza do DNA extraído são geralmente determinadas pela espectrofotometria com leitura da absorbância em razão de A260/A280nm, levando-se em conta a proporção de pureza entre 1,6 a 2,0 para um DNA considerado de qualidade.

Várias pesquisas realizadas com DNA genômico a partir de amostras de células bucais presente na saliva, obtiveram resultados satisfatórios com bom rendimento e integridade do DNA (NEVES, L.T., 2009; CARVALHO, S.P.M., et al., 2009; KHARE, et al., 2014) sendo que nesses trabalhos as amostras apresentaram DNA com alto grau de pureza, apontando que o nível de degradação foi baixo, possibilitando a amplificação com as técnicas de PCR e até mesmo o sequenciamento direto de pelo método de Sanger. Nas reações de amplificações também foram observados sucessos com 100% de precisão na determinação de genótipos com a PCR em tempo real (ZAMBUZZI, et al., 2012; NEMODA, et al., 2011; NUNES, et al., 2012; YI, HUANG, WU, 2013). Em muitos estudos em que a saliva foi utilizada como material biológico de partida para a extração de DNA genômico os autores obtiveram resultados compatíveis quando comparados ao sangue (CARVALHO, S.P.M., et al., 2009; NEVES, L.T., 2009; ZAMBUZZI, et al., 2012; KHARE, et al., 2014) Períodos distintos de congelamento também foram avaliados e tiveram poucos efeitos sobre a qualidade do DNA, desde que o material em questão não sofresse repetidos ciclos de congelamento e descongelamento para não alterar a estrutura do DNA (AIDAR; LINE, 2007; KUCHLER et al., 2011; NEMODA et al., 2011; KHARE, et al., 2014; PRAMANIK, et al., 2012; PANDESHWAR, et al., 2013).

Contudo ainda em relação ao DNA extraído vale ressaltar que este pode apresentar maior ou menor grau de rendimento e pureza de acordo com o protocolo de extração utilizado. Desta forma, os protocolos de extração que vem sendo disponibilizados no mercado devem ser testados e selecionados levando-se em conta a qualidade e quantidade de DNA genômico final obtido, para análises moleculares mais específicas, de modo que, esse DNA obtido da saliva possibilite obter resultados precisos, independente do tipo de análise molecular que será utilizada nos estudos genéticos (YI, HUANG, WU, 2013; EHLI, et al., 2008; CARVALHO, et al., 2009; ZAMBUZZI, et al., 2012; AIDAR, et al., 2007).

Pesquisas realizadas anteriormente no laboratório de Genética e Farmacologia da FOB-USP apresentaram resultados satisfatórios com amostras de saliva em diferentes períodos de congelamento para análises moleculares utilizando metodologias como a PCR e o sequenciamento direto (Garbieri et al., 2017). Os dois protocolos de extração utilizados nesse estudo de Garbieri e colaboradores (2017) que apresentaram os melhores resultados foram: o kit Oragene™, onde a partir de saliva fresca observou-se 70% de integridade na eletroforese em gel de agarose, após PCR convencional, e com saliva congelada por 6 e 12 meses observou-se 100% de integridade. O outro protocolo de extração utilizado que apresentou resultados satisfatórios foi o kit QIAamp® Mini



and Blood Mini Handbook da Qiagen®, no qual observou-se 100% de integridade com saliva fresca e congelada por 12 meses e 80% para as amostras de saliva congelada por 6 meses.

Diante do exposto, é possível inferir que DNA de boa qualidade é de fundamental importância para que nas análises moleculares seja possível identificar variantes genéticas. Os estudos genético-moleculares epidemiológicos em larga escala requerem delineamento e implementação de biorrepositórios. Para isto é necessário que as amostras biológicas possam ser conservadas por um período relativamente longo de armazenamento entre o procedimento de coleta e processamento para obtenção do DNA genômico para as análises propostas. Nesse quesito relativo ao armazenamento, deve-se atentar aos períodos de congelamento que as amostras serão submetidas, temperaturas ideais de armazenamento e se haverá interferência caso haja descongelamentos, dados importantes para a implantação de um biorrepositório. Além disso, não basta ter armazenado o material de partida adequadamente, mas também é fundamental elencar quais protocolos de extração DNA a partir de saliva apresentam os melhores resultados após longos períodos de armazenamento por congelamento desse material de partida (PRAMANIK, et al., 2012; PANDESHWAR, et al., 2013).

## 2 | OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a concentração, pureza e integridade do DNA genômico extraído a partir de células do epitélio bucal presentes na saliva total fresca e congelada por período de dois e seis anos, utilizando 2 protocolos de extração de DNA distintos.

### 2.2 Objetivos Específicos

Analisar a viabilidade de utilização dessas amostras de DNA extraídas a partir de saliva após longos períodos de congelamento em análises moleculares para identificação de polimorfismos genéticos (rs12532) no gene *MSX1* por meio de PCR em tempo real.

## 3 | CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 3.1 Casuística

Foi realizada tentativa de contato com 30 indivíduos que apresentavam saliva congelada em biorrepositório referentes a outros estudos em fase de finalização no Laboratório de Farmacologia e Genética da FOB- USP, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dra. Lucimara Teixeira das Neves. Devido à dificuldade de contato, conseguimos ao final

que 17 voluntários participassem do estudo, portanto foram selecionados o máximo de voluntários que apresentavam saliva congelada nos períodos propostos ( 2 e/ou 6 anos).

Eles foram orientados acerca da presente pesquisa, convidados a participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. De todos os voluntários foi coletada também saliva fresca que foi utilizada como parâmetro comparativo. Assim, de cada voluntário de pesquisa foi extraído DNA de saliva fresca e congelada a -20°C por 2 anos (tempo intermediário de armazenamento) ou 6 anos (longo período de armazenamento), ou ambos.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Extração do DNA

Para a coleta da saliva fresca, os voluntários receberam um tubo *falcon* estéril onde foram expectorados 5mL de saliva total não estimulada.

Para a realização das extrações de DNA, foram utilizados dois protocolos (1 e 2), respectivamente de Solução de Acetato e protocolo de Colunas (Kit comercial DNA Purification from Blood or Body Fluids, QIAamp®, Qiagen®). As salivas foram aliquotadas com os devidos volumes necessários para cada um dos protocolos e devidamente identificados. Após as extrações todas as amostras foram submetidas às leituras em espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific).

Segue a descrição completa dos procedimentos de extração de acordo com cada um dos protocolos utilizados:

**Protocolo 1** - Protocolo utilizando a Solução de Acetato de Amônio, baseado no trabalho de Aidar e Line (2007) e descrito abaixo:

Para esse protocolo foi aliquotado 500 µL de saliva descongelada em gelo picado e homogeneizada ressaltando que para esse protocolo 1 são necessários 2 dias, pois a extração é realizada em duas etapas, com intervalo *overnight*.

A saliva total foi centrifugada em um tubo de 1,5mL a 10.000g (ou rcf) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi re-suspensão em 1 mL de tampão de extração [10mM Tris – HCl; pH7, 8; 5mM EDTA; 0,55% SDS]. Foi adicionado 5µL de proteinase K (20 mg/mL) para a degradação das proteínas. Os tubos foram agitados em vórtex e incubados em banho- maria a 56°C *overnight*. Em seguida, foram centrifugados rapidamente (para baixar o líquido da borda). Foi adicionado aos tubos, 500µL de solução de acetato de amônio a 10M os quais foram agitados manualmente por 3 a 5 minutos e centrifugados a 15.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram transferidos 500µL do sobrenadante para um novo tubo, e 540µL de álcool isopropílico gelado foi adicionado em cada tubo que foi agitado em vortex por 15 segundos. As amostras foram mantidas em geladeira por 2 horas e em seguida foram centrifugados a 10.000g (ou rcf) por 20 minutos em temperatura ambiente. O

sobrenadante foi descartado com cuidado para não ressuspender o pellet de DNA, 1 mL de álcool 70% gelado foi adicionado aos tubos que foram centrifugados a 10.000g (ou rcf) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, e os tubos ficaram abertos por 3 a 4 horas para evaporar o excesso de álcool. Após 3 ou 4 horas o DNA foi hidratado em 50µL de água deionizada autoclavada.

**Protocolo 2** - DNA Purification from Blood or Body Fluids (Kit comercial - QIAamp® Mini and Blood Mini Handbook da Qiagen®).

Para esse protocolo que faz uso de colunas, foi alíquotada 200 µl de saliva descongelada em gelo picado e homogeneizada, e foi realizada a extração de DNA de acordo com as instruções do fabricante.

### *3.2.2 Quantificação das Amostras*

Após as extrações foi realizada a leitura da qualidade e concentração do DNA, em espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific). Este equipamento fornece duas medidas importantes que são: qualidade medida em (A260/280nm) e a quantidade em ng/µl. (EHLI et al., 2008; KUCHLER et al., 2011). Foi utilizada a quantidade de 2µl de DNA de cada amostra para essa leitura em espectrofotômetro. Os resultados gerados por este aparelho apresentam um padrão de índices de absorção com a razão A260/280, no qual um DNA considerado de boa qualidade deve estar compreendido entre os valores de 1,6 a 2,0 (RAJ et al., 2014; NEMODA et al., 2011).

### *3.2.3 Análise Molecular*

#### *3.2.3.1 Genotipagem por meio de PCR em tempo real (rs 12532 no gene MSX1)*

Em seguida, o DNA extraído das amostras (frescas e armazenadas por 2 e 6 anos) foi submetido à discriminação alélica da variante polimórfica (rs 12532) no gene MSX1, realizada por PCR Real Time (Equipamento Via 7 pertencente ao laboratório de Farmacologia e Genética do Departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP).

Para a discriminação genotípica do polimorfismo rs12532, no gene MSX1 foram utilizados reagentes para um produto final de PCR de 3µL utilizando o sistema Taqman® e o mix Genotyping Master Mix (Life Technologies®) o qual contém todos os reagentes necessários para a reação (Applied Biosystems, Warrington, UK) seguindo as recomendações e instruções do fabricante (Applied Biosystems). Os experimentos foram realizados em aparelho de PCR em tempo real Via 7 (Life Technologies®, Estados Unidos), utilizando ensaios pré-fabricados e padronizados, produzidos e validados pela empresa Life Technologies®.

Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem para a realização da PCR no equipamento: temperatura inicial de 95°C por 10 minutos para a avaliação da taq polimerase seguida de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Foram

utilizados controles negativos constituídos para todos os reagentes descritos, contudo sem a presença do DNA.

#### 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 abaixo, estão apresentados todos os resultados dos dois protocolos, para todas as amostras e todos os períodos analisados (6 anos, 2 anos e fresca) referentes à: leitura do espectrofotômetro, e da genotipagem (rs12532 do gene *MSX1*).

Amostras	Parâmetros	Protocolo 1 (6 Anos)	Protocolo 1 (2 Anos)	Protocolo 1 Fresca	Protocolo 2 (6 Anos)	Protocolo 2 (2 Anos)	Protocolo 2 Fresca
I-1	ng/μL	1,90	1,50	7,90	105,50	18,70	8,40
	A260/280	1,22	1,69	1,51	1,87	1,97	1,88
	Genotipagem	+	+	+	+	+	+
I-2	ng/μL	0,70	1,60	9,40	2,00	9,00	31,00
	A260/280	2,11	1,71	1,80	1,30	1,72	1,96
	Genotipagem	+	+	+	+	+	+
I-3	ng/μL	32,30	2,10	2,90	1,70	4,80	53,10
	A260/280	0,90	1,52	1,85	1,63	1,57	1,85
	Genotipagem	-	+	+	+	+	+
I-5	ng/μL	0,90	2,60	174,80	1,70	5,30	2,30
	A260/280	-5,31	2,13	1,80	1,64	1,99	1,88
	Genotipagem	+	+	-	+	+	+
I-6	ng/μL	1,10	0,90	1,30	2,80	3,10	11,80
	A260/280	-1,81	1,14	1,17	1,51	1,91	1,74
	Genotipagem	+	+	+	+	+	+
I-7	ng/μL	2,90	1,10	41,80	1,80	3,70	39,90
	A260/280	1,76	1,96	1,93	1,47	1,65	1,90
	Genotipagem	+	+	+	+	+	+
I-8	ng/μL	4,40	2,00	77,50	2,50	6,30	22,80
	A260/280	1,78	1,15	1,88	2,07	1,78	1,86
	Genotipagem	-	+	+	+	+	+
I-9	ng/μL	3,70	7,20	15,70	1,50	16,80	59,20
	A260/280	1,74	1,84	1,90	2,32	1,95	1,95
	Genotipagem	+	+	-	+	+	+
I-10	ng/μL	1,10	2,20	2,00	2,30	2,80	32,40
	A260/280	0,60	1,66	1,81	1,93	1,59	1,88
	Genotipagem	+	+	+	+	+	+
I-11	ng/μL	1,00	7,90	211,70	1,00	2,00	223,50
	A260/280	0,72	1,70	1,85	3,89	1,78	1,88
	Genotipagem	-	+	-	+	+	+
I-12	ng/μL	2,40	1,80	247,80	2,30	5,30	61,30
	A260/280	1,87	2,17	1,80	1,30	1,94	1,95
	Genotipagem	+	+	+	-	+	+

I-14	ng/ $\mu$ L	1,60	0,70	177,50	2,20	0,50	96,90
	A260/280	1,79	1,41	1,85	1,49	1,34	1,91
	Genotipagem	+	-	+	+	+	+
I-21	ng/ $\mu$ L	2,50	3,30	41,30	0,30	5,40	33,10
	A260/280	1,37	2,00	1,80	0,66	2,12	1,87
	Genotipagem	+	+	+	+	+	+
I-22	ng/ $\mu$ L	1,00	2,40	35,70	1,30	5,80	21,20
	A260/280	1,86	1,19	1,20	1,33	1,57	1,93
	Genotipagem	+	-	+	+	+	+
I-23	ng/ $\mu$ L	1,10	1,40	22,10	2,60	7,20	34,40
	A260/280	1,03	1,48	2,00	1,51	1,78	1,88
	Genotipagem	+	+	+	-	+	+
I-25	ng/ $\mu$ L	10,28	55,10	9,50	2,20	1,88	28,30
	A260/280	1,30	0,98	1,95	1,70	1,91	1,90
	Genotipagem	+	-	+	+	+	+
I-30	ng/ $\mu$ L	1,60	2,60	141,70	2,70	3,60	55,10
	A260/280	1,51	1,66	2,00	1,64	1,46	1,99
	Genotipagem	-	+	+	+	+	+

Tabela 1- Análises de qualidade (A260/280) e quantidade (ng/ $\mu$ L) geradas pela espectrofotometria (ng/ $\mu$ L A260/280), e da genotipagem, positivo para as amostras que apresentaram êxito e negativo para aquelas em que não foi possível estabelecer o genótipo.

Referente à concentração de DNA, a partir dos resultados representados na tabela 1 acima, podemos observar valores de concentração de DNA baixas várias amostras abaixo de 10ng/ $\mu$ L de DNA, em contrapartida a baixa concentração, muitas amostras apresentaram razão A260\280 dentro dos padrões ótimos aceitos e utilizados em vários outros estudos que está entre 1,6 e 2,0. Quinque e colaboradores (2006) verificaram que há uma grande proporção de DNA de microrganismos no DNA extraído de amostras de saliva, portanto, é possível que esse fator juntamente com a baixa concentração de DNA humano obtido possa ter influenciado nos resultados da PCR, fazendo desse método quantitativo direto não específico para DNA humano (QUINQUE et al, 2006; RAJ et al, 2014 ). Em muitos casos observa-se baixa concentração de DNA, verificada pela medida do espectrofotômetro. Mas em grande parte das amostras, foi possível por meio da reação de PCR em tempo real, discriminar o genótipo do polimorfismo em questão. Analisando esses resultados, é possível perceber que as baixas concentrações não determinam a inexistência de DNA ou inviabilidade de utilização na tentativa de genotipagem, independente da concentração.

As figuras de 1 a 3 (abaixo) ilustram resultados individuais obtidos na genotipagem, nas quais, as curvas em verdes são referentes à coloração (VIC) para o alelo ancestral, ou seja, sem a variação (A) e a curva representada pelo azul com coloração (FAM) evidencia o genótipo polimórfico (G). Assim, o gráficos que apresentavam ambas as curvas são referentes a indivíduos heterozigotos (AG) para essa variante (Fig 2). Caso o sujeito apresentasse uma cor somente, coloração verde refere-se ao genótipo homozigoto ancestral (AA) e somente coloração azul é homozigoto polimórfico (GG) (Fig. 1 e 3) (RAFIGHDOOST, H., et al, 2013).

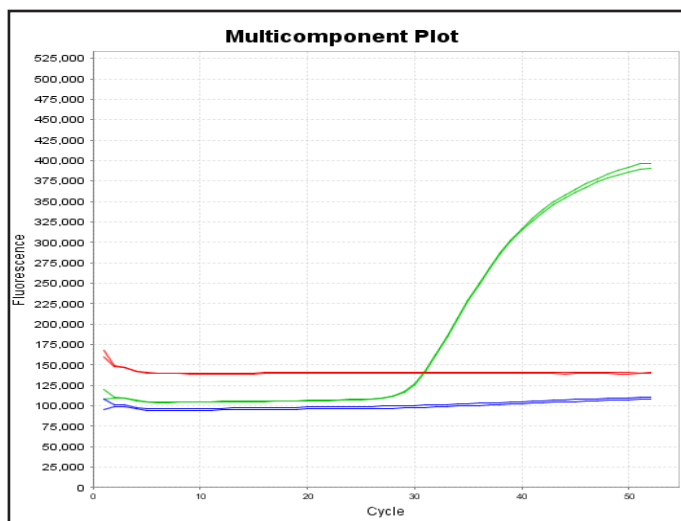


Figura 1 – Gráfico que caracteriza o genótipo ancestral AA (curva corada com VIC - verde).

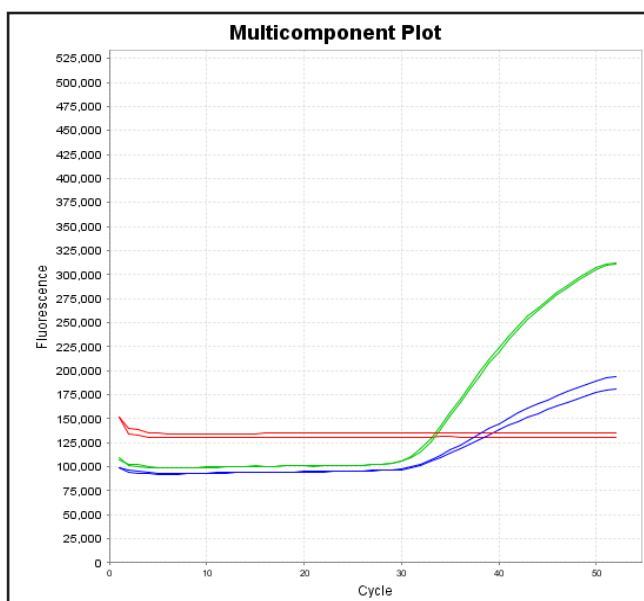


Figura 2 – Gráfico com caracterização alélica de um indivíduo heterozigoto para a variação (AG).

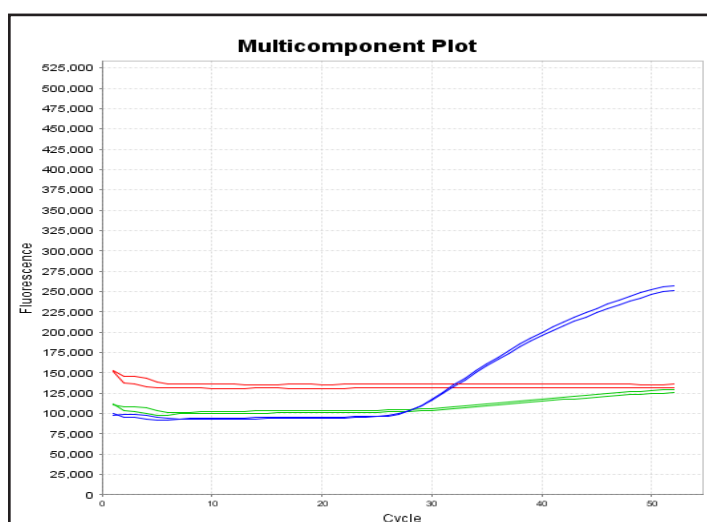


Figura 3 – Gráfico com caracterização de genótipo polimórfico (GG) representado pela curva em azul corado (FAM).

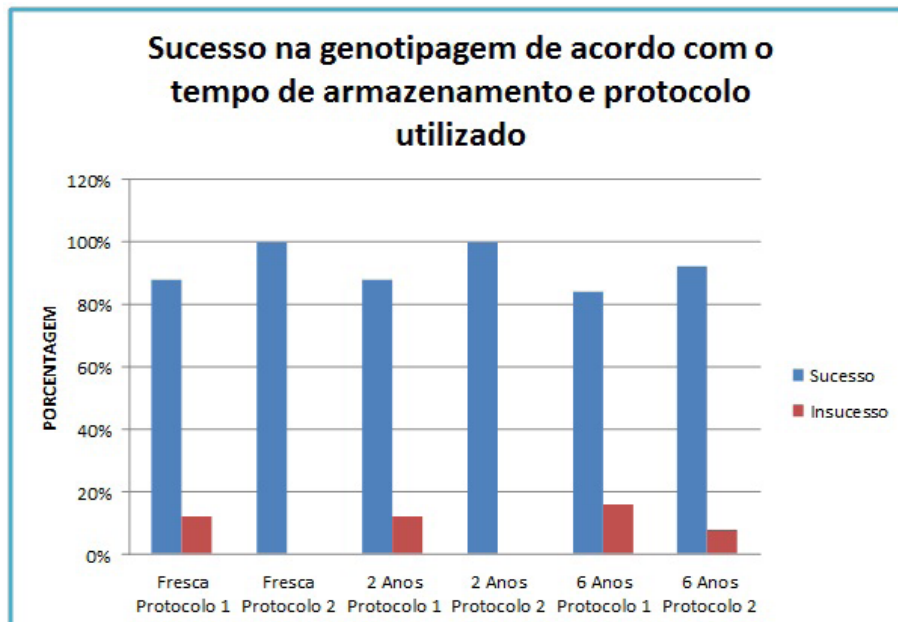


Figura 4. Gráfico de aproveitamento da genotipagem.

A figura 4 apresenta os resultados referentes ao aproveitamento nesse experimento de genotipagem (rs 12532 no gene *MSX1*) por PCR em tempo real para todas as amostras e todos os períodos. Na primeira reação para genotipagem, das 102 amostras testadas, 20 delas não funcionaram. Esta análise foi então realizada novamente com estas 20 amostras e no final somente 6 das 20 não apresentaram bons resultados. O insucesso de algumas amostras ocorreu com a ausência de caracterização de alelos na duplicata realizada no experimento de genotipagem nas duas tentativas realizadas. Apesar do insucesso de algumas amostras de determinados períodos como demonstra a figura 4, foi possível caracterizar os alelos de todos os participantes, pois para cada sujeito foi realizado experimento de genotipagem 6 vezes (para cada um dos dois protocolos e para cada um dos três períodos de armazenamento). Assim, em algumas dessas 6 genotipagens foi possível caracterizar os alelos do voluntário. De acordo com o figura 2, é possível observar que o protocolo 2 utilizado para extração apresentou índice de 100% de aproveitamento em amostras frescas e armazenadas pelo período de 2 anos, o protocolo 1 foi o que apresentou os piores resultados em relação ao aproveitamento, sendo o pior, com saliva armazenada por 6 anos, com 16% de amostras apresentando insucesso.

Provavelmente as altas taxas percentuais de sucesso nas genotipagens possam também ser atribuídas ao sistema Taqman, ensaio muito conhecido e com alto grau de eficiência, que apresenta grande especificidade, o que possibilita que as sondas utilizadas se liguem aos alvos, independente da amostra apresentar alguns contaminantes, como DNA microbiano. Por isso a PCR em tempo real apresenta grandes vantagens e altos percentuais de aproveitamento, próximos de 100%, além de ser um método automático e rápido, ele dispensa a análise de eletroforese em gel de agarose (FARAH,2017). Portanto, mesmo a genotipagem sendo uma análise

molecular mais simples e direta, foi possível verificar que até mesmo um DNA nas condições supracitadas apresentou bons resultados. Ainda assim, especialmente para algumas amostras congeladas por período de 6 anos e utilizando o protocolo 1, não houve sucesso na genotipagem, o que dificilmente ocorre neste tipo de experimento. Diante desse resultado, é possível inferir que provavelmente grande parte do DNA dessas amostras específicas estava realmente muito degradado.

Foi constatados que subseqüentes congelamentos e descongelamentos podem degradar o DNA, uma provável possibilidade, pois as amostras se encontram em congeladores e estes possuem materiais de inúmeros outros projetos, fazendo com que as diferenças de temperatura aconteçam com grande frequência na abertura e fechamento desses refrigeradores. Foi analisado em outras pesquisas que a saliva pode ser armazenada por longos períodos de tempo sem ter influência no rendimento do DNA e nem na qualidade da genotipagem, mas para isso deve-se atentar a estes critérios de manipulação e armazenamento, e esse é mais um motivo para que no planejamento de um projeto que requeira biorrepositório, seja previsto que os materiais biológicos devam ficar isolados e somente retirados para uso (AIDAR; LINE, 2007; CARVALHO et al, 2009;QUINQUE et al, 2006).

Uma sugestão de logística ideal para pesquisas futuras na área de Genética envolvendo Biologia Molecular seria realizar a extração de DNA a partir de saliva fresca, como material biológico de partida para experimentação. Nessa linha poderia ser estabelecido um biorrepositório de macromoléculas (DNA) e outro concomitante com a saliva total para armazenamento. Desta forma, poderiam ser evitadas possíveis interferências de proteínas e enzimas presentes na saliva que poderiam agir no material durante o processo e tempo de armazenamento e os desequilíbrios decorrentes de ciclos de congelamento e descongelamento para uso do material, levando assim a resultados variados de integridade do DNA (NEMODA et al, 2011).

## 5 | CONCLUSÃO

O uso da saliva armazenada por períodos de 2 e 6 anos, como material biológico para análises moleculares, mostrou-se viável para experimentos de discriminação alélica de polimorfismos genéticos, sendo uma alternativa de fácil obtenção. O protocolo de extração de DNA utilizando colunas mostrou-se superior quando analisados o contexto geral dos dois tempos de armazenamento investigados, quando comparados à saliva fresca. A forma de armazenamento da saliva é uma questão fundamental, visto que o tempo de armazenamento não interfere diretamente na qualidade do DNA desde que não ocorram ciclos de congelamento e descongelamento, possivelmente o principal motivo dos resultados relatados neste estudo. A partir dessa premissa, sugere-se que a saliva seja processada ainda fresca e seja armazenado apenas o DNA genômico extraído. Os experimentos realizados mostraram que as amostras



armazenadas pelo período de 6 anos ainda podem ser viáveis para a realização da PCR em tempo real com a finalidade de caracterização genotípica de polimorfismos, fundamental para avanços na área da genética oral. Contudo, esse tipo de material armazenado e congelado por períodos mais longos provavelmente não apresente os mesmos resultados para técnicas mais sensíveis, como é o caso do sequenciamento, que exige DNA de excelente qualidade para sucesso na obtenção de sequências para as análises.

## AGRADECIMENTOS

A FAPESP, pelo apoio financeiro no processo nº 2014/24416-4.

## REFERÊNCIAS

AIDAR, Marise, LINE, S.R.P. A Simple and Cost-Effective Protocol for DNA Isolation from Buccal Epithelial Cells. Piracicaba- SP, **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, SP, v 18, n 2, p 148-152, 2007.

BRIONES, M. L. C., et al. Relevance of sampling and DNA extraction techniques for the analysis of salivary evidence from bite marks: a case report. **Genetics and Molecular Research**, Mexico, v. 14, n. 3, p. 10165-10171, ago 2015.

EHLI, E. A., et al. Using a commercially available DNA extraction kit to obtain high quality human genomic DNA suitable for PCR and genotyping from 11-year-old saliva saturated cotton spit wads. USA, **BioMedCentral Research Note**, Londres, v. 1, n. 22, p. 133, dez. 2008.

GARBIERI, T. F.; et al. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. **Journal Applied Oral Science**, Bauru SP, v. 25, n 2, p 147-158, 2017.

GOODE, M. R., et al. Collection and Extraction of Saliva DNA for Next Generation Sequencing. **The Research Institute at Nationwide Children's Hospital**, Ohio, p. 1-13, Ago 2015.

KÜCHLER, E. C., et al. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. **Journal of Applied Oral Science**, Niteroi- RJ, v. 20, n. 4, p. 467 - 471, set., 2012.

NEMODA, Zsafia, et al. Assessing genetic polymorphisms using DNA extracted from cells present in saliva samples. Budapest, Hungary, **BMC Medical Research Methodology**, v.11,n.170, p.1-13. dez 2011.

NEVES, L. T. **Triagem de mutação no éxon 3 do gene IRF6 em indivíduos com fissura labiopalatina e agenesia dentária: padronização de protocolo para sequenciamento de DNA genômico a partir de saliva**. 2009. 103 f. Tese (Doutorado, Biologia Oral)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Departamento de ciências biológicas- Bauru-São Paulo. 2009.

PANDESHWAR, Padma, et al. Role of oral fluids in DNA investigations. **Journal of Forensic and Legal Medicine**. Índia, v. 22, p. 45-50. Dec 2013.

QUINQUE, Dominique., et al. Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 353, p. 272-227, mar. 2006.

RAFIGHDOOST, Hooshang., et al. Association Between CDH1 and MSX1 Gene Polymorphisms and the Risk of Nonsyndromic Cleft Lip and/or Cleft Palate in a Southeast Iranian Population, **The Cleft Palate-Craniofacial Journal**, Zahedan, Irã, v. 50, n.05, p.98-104, set 2013.

RAJ, P. K; CHANDRA, Shaleen; AGARWAL, Suraksha. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. Madhya Pradesh, India. **Journal of Forensic Dental Sciences**, India, v. 6 , n. 2 p. 81-85, Ago 2014.

SOLOMON, S. M., et al. Evaluation of DNA Extraction Methods from Saliva as a Source of PCR - Amplifiable Genomic DNA. **Revista de Chimie**, Galati, Romania, v.66, n. 12, p. 2101-2103, 2015.

SUN, Fanyue; REICHENBERGER, E. J. Saliva as a Source of Genomic DNA for Genetic Studies: Review of Current Methods and Applications. **Journal of Oral Health and Dental Management**, USA, v. 13, n. 2, p. 217- 222, jun, 2014.

ZAMBUZZI, M.G.W., et al. Avaliação do rendimento, pureza e integridade do DNA genômico em diferentes protocolos de coleta de células bucais, **International Journal of Dentistry**, Recife-PE, v.11, n. 01,p.12-18, mar 2012.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-358-3



9 788572 473583