

## **Adaptação de um método de extração de DNA a partir de células da mucosa bucal baseado em parâmetros de qualidade**

### **Adaptation of a DNA extraction method from buccal mucosa cells based on quality parameters**

DOI:10.34117/bjdv7n4-093

Recebimento dos originais: 05/03/2021

Aceitação para publicação: 05/04/2021

#### **Mariane Castardo Araujo**

Bióloga, Responsável Técnico, Unicesumar, Universidade Cesumar  
AV. Guedner, 1610, Jd. Aclimação, Maringá-PR

#### **Andressa Dalólio Valente**

Biomédica, Unicesumar, Universidade Cesumar  
AV. Guedner, 1610, Jd. Aclimação, Maringá-PR

#### **Giandra Azolini Fernandes de Souza**

Biomédica, Unicesumar, Universidade Cesumar  
AV. Guedner, 1610, Jd. Aclimação, Maringá-PR

#### **Ana Carolina Soares Avelar**

Acadêmica de Medicina, Unicesumar, Universidade Cesumar  
AV. Guedner, 1610, Jd. Aclimação, Maringá-PR

#### **Clarissa Torresan**

Docente do curso de Medicina, Unicesumar, Universidade Cesumar  
AV. Guedner, 1610, Jd. Aclimação, Maringá-PR

#### **Ana Maria Silveira Machado de Moraes**

Docente do curso de Medicina, Unicesumar, Universidade Cesumar  
AV. Guedner, 1610, Jd. Aclimação, Maringá-PR

#### **Marcela Funaki dos Reis**

Docente do curso de Medicina, Unicesumar, Universidade Cesumar  
AV. Guedner, 1610, Jd. Aclimação, Maringá-PR  
E-mail: marcela.reis@unicesumar.edu.br

### **RESUMO**

Um das técnicas mais utilizadas para a análise de doenças genéticas é a extração de DNA para fins diagnósticos e de pesquisas. E a coleta das células da mucosa bucal por meio de *swab* se mostra um método ideal, pois possui uma abordagem segura, indolor, e eficiente para obtenção de DNA. Assim, o objetivo deste trabalho foi adaptar um método de extração de DNA a partir de células da mucosa bucal baseado em parâmetros de qualidade. Para isso, foi realizada a coleta da mucosa bucal de dez voluntários com *swab* para extração de DNA por meio do protocolo adaptado. Os parâmetros avaliados foram à quantidade, integridade e pureza do DNA obtido. Ainda para avaliar a aplicabilidade da técnica na amplificação de genes foi realizada a reação em cadeia da

polimerase - PCR do gene da  $\beta$ -globina. O método de extração de DNA de células de mucosa bucal adaptado apresentou DNA em quantidade suficiente, integridade e pureza necessária para amplificação em PCR. Os resultados dão um parecer favorável ao uso da técnica em vários aspectos.

**Palavras-chave:** Coleta de amostra, Reação em Cadeia da Polimerase, Swab Bucal.

## ABSTRACT

One of the most used techniques to analyze genetic diseases is the extraction of DNA to diagnosis and researches. And the collect of the buccal mucosa cells by swab shows itself an ideal method, due to its safe, painless and efficient approach to obtain DNA. This way, this work's goal is to adapt a DNA extraction method by buccal mucosa cells based on quality parameters. For that, it was made a collect of buccal mucosa of ten volunteers with swab for DNA extraction by the adapted protocol. The parameters evaluated were about quantity, integrity and purity of the DNA obtained. Still to evaluate the applicability of the technique in genes amplification was made a chain reaction of polymerase – PCR of the gene from  $\beta$ -globine. The adapted DNA extraction method of buccal mucosa cells showed DNA in enough quantities, integrity and purity required to amplify in PCR. The results give a positive feedback of the use of this technique in many aspects.

**Keywords:** Sample collection, Chain Reaction of Polymerase, Swab buccal.

## 1 INTRODUÇÃO

Diferentes amostras podem ser utilizadas para a obtenção de DNA, sendo as mais comuns o cabelo, unhas, esperma, ossos, sangue, tecidos, saliva, cultura celular, urina e culturas de microrganismos (Correa et al., 2020). Entretanto, para o diagnóstico de doenças genéticas e parasitárias a partir da análise do DNA, é necessária a coleta de amostra proveniente do paciente, dentre as quais as comumente utilizadas são o sangue periférico, material de biópsia e células da mucosa bucal.

Certos métodos de coleta são invasivos e apresenta variada dificuldade para pacientes como crianças, idosos, obesos, diabéticos e indivíduos síndrômicos. Ao lidar com esses pacientes, é imprescindível a utilização de um método de coleta de amostra que permita uma extração de DNA de rápida execução e de grande precisão, mas que, ao mesmo tempo, evite expor o paciente a riscos e desconfortos desnecessários.

Geralmente, os pacientes síndrômicos e crianças possuem dificuldade em se manter imóveis para a realização de procedimentos invasivos, além disso, pacientes idosos e obesos possuem difícil acesso venoso pela variação anatômica e nestes casos a coleta pode causar dor, ansiedade e estresse limitando a realização do procedimento de maneira adequada (Negri et al., 2012).

Como alternativa aos métodos invasivos de coleta de amostra tem se a coleta de células da mucosa bucal, geralmente obtida por raspagem das células epiteliais dessa região utilizando o *swab* bucal. Esse tipo de coleta diminui os perigos operacionais presentes em um procedimento invasivo, tanto para o paciente como para o profissional da saúde, além de dispensar procedimentos para a coleta, acondicionamento e transporte da amostra que são exigidos em, por exemplo, amostras de sangue.

Segundo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial-SBPC/ML (2010) para a coleta de sangue se faz necessária à presença de um ambiente físico organizado de forma apropriada, com equipamentos e acessórios que garantem a segurança e conforto do paciente. A SBPC/ML (2018) também reforça a importância da utilização de materiais e condições de transporte adequadas de forma que a amostra não sofra variação de temperatura e no tempo até processamento.

Assim, a coleta de amostra de células da mucosa por meio de uso de *swab* bucal torna-se um método ideal para estes casos, se tratando de uma abordagem mais segura, indolor, simples e eficiente, visto que tem se mostrado um método excelente para obtenção de DNA de elevado peso molecular (Lima & Medeiros, 2015). Em contrapartida, um grande número de protocolos de extração de DNA é voltado para a aplicação em sangue, sendo necessária a adaptação para execução em células da mucosa bucal.

A adaptação de um método a extração de DNA geralmente envolve uma série de passos e reagentes utilizados que devem ser cuidadosamente escolhidos e suas concentrações precisamente determinadas a fim de simplificar o procedimento, com ganho de tempo e ao mesmo tempo garantir uma amostra de DNA em quantidade suficiente com pureza e integridade para análises posteriores (Barea et al., 2004).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi adaptar um método de extração de DNA a partir de células da mucosa bucal baseado em parâmetros de qualidade.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram convidados 10 voluntários que concordaram na doação das amostras de células da mucosa bucal e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Cesumar – Unicesumar, Maringá – PR pelo registro 3.076.481 em 12 de dezembro de 2018).

Os procedimentos foram realizados no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Cesumar – Unicesumar, Maringá-PR.

Os voluntários foram orientados a realizar enxágue bucal com 10mL de água destilada (Abrão et al., 2005). Em seguida foi feita a coleta de células epiteliais da mucosa bucal com auxílio de dois *swabs* (duplicata) friccionando delicadamente a parte interna da bochecha com 10 movimentos verticais repetitivos na parede anterior direita e esquerda a fim de evitar qualquer reação vagal do paciente. Em seguida, a ponta dos *swabs* foi cortada dentro de microtubos de 1,5mL contendo 500 $\mu$ L de tampão TE (0,1M Tris-HCl; 0,04M EDTA). As amostras foram acondicionadas em temperatura ambiente e encaminhadas para o laboratório onde os microtubos foram agitados vigorosamente em vórtex por um minuto.

Para a adaptação do método de extração de DNA foi utilizada a metodologia proposta por Abrão et al. (2005) com modificações. Com o auxílio de pinça esterilizada a ponta do *swab* foi removida e descartada, as células foram centrifugadas por 1 minuto a 10.000 RPM e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 20 $\mu$ L de proteinase K (20 mg/mL), 250 $\mu$ L de água ultrapura e 50 $\mu$ L de SDS a 10%, e realizado homogeneização manualmente por inversão seguida de incubação à 56°C por 15 minutos havendo pausas para homogeneização rápida a cada 5 minutos. Em seguida houve resfriamento por 5 minutos em banho gelo e adicionados 120 $\mu$ L de NaCl (5M), realizada homogeneização e centrifugação por 10 minutos a 13.600 RPM. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e o DNA precipitado com 1mL de etanol absoluto gelado. Esses microtubos foram centrifugados a 13.600 RPM por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 500 $\mu$ L de etanol 70% também gelado e o pellet dissolvido por agitação manual. O material foi centrifugado por 5 minutos a 13.600 RPM. Esta etapa foi repetida e, após descarte do sobrenadante, os resíduos do álcool foram evaporados por exposição do microtubo ao ambiente. Ao final foram adicionados 50 $\mu$ L de tampão TE e o DNA congelado para análises posteriores.

Para comparar o método de extração de DNA obtido, as amostras também passaram pelo método de extração de DNA, mas utilizando o kit comercial para extração em coluna de sílica (MEBEP Bioscience).

Para avaliar a qualidade do método de extração de DNA foram utilizados os parâmetros de quantidade de DNA, pureza e integridade por método indireto de visualização em gel de agarose e amplificação pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.

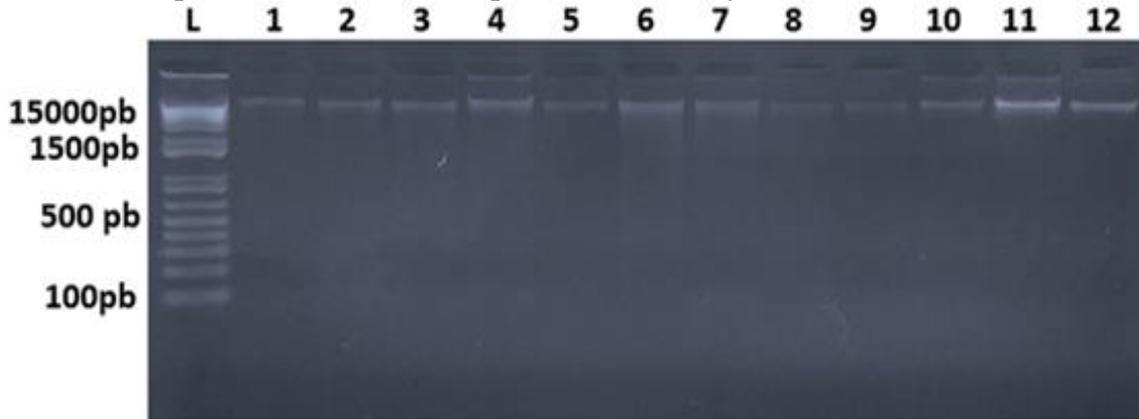
As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% coradas com brometo de etídeo (0,83µg/mL) e comparadas a um *Ladder* de 1kb (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). A eletroforese foi realizada durante 50 minutos a 100V para uma boa distribuição do *Ladder* e melhor visualização das amostras. Os resultados foram visualizados em Transiluminador Ultravioleta e a imagem obtida registrada em foto.

Na reação de PCR foi amplificado o gene da  $\beta$ -globina (Bell et al., 1993). Foi preparado um Mastermix de 50 µL com Green GoTaq Flexi Buffer 1X, 200uM de mix de dNTPs, 0,5 µM de cada *primer* GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'), 1,25 U de Taq-polimerase (GoTaq, PROMEGA), 5 µL de DNA na diluição de 1:50 em água. A amplificação ocorreu em Termociclador (Nova Instruments) com o programa de ciclagem de desnaturação inicial à 95°C por 2 minutos, mais 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e extensão final à 72°C por 5 minutos. O *amplicon* esperado (262-268pb) foi visualizado em eletroforese em gel de agarose a 3% utilizando um *Ladder* de 100pb (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Os resultados visualizados em Transiluminador Ultravioleta e a imagem obtida registrada em foto.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA é o primeiro passo na análise molecular e permite que laboratórios executem com eficiência os procedimentos de rotina como PCR e sequenciamento. Neste estudo, o método de extração de DNA adaptado, aliado ao uso de células epiteliais da mucosa bucal como amostra, obteve DNA genômico de qualidade de acordo com os parâmetros analisados, como demonstra a eletroforese apresentada na Figura 1.

Figura 1: Eletroforese de DNA genômico de células epiteliais da mucosa bucal.



L: Ladder de 1Kb. 1 a 10: Amostras de DNA extraídas com o método utilizado. 11 e 12: Amostras de DNA extraídas por kit comercial. Fonte: autores.

A pureza do DNA resultante da extração é um pré-requisito para qualquer análise molecular (MARTINS; BARBOSA, 2020) e os resultados do deste estudo permite verificar que não existe presença de RNA ao final da corrida ou possíveis contaminações com proteínas intracelulares. A pureza do DNA obtido nesta extração foi alcançada pelo uso da proteinase K (Santos et al., 2018) e precipitação com NaCl (Abdel-Latif & Osman, 2017). A pureza do DNA é um parâmetro fundamental a ser considerado durante o processo de extração de DNA, pois pode influenciar diretamente em análises posteriores atuando como interferentes de reação (Liao & Liu, 2018). Estes contaminantes que reduzem a pureza do DNA tem origem na contaminação cruzada ou por problemas no protocolo de extração que permitem que proteínas, RNA e outros compostos permaneçam da reação (Liao et al., 2017; Yang et al., 2018).

A contaminação cruzada pode ser evitada com cuidados no uso de reagentes livres de DNA e RNA, manuseio adequado de materiais e equipamentos, além do controle de qualidade relacionado ao local de coleta e manuseio do coletor (Pinto et al., 2016). Já a contaminação com proteínas é evitada pelo uso de reagentes de precipitação como o cloreto de sódio, modulação da temperatura da reação ou aplicação de enzimas degradadoras (Pereira et al., 2019). Nesse estudo, o uso da proteinase K, embora eleve o custo do método, é considerado um reagente eficaz por promover desproteinização de maneira eficaz e uma alternativa segura comparada ao uso de reagentes de elevada toxicidade como tiocianato de guanidina, fenol e clorofórmio (Nascimento et al., 2017; Qamar et al., 2017; Rodriguez et al., 2017).

A observação da ausência de fragmentos de DNA também mostra que o DNA extraído pelo método adaptado não apresenta degradação, ou seja, foi assegurada a

integridade. O parâmetro integridade está relacionado à ausência de degradação no DNA extraído. Na presença de degradação existem riscos relacionados à ausência de amplificação durante a PCR resultando em falsos negativos (Santos et al., 2018). A integridade neste estudo foi controlada também pelo uso da proteinase K e cloreto de sódio como recursos que evitam a ação de nucleases que podem clivar o DNA levando a sua degradação e consequentemente interferências nas análises posteriores (Silva et al., 2013).

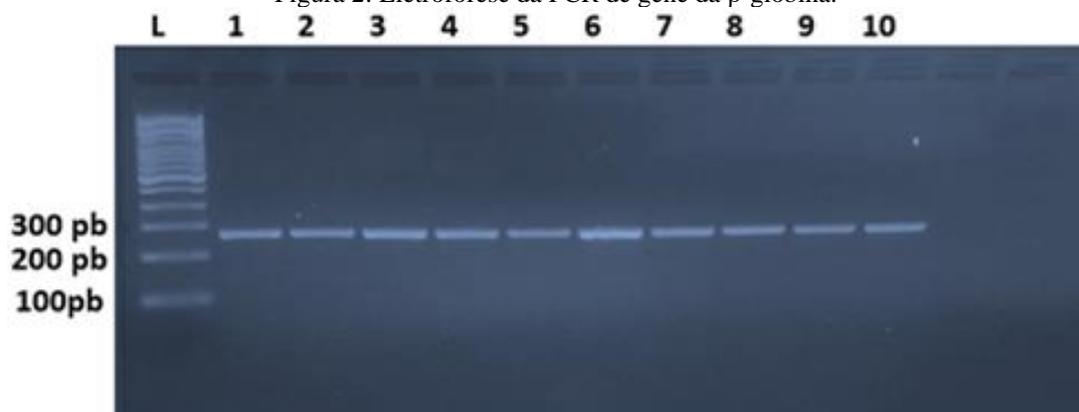
Em relação à quantidade de DNA, o método utilizado obteve quantidade de DNA genômico satisfatória para sua visualização na eletroforese. Embora quando comparada ao kit seja inferior, é suficiente para realização das técnicas de rotina em biologia molecular. Pelo método indireto de comparação visual com o *Ladder* em eletroforese em gel de agarose foi observado que as amostras de DNA extraídas possuem cerca de 80 a 140ng/ $\mu$ L, enquanto as amostras extraídas pelo kit de purificação de DNA possuem cerca de 140ng/ $\mu$ L. Este resultado está dentro do limiar desejado, pois o DNA resultante da extração é utilizado em baixa concentração para evitar, por exemplo, que atue como inibidor da enzima Taq-polimerase (Freitas-Lidani et al., 2019). Nesse sentido, as amostras de DNA são comumente diluídas como apontado por Lucas et al.(2018) que observaram bons resultados de amplificação em reação de PCR com amostras de DNA em concentração entre 50 a 190ng, sendo os melhores resultados obtidos a partir de cerca de 90ng.

É importante ressaltar que pela análise da eletroforese de extração de DNA é possível verificar uma variação na quantidade de DNA por indivíduo. Neste caso, a variação pode estar relacionada à quantidade de células coletadas durante a coleta com *swab*. Bäumer et al. (2018) observaram que a quantidade de células presentes em uma amostra é um fator de interferência na obtenção de DNA. E, de acordo com Piovesan et al. (2019) a quantidade de DNA genômico presente em uma célula humana é de cerca de 3,16 pg, sendo necessário para a execução de uma reação de PCR apenas 2-4ng dependendo da dificuldade de execução do protocolo. Diante dos parâmetros analisados, o método de extração de DNA adaptado se mostra interessante para uso posterior em análises moleculares. Assim, para avaliar a aplicabilidade do DNA extraído quanto à realização da PCR este parâmetro foi avaliado.

A PCR para o gene da  $\beta$ -globina mostrou eficiência de amplificação, utilizando-se apenas 2,5 $\mu$ L de amostra de DNA diluída na proporção 1:50, apresentando uma banda

de 260 pares de base, condizente com o esperado com os *primers* utilizados na reação (Figura 2).

Figura 2: Eletroforese da PCR de gene da  $\beta$ -globina.



L: *Ladder* de 100pb. 1 a 10: Amostras de DNA extraídas com o método adaptado após amplificação.  
Fonte: autores.

Ressalta-se que uma reação de PCR não depende necessariamente de grandes quantidades de DNA genômico, visto que estudos forenses conseguem bons resultados com baixa concentração inicial, como Resende et al. (2016), que aplicaram o procedimento em amostras de até 4,24 ng/ $\mu$ L de DNA que resultaram em ótima amplificação. Além disso, os parâmetros de pureza e integridade da amostra de DNA devem ser levados em consideração também na amplificação (Obradovic et al., 2013).

A relevância na adaptação desta técnica está relacionada à facilidade de coleta, mas também ao transporte destas amostras. A coleta de células da mucosa por meio de *swab* é rápida, fácil e indolor (Cavallari et al., 2017). Além disso, é uma coleta que possui menos exigências em relação à estrutura do local da coleta, podendo ser realizada em locais com menor acesso a condições laboratoriais como o domicílio, e em seguida transportadas para o local onde será realizada a extração sem comprometer a qualidade da amostra. Isso é uma vantagem em comparação à coleta de sangue venoso ou arterial, que possui restrições a fim de evitar os riscos inerentes a esse tipo de coleta e requisitos mais específicos e controlados para a conservação e transporte da amostra (SBPC/ML, 2010; 2018).

O processo de obtenção de DNA envolve procedimentos complexos, que podem combinar diferentes metodologias, propriedades e origens. Para a biologia molecular, este processo é de extrema importância, uma vez que a aplicabilidade do DNA extraído e purificado é variada, podendo ser utilizado para a ciência forense, para a medicina

diagnóstica, estudos sobre doenças e processos metabólicos (Al Balawi et al., 2019; Martinez et al., 2018).

As pesquisas e inovações tecnológicas em biologia molecular possibilitaram inúmeras técnicas e métodos para a realização da extração do DNA para fins de pesquisa e, mais recentemente, aplicação no diagnóstico de doenças (Nedel et al., 2009). As etapas de extração e purificação do material genético são o ponto de partida para a aplicação dessas técnicas, tendo em vista que métodos insuficientes de obtenção de DNA podem ser responsáveis por comprometer o desempenho de algumas dessas tecnologias (Bouso & Planet, 2019).

Os resultados do método adaptado dão um parecer favorável ao seu uso para diversos fins diagnósticos e de investigação genética, uma vez que permitem uma extração de DNA rápida e eficiente e têm como produto um material que pode ser aplicado à PCR.

#### **4 CONCLUSÃO**

O presente estudo realizou a adaptação de um método de extração de DNA a partir de células da mucosa bucal.

A metodologia adaptada permitiu uma extração satisfatória, de concentração compatível àquela extraída com kit comercial. Esse procedimento pode auxiliar na escolha de métodos de extração de DNA pré-ensaios de PCR para fins de pesquisa e diagnóstico.

O DNA obtido por este método pode ser aplicado em reação de PCR, o que significa que pode ser utilizado por laboratórios de biologia molecular na obtenção de diagnósticos genéticos por PCR, além de diversas outras aplicações.

#### **AGRADECIMENTOS**

À Diretoria de Pesquisa da Unicesumar, que incentivou o projeto por meio de bolsas de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS

Abdel-Latif, A. & G. Osman. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*. 13(1):9. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>

Abrão, M. G., A. Ebillerbeck, M. Y. Nishi, S. Marui & B.B.Mendonça. 2005. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação em estudo do gene PROP1. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 49(6): 978-982. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302005000600019>

Al Balawi, A. N., N. A. Yusof, S. Kamaruzaman, F. Mohammad, H. Wasoh, K. F. A. Abbosh & H.A.Al-Lohedan. 2019. Synthesis, Characterization, and Application of Poly (4,4\*-Cyclohexylidene Bisphenol Oxalate) for Solid-Phase Extraction of DNA. *BioMed Res. Int.* 2019:12. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/7064073>

Barea, J. A., M. I. M. C. Pardini & T. Gushiken. 2004. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 26(4): 274-281. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842004000400008>

Martins, S.S.O; Barbosa, A.M. Metodologia de coleta e extração de DNA da Acariquara-Branca (*Geissospermum urceolatum* a.h. Gentry, 1984), no município de Manacapuru, km 60 – comunidade Nova Esperança, *Brazilian Journal of Development*, 6(9):69130-69141, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n9-383.

Baumer, C., E. Fisch, H. Wedler, F. Reinecke & C. Korfage. 2018. Exploring DNA quality of single cells for genome analysis with simultaneous whole-genome amplification. *Sci. Rep.* 8(7476): 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25895-7>

Bell, D. A., J. A. Taylor, D. F. Paulson, C. N. Robertson, J. L. Mohler & G. W. Lucier. 1993. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85(14): 1159-1164. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/85.14.1159>

Bouso, J. M. & P. J. Planet. 2019. Complete nontuberculous mycobacteria whole genomes using an optimized DNA extraction protocol for long-read sequencing. *BMC Genomics*. 20(793): 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6134-y>

Cavallari, T., L. Y. Arima, S. T. Moysés, S. J. Moysés & R. I. Werneck. 2017. Assessment of the quantity and purity of DNA obtained from buccal cells under different storage methods. *Arq. Odontol.* 53(e17): 7-10. Disponível em: <<https://periodicos.ufmg.br/index.php/arquiosemodontologia/article/view/3735>> Acesso em 30 abr. 2020.

Correa, H. S. D., V. Cortellini, G. Brescia & A. Verzeletti. 2020. Human Identification Through DNA analysis of restored postmortem teeth. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 47(102302): 102-302. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1872497320300752>>. Acesso em 30 abr. 2020.

Freitas-Lidani, K. C., D. S. Ferreira, H. M. F. Madeira & J. E. Gabriel. 2019. Menores Concentrações de Fitas Moldes de DNA Genômico Extraídas a Partir de Microbiota Ruminal Aumentam a Eficiência das Amplificações In Vitro. *Rev. Vis. Acad.* 20: 83-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v20i1.64240>

Liao, J. & Liu, Y. 2018. Purification procedures meaningfully influence DNA quantification in milk LWT. *Food Sci. Technol.* 94(1): 8-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.031>

Liao, J., Y. F. Liu, T. Ku, M. H. Liu & Y. Huang. 2017. Qualitative and quantitative identification of adulteration of milk powder using DNA extracted with a novel method. *J. Dairy Sci.* 100(3): 1657-1663. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11900>

Lima, H. L. O. & U. V. Medeiros. 2015. Aplicabilidade do DNA em Odontologia Forense. *Odontol. Clín.-Cient. (Online)*. 144 (4): 801-808. Disponível em: <<http://revodonto.bvsalud.org/pdf/occ/v14n4/a05v14n4.pdf>>. Acesso em 27 abr. 2020.

Lucas, M. S., C. S. Carvalho, G. B. Hypolito & M. C. Côrtes. 2018. Optimized protocol to isolate high quality genomic DNA from different tissues of a palm species. *Hoehnea*. 46(2): e942018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-94/2018>

Martinez, G. G., A. L. F. Santos, C. Q. P. Oliveira & T. I. Moraes, 2018. Estocagem de DNA a temperaturas variadas: análise da concentração. *Rev. Saúde Foco.* (10): 42-50. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/71446554-Estocagem-de-dna-a-temperaturas-variadas-analise-da-concentracao.html>>. Acesso em 25 abr. 2020.

Nascimento, A. L. S., A. J. Sá, A. S. Ledo & A. V. C. Silva. 2017. Extração de DNA em Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Nucleus*. 14(2): 97-106. DOI: <http://dx.doi.org/10.3738/1982.2278.2727>

Nedel, F., D. A. André, I. O. Oliveira, S. B. C. Tarquinio & F. F. Demarco. 2009. Buccal cells submitted to three different storage conditions before DNA extraction. *J. Appl. Oral. Sci.* 17(2): 113-115. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-77572009000200008>

Negri, D. C., A. F. M. Avelar, S. Andreoni & M. L. Pedreira, G. 2012. Factores predisponentes para fracaso de la punción intravenosa periférica en niños. *Rev. Latino-Am. Enfer.* 20(6): 1072-1080. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-11692012000600009>

Obradovic, J., V. Jurisic, N. Tomic, J. Mrdjanovic, B. Perin, S. Pavlovic & N. Djordjevic. 2013. Optimization of PCR Conditions for Amplification of GC-Rich EGFR Promoter Sequence. *J. Clin. Lab. Anal.* 27(6):487-493. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.21632>

Pereira, J. B., W. L. B. Júnior, E. D. DA Silva, A. E. C. A. de Aquino, P. M. S. de Oliveira & F. L. de Melo. 2019. Comparação de técnicas de extração de DNA de *Treponema Pallidum* para o diagnóstico molecular da sífilis. *Braz. J. Hea. Rev.* 2(4): 3681-3697. DOI: <https://doi.org/10.34119/bjhrv2n4-131>

Pinto, L. B., I. G. C. Caputo & M. M. I. Pereira. 2016. Importância do DNA em Investigações Forenses: Análise de DNA Mitocondrial. Braz. J. Forensic Sci. 6(1): 84-107. DOI: [http://dx.doi.org/10.17063/bjfs6\(1\)y201684](http://dx.doi.org/10.17063/bjfs6(1)y201684)

Piovesan, A., M. C. Pelleri, F. Antonaros, P. Strippoli, M. Caracausi & L. Vitale. 2019. On the length, weight and GC content of the human genome. BMC Res. Notes. 2019: 12-106. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4137-z>

Qamar, W., M. R. Khan & A. Arafah. 2017. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. Saudi J. Biol. Sci. 24(7): 1465-1469. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.09.016>

Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso. 2010. 2ed. Barueri, SP: Manole. Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320090814145042.pdf>>. Acesso em 18 abr. 2020.

Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Fatores Pré-Analíticos e Interferentes em Ensaios Laboratoriais. 2018. 1ed. Barueri, SP: Manole. Disponível em: <[https://controllab.com/pdf/livro\\_sbpc\\_interferentes\\_2018.pdf](https://controllab.com/pdf/livro_sbpc_interferentes_2018.pdf)>. Acesso em 18 abr. 2020.

Resende, R. V., B. C. R. Cunha, C. B. Q. S. Leal, V. A. Saddi & R. S. S. Barcelos. 2016. Extração de DNA de Impressões Digitais Latentes Depositadas em Diferentes Suportes e Reveladas com Spray de Ninidrina e Pó Preto Volcano "HI-FI". Braz. J. Forensic Sci. 5(4): 410-430. DOI: [http://dx.doi.org/10.17063/bjfs5\(4\)y2016410](http://dx.doi.org/10.17063/bjfs5(4)y2016410)

Rodriguez, J. J. R. B., G. C. Calacall, R. P. Laude & M. C. A. de Ungria. 2017. Non-differential DNA extraction of post-coital samples submitted as evidence for investigating sexual assault cases in the Philippines. Philipp. Sci. Lett. 10(1): 14-21. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/315669956>>. Acesso em 18 abr. 2020.

Santos, A. L. F., C. Q. P. Oliveira, G. N. P. N. Arruda & J. K. Martins. 2018. Comparison of DNA extraction using proteinase K and extraction kit: analysis of the quality of the genetic material. J. Bras. Patol. Med. Lab. 54(2). DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/16762444.20180013>

Silva, L. E., D. B. S. Silva, B. A. Crispim, J. O. Vaini, A. B. Grisolia & L. O. Seno. 2013. Variação de concentração de proteinase K em protocolos de extração de DNA de bovino. Arch. Vet. Sci. 18(2): 15-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v18i2.26151>

Yang, Y., K. Zahr, M. W. Harding, S. E. Strelkov, K. Zuzak, D. Feindel & J. Feng. 2018. Alkaline treatment of resting spores prior to DNA extraction improves the purity of *Plasmodiophora brassicae* DNA. J. microbiol. methods. 149: 120-122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.05.011>