

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO
EM AMOSTRAS FOLIARES DE *Nectandra
megapotamica* (Spreng.) Mez. (Lauraceae)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Leonardo Severo da Costa

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

**ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO
EM AMOSTRAS FOLIARES DE *Nectandra megapotamica*
(Spreng.) Mez. (Lauraceae)**

Leonardo Severo da Costa

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Florestal.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Severo da Costa, Leonardo
ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO EM AMOSTRAS FOLIARES DE
Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez. (Lauraceae) /
Leonardo Severo da Costa.-2014.
96 p.; 30cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger
Coorientadora: Valdir Marcos Stefenon
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2014

1. Canela-preta 2. CTAB 3. SDS 4. Metabólitos
secundários 5. Polissacarídeos I. Rejane Silveira
Reiniger, Lia II. Marcos Stefenon, Valdir III. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Leonardo Severo da Costa. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: leonardosev@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO
EM AMOSTRAS FOLIARES DE *Nectandra
megapotamica* (Spreng.) Mez. (Lauraceae)**

elaborada por
Leonardo Severo da Costa

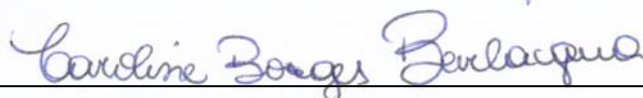
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Valdir Marcos Stefenon, Dr. (UNIPAMPA)



Caroline Borges Bevilacqua, Dr^a (Embrapa)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2014.

“O sofrimento é passageiro, desistir é para sempre.”

Lance Armstrong

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã pelo amor incondicional, pelo incentivo e pela compreensão nos momentos em que não pude estar com eles.

A Caroline Weimann, pelo amor, compreensão, paciência e ajuda em todos os momentos, principalmente nos últimos meses.

A minha orientadora, professora Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, pela grande oportunidade de realização deste trabalho, por todo conhecimento, tempo e carinho a mim dedicados. Pelo esforço diário para atender as aspirações minhas e de meus colegas, para que atingíssemos nossos objetivos. Obrigado pela confiança.

Ao meu coorientador, professor Dr. Valdir Marcos Stefenon, que me acompanha desde a graduação, por todo o conhecimento e tempo a mim dedicados, e principalmente pela amizade.

Aos colegas Aline Ferreira Paim, Aline Ritter Curti e Enrique Asterio Benitez León, pela ajuda e conhecimento transmitido, disposição e colaboração na execução do meu trabalho. Muito obrigado.

Ao amigo e colega Adriel Oliveira, por toda ajuda e dedicação, mas acima de tudo, pela amizade construída nesses tempo de trabalho.

Aos colegas de Laboratório, Carla Moro, Charlene Stefanel, Clarissa Gomes, Jaqueline Ottonelli, Karol Buron, Silvia Machado, pela ajuda, convivência e amizade.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pelas oportunidades e formação.

A todos que torceram e acreditaram em mim e que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Muito obrigado!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO EM AMOSTRAS FOLIARES DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. (Lauraceae)

AUTOR: LEONARDO SEVERO DA COSTA

ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2014.

Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez é uma espécie florestal nativa de importância ecológica e farmacológica, devido ao seu grande potencial de produção de fármacos. A seleção de indivíduos geneticamente superiores é uma alternativa viável para alavancar os estudos referentes a esse potencial. No entanto, por se tratar de uma espécie que produz grandes quantidades de metabólitos secundários, o isolamento de DNA genômico em quantidades suficientes e de boa qualidade, é um passo crucial para o desenvolvimento de qualquer técnica de análise direta do ácido desoxirribonucleico. Considerando o exposto, o objetivo geral do presente estudo foi definir um protocolo de extração de DNA, específico para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., capaz de obter amostras de qualidade e quantidade para aplicações posteriores. Foram testadas amostras foliares secas à temperatura ambiente, secas em estufa à 40 °C e secas em forno micro-ondas, além de quatro protocolos de extração de DNA (Dellaporta, Ferreira e Grattapaglia, Khanuja e Mazza e Bittencourt). Foram avaliadas as razões A260/A230, A260/A280, a concentração de DNA obtida, a integridade do DNA, a funcionalidade do DNA via digestão pela enzima *Hind* III e a correlação entre a curva de absorvância esperada para uma amostra de DNA e a curva observada. Para os tipos de amostras foliares, foi verificado que é possível extrair DNA dos três tipos de amostras foliares. Porém, apenas as amostras secas em temperatura ambiente apresentaram resultados para qualidade e quantidade dentro do esperado. Na análise dos diferentes protocolos de extração, Mazza e Bittencourt e Ferreira e Grattapaglia apresentaram os melhores resultados para concentração de DNA. No entanto, esses exibiram elevados teores de contaminação, verificado pelo aspecto gelatinoso e coloração castanha ao final do procedimento, comprovando o indicado pelos resultados das razões. A análise da correlação da curva de absorvância para esses dois protocolos, revelou que os picos de absorvância foram em 220 nm e 245 nm, respectivamente, indicando altos teores compostos fenólicos ou polissacarídeos nas amostras. O protocolo Dellaporta apresentou os melhores resultados para as duas razões, uma concentração de DNA intermediária, a maior correlação entre a curva de DNA esperada e a observada, além do DNA extraído ter sido digerido pela enzima *Hind* III, o que não foi verificado para os demais protocolos. Com o intuito de otimizar o protocolo Dellaporta, foram realizados testes com diferentes concentrações de SDS (10, 15, 20 e 25%), PVP (0, 1, 2 e 3%), Acetato de Potássio (2,5; 5; 7,5 e 10 M) e NaCl no tampão de eluição (0; 0,5; 1 e 1,5 M), em que foram avaliadas a concentração de DNA, a razão A260/A280 e A230/A230 e correlação entre as curvas de absorvância. Os testes com NaCl no tampão de eluição e Acetato de Potássio, não resultaram ganhos significativos, indicando os seus respectivos usos conforme o protocolo original. Para SDS, as concentrações de 15 e 25% extraíram a maior quantidade de DNA. Porém, 15% apresentou uma razão A260/A230 abaixo do esperado. Com relação ao PVP, a ausência e a presença na concentração de 1% apresentaram resultados muito próximos, porém, o último apresentou uma maior correlação entre as curvas de absorvância. A análise conjunta de todas as variáveis, indica que o uso de SDS 25% e PVP 1% no protocolo Dellaporta, contribuíram para melhorar a concentração e a qualidade do DNA isolado.

Palavras-chave: Canela-preta. CTAB. SDS. Metabólitos Secundários. Polissacarídeos. Enzimas de Restrição.

ABSTRACT

Master Degree Dissertation
Post-Graduation Course in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

GENOMIC DNA ISOLATION FROM LEAVES SAMPLES OF *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. (Lauraceae)

AUTHOR: LEONARDO SEVERO DA COSTA

ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Date and Place of Defense: Santa Maria, RS, February 28, 2014.

Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez is a native tree species of ecological and pharmacological importance, due to its great potential for the production of drugs. The selection of genetically superior individuals is a feasible alternative to leverage the studies regarding this potential. However, because it is a species that produces large amounts of secondary metabolites, the isolation of genomic DNA in sufficient quantities and of good quality, is crucial step for the development of any technique for direct analysis of deoxyribonucleic acid. Considering the above, the overall objective of this study was to define a protocol for DNA extraction, specific to *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Able to obtain samples of quality and quantity for further applications. The foliar samples dried at room temperature, dried in oven at 40 °C and dried in a microwave oven, plus four DNA extraction protocols were tested (Dellaporta, Ferreira and Grattapaglia, Khanuja e Mazza and Bittencourt). The ratios A260/A230, A260/A280, the concentration of DNA obtained, DNA integrity, functionality DNA via digestion with *Hind* III enzyme and the correlation between the expected absorbance curve for a DNA sample and the observed curve were evaluated. For the types of foliar samples was found that it is possible to extract DNA from both. However, only dried at room temperature samples showed results for quality and quantity as expected. In the analysis of different extraction protocols, Mazza and Bittencourt and Ferreira and Grattapaglia showed the best results for DNA concentration. However, these exhibited high levels of contamination, verified by the gelatinous aspect and brown coloration the end of the procedure, confirming the results indicated by ratios. Correlation analysis of the absorbance curve for these two protocols showed that the absorbance peaks were 220 nm and 245 nm, respectively, indicating high levels of phenolic compounds or polysaccharides in the samples. The Dellaporta protocol, showed the best results for two reasons, one concentration of intermediate DNA, the highest correlation between expected and observed DNA curve. In addition the extracted DNA was digested by the enzyme *Hind* III, which was not observed for other protocols. With the intention to optimize the Dellaporta protocol, tests were performed with different concentrations of SDS (10, 15, 20 and 25%), PVP (0, 1, 2 and 3%), potassium acetate (2,5; 5; 7,5 and 10 M) and NaCl in the elution buffer (0, 0,5; 1 and 1,5 M), wherein the DNA concentration, the A260/A280 and A230/A230 ratio and the correlation between the absorbance curves were evaluated. Tests with NaCl in the elution buffer and Potassium Acetate have not resulted significant gains, indicating their respective use according the original protocol. For SDS, concentrations of 15 and 25% the greatest amount of extracted DNA. However, 15% presented a ratio A260/A230 lower than expected. Regarding PVP, in absence and presence of 1% concentration presented very close results, however, the latter showed greater correlation between the absorbance curves. The combined analysis of all variables, indicated that the use of 25% SDS and 1% PVP in Dellaporta protocol, contributes to improve concentration and quality of isolated DNA.

Keywords: Canela-preta. CTAB. SDS. Secondary metabolites. Polysaccharides. Restriction enzymes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação do mapa do estado do Rio Grande do Sul com áreas de ocorrência de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. indicadas por círculos. Fonte: REITZ et al. (1989). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.23
- Figura 2 – Aspecto das amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., durante os quatro ciclos de secagem em Forno de Micro-ondas na potência máxima. No centro do forno micro-ondas, nos momentos de secagem, foi colocado um béquer contendo 150 mL de água com a finalidade de umedecer o ambiente e evitar a combustão das amostras e possíveis danos ao aparelho. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.32
- Figura 3 – Etapas da análise da qualidade e concentração das soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. em espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop® ND-1000. (A) Descongelamento e mistura da solução; (B) Pipetagem da solução e; (C) Análise da solução pelo 'software'. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....38
- Figura 4 – Aspecto das soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. mediante o emprego dos diferentes protocolos de isolamento testados no presente estudo, independentemente do método de secagem das amostras foliares utilizado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.45
- Figura 5 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas em estufa a 40 °C (S40), obtidas mediante o emprego dos quatro protocolos de isolamento de DNA avaliados. As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e coradas com Gelred®. A letra S é indicativa do método de secagem empregado (S40), enquanto os numerais representam repetições. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.47
- Figura 6 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas à temperatura ambiente (Ta) por 24 h, obtidas mediante o emprego dos quatro protocolos de isolamento de DNA avaliados. As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. As letras Ta são indicativas do método de secagem

empregado, enquanto os numerais representam repetições. Santa Maria, RS, 2014.	48
Figura 7 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez., secas em forno de micro-ondas (FMO) por 2 min, obtidas mediante o emprego dos quatro protocolos de isolamento de DNA avaliados. As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. A letra F é indicativa do método de secagem empregado, enquanto os numerais representam repetições. Santa Maria, RS, 2014.	49
Figura 8 – Gel de agarose a 1% evidenciando a funcionalidade relativa das soluções de DNA genômico de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez., obtidas por meio do emprego dos quatro protocolos de isolamento estudados, após reações de digestão com a enzima de restrição Hind III. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	56
Figura 9 – Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras foliares de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez., secas previamente em estufa a 40 °C (S40), mediante o emprego de diferentes protocolos. Del = Dellaporta; Fer. e Gra. = Ferreira e Grattapaglia; Kha = Khanuja; Maz. e Bit. = Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	57
Figura 10 – Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras foliares de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez., secas a temperatura ambiente (TA), mediante o emprego de diferentes protocolos. Del = Dellaporta; Fer. e Gra. = Ferreira e Grattapaglia; Kha = Khanuja; Maz. e Bit. = Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	58
Figura 11 – Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras foliares de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez., secas a temperatura ambiente (TA), mediante o emprego de diferentes protocolos. Del = Dellaporta; Fer. e Gra. = Ferreira e Grattapaglia; Kha = Khanuja; Maz. e Bit. = Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	60
Figura 12 – Médias observadas para as razões A260/A230 e A260/A280 e para a concentração de DNA (ng μL^{-1}) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%	

- de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014..... 62
- Figura 13 – Médias observadas para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014..... 62
- Figura 14 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas à temperatura ambiente, obtidas mediante o emprego de quatro diferentes concentrações de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) no protocolo de Dellaporta et al. (1983). As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. Santa Maria, RS, 2014..... 63
- Figura 15 – Médias observadas para as razões A260/A230 e A260/A280 e para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Polivinilpirrolidona (PVP) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 65
- Figura 16 – Médias observadas para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Polivinilpirrolidona (PVP) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 65
- Figura 17 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas à temperatura ambiente, obtidas mediante o emprego de quatro diferentes concentrações de Polivinilpirrolidona (PVP) no protocolo de

Dellaporta et al. (1983). As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. Santa Maria, RS, 2014. 66

Figura 18 – Médias observadas para as razões A260/A230 e A260/A280 e para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Acetato de Potássio no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 68

Figura 19 – Médias observadas para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Acetato de Potássio no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 68

Figura 20 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas à temperatura ambiente, obtidas mediante o emprego de quatro diferentes concentrações de Acetato de Potássio no protocolo de Dellaporta et al. (1983). As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. Santa Maria, RS, 2014. 69

Figura 21 – Médias observadas para as razões A260/A230 e A260/A280 e para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 71

Figura 22 – Médias observadas para as razões A260/A230 e A260/A280 e para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.71

Figura 23 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas à temperatura ambiente, obtidas mediante o emprego de quatro diferentes concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl) no protocolo de Dellaporta et al. (1983). As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. Santa Maria, RS, 2014.72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Absorvância de Ácido Nucleico e Proteína. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	28
Tabela 2 – Classificação utilizada para avaliar o grau de correlação entre as variáveis analisadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	40
Tabela 3 – Modificações efetuadas no protocolo Dellaporta et al. (1983), que incluíram diferentes concentrações de soluções originalmente empregadas ou uma nova solução, avaliando-se diferentes concentrações, com a finalidade de otimizar o isolamento de DNA genômico a partir de amostras foliares de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	41
Tabela 4 – Critérios e escores atribuídos à respectiva faixa de valor considerados na seleção da(s) melhor(es) modificação(ões) efetuada(s) no protocolo de isolamento de DNA genômico Dellaporta et al. (1983), avaliadas no presente estudo em folhas jovens de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	42
Tabela 5 – Médias da razão A260/A230 estimadas para as soluções de DNA genômico em função dos diferentes protocolos de isolamento e métodos de secagem das amostras foliares de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	44
Tabela 6 – Médias de absorvância no comprimento de onda de 230 nm das soluções de DNA genômico em função dos diferentes protocolos de isolamento e métodos de secagem das amostras foliares de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	51
Tabela 7 – Médias da razão A260/A280 estimadas para as soluções de DNA genômico, em função da interação entre os diferentes protocolos de isolamento e métodos de secagem das amostras foliares de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	53
Tabela 8 – Médias de concentração ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) estimadas para as soluções de DNA genômico, em função dos diferentes protocolos de isolamento e métodos de secagem das amostras foliares de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	54

Tabela 9 – Matriz de correlação entre a curva de absorvância de soluções de DNA isoladas por meio do emprego dos diferentes protocolos a partir de amostras foliares secas em estufa a 40 °C (S40) e a curva padrão de uma solução de DNA pura (abaixo da diagonal) e matriz dos valores de probabilidade de erro 'p' (acima da diagonal). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	57
Tabela 10 – Matriz de correlação entre a curva de absorvância de soluções de DNA isoladas por meio do emprego dos diferentes protocolos a partir de amostras foliares secas a temperatura ambiente (TA) e a curva padrão de uma solução de DNA pura (abaixo da diagonal) e matriz dos valores de probabilidade de erro 'p' (acima da diagonal). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	59
Tabela 11 – Matriz de correlação entre a curva de absorvância de soluções de DNA isoladas por meio do emprego dos diferentes protocolos a partir de amostras foliares secas a temperatura ambiente (TA) e a curva padrão de uma solução de DNA pura (abaixo da diagonal) e matriz dos valores de probabilidade de erro 'p' (acima da diagonal). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	60
Tabela 12 – Escores atribuídos, individualmente, às variáveis razão A260/A230, razão A260/A280, concentração de DNA na solução (ng μL^{-1}) e Coeficiente de Correlação de Pearson (r), e seu somatório (Σ), nas modificações realizadas no protocolo de isolamento de DNA genômico de Dellaporta et al. (1983) a partir de folhas jovens, secas à temperatura ambiente, de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	74

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 – Gráficos da análise de espectrofometria em NANODROP 1000 para a razão A260/A230 para todas as repetições nos diferentes protocolos de extração originais e métodos de secagem. (A) Dellaporta, (B) Ferreira e Grattapaglia, (C) Khanuja e (D) Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	89
Apêndice 2 – Gráficos da análise de espectrofometria em NANODROP 1000 para razão A260/A280 para todas as repetições nos diferentes protocolos de extração originais e métodos de secagem. (A) Dellaporta, (B) Ferreira e Grattapaglia, (C) Khanuja e (D) Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	91
Apêndice 3 – Gráficos da análise de espectrofometria em NANODROP 1000 para a variável Concentração (ng μL^{-1}) para todas as repetições nos diferentes protocolos de extração originais e métodos de secagem. (A) Dellaporta, (B) Ferreira e Grattapaglia, (C) Khanuja e (D) Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	93
Apêndice 4 – Curva de absorvância das amostras de DNA para as quatro concentrações de PVP. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	95
Apêndice 5 – Curva de absorvância das amostras de DNA para as quatro concentrações de PVP. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	95
Apêndice 6 – Curva de absorvância das amostras de DNA para as quatro concentrações de Acetato de Potássio. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.	96
Apêndice 7 – Curva de absorvância das amostras de DNA para as quatro concentrações de NaCl. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	96

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1.	Objetivo Geral	20
2.2.	Objetivos Específicos	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1.	Família Lauraceae	21
3.2.	Descrição da espécie	23
3.2.1.	<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	23
3.3.	Isolamento de DNA genômico de espécies florestais	24
3.4.	Compostos inibidores de PCR e qualidade do DNA isolado	26
3.5.	Secagem de amostras foliares para isolamento de DNA genômico	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1.	Coleta do material vegetal	31
4.2.	Secagem, armazenamento e formação de bulks	31
4.3.	Análise comparativa de quatro protocolos de isolamento de DNA genômico de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	33
4.3.1.	Análise da qualidade e concentração das soluções de DNA genômico	37
4.3.2.	Correlação entre as curvas de absorvância de DNA esperadas e observadas.....	39
4.4.	Otimização de protocolo de isolamento de DNA genômico a partir de folhas de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1.	Análise comparativa de quatro protocolos de isolamento de DNA genômico a partir de folhas jovens de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. secas por três diferentes métodos	43
5.1.1.	Análise da qualidade e concentração das soluções de DNA genômico obtidas.....	43
5.1.2.	Correlação entre a curva de absorvância de DNA esperada e observada	56

5.2. Otimização do protocolo Dellaporta et al. (1983) para isolamento de soluções de DNA genômico a partir de folhas de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.....	61
6 CONCLUSÕES	75
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICES	89

INTRODUÇÃO

Para que se possa fazer uso das mais diversas técnicas de biologia molecular, é fundamental obter DNA genômico de qualidade e em quantidade que possibilite o emprego da técnica desejada (SAHU et al., 2012). Para tal, o protocolo de isolamento de DNA genômico utilizado deve atender a determinados requisitos, tais como: ser capaz de romper paredes e membranas celulares, inibir a ação de desoxirribonucleases (DNAses), separar os ácidos nucléicos das proteínas e polissacarídeos e, ainda, proteger o DNA da ação de compostos fenólicos, impedindo, assim, a sua oxidação. Os principais problemas encontrados no isolamento de DNA de alto peso molecular a partir de certas espécies de plantas leguminosas incluem: a degradação de DNA devido a ação de nucleases, isolamento de polissacarídeos altamente viscosos e de outros metabólitos secundários que, direta ou indiretamente, inibem as reações enzimáticas posteriores (VARMA et al., 2007).

Nas últimas décadas, inúmeros protocolos vêm sendo desenvolvidos por pesquisadores para o isolamento de soluções de DNA genômico de plantas. Observa-se, que a grande maioria desses são resultados de modificações em protocolos base, como os de Murray e Thompson (1980), Dellaporta et al. (1983), Rogers e Bendich (1985), Doyle e Doyle (1987) e Lodhi et al. (1994), visando solucionar problemas específicos da espécie em estudo. Tais modificações são necessárias devido à grande heterogeneidade das espécies vegetais, principalmente no que diz respeito a sua composição química, o que inviabiliza o desenvolvimento de um protocolo universal para o isolamento de DNA.

Atualmente, existem diversos 'kits' comerciais para o isolamento de DNA de plantas, que oferecem, como principais vantagens, a praticidade e o reduzido tempo. No entanto, esses produtos comerciais apresentam um elevado custo, que pode ser considerado uma desvantagem, principalmente quando se trabalha com um grande volume de amostras, além da grande possibilidade de serem ineficientes, sobretudo ao se trabalhar com espécies vegetais com altos teores de polissacarídeos e polifenóis (VARMA et al., 2007), como é o caso de espécies lenhosas.

A canela-preta (*Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.), pertence à família Lauraceae, é uma espécie arbórea florestal que ocorre naturalmente no Rio Grande do Sul, bem como em outros estados brasileiros. Por ser tratar de uma espécie produtora de óleos essenciais e que apresenta propriedades farmacêuticas, um grande número de metabólitos secundários, tais como taninos, alcalóides, compostos fenólicos e terpenos, responsáveis por essas propriedades, interferem no processo de isolamento, tendendo a coprecipitar com o DNA e a interagir, de maneira irreversível, com proteínas e ácidos nucleicos (KATTERMAN e SHATTUCK, 1983).

Atualmente, essa espécie não possui um protocolo específico para o isolamento de DNA, o que vêm a dificultar estudos relacionados a diversidade genética, seleção de genótipos superiores, mapeamento genético, entre outros estudos de natureza molecular. Logo, o desenvolvimento de um protocolo capaz de isolar DNA de alta qualidade e quantidade, é fundamental para a continuidade de estudos relacionados à variabilidade genética de populações naturais e, em particular, a prospecção de genótipos superiores em relação à síntese de óleos essenciais com potencial emprego na saúde humana, animal e na proteção vegetal.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

Avaliar diferentes procedimentos de isolamento de DNA de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., a fim de estabelecer um protocolo padrão, capaz de obter amostras de alto rendimento e qualidade para emprego em análises genômicas.

1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar métodos de secagem de amostras foliares visando seu emprego em procedimentos de isolamento de DNA genômico de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.
- Avaliar e selecionar protocolos de isolamento de DNA genômico eficientes para a espécie alvo do estudo.
- Testar modificações nos protocolos de isolamento de DNA genômico existentes na literatura científica, a fim de otimizar o protocolo de isolamento de DNA genômico selecionado.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3. Família Lauraceae

A família Lauraceae pertence à divisão Magnoliophyta, sendo composta por cerca de 52 gêneros e 3 mil espécies. Ocorre, predominantemente, em regiões tropicais e subtropicais, sendo, excepcionalmente, encontrada em regiões temperadas (ROHWER, 1993; BARROSO et al., 2002; RIBEIRO et al., 1999; WERFF e RICHTER, 1996). No Brasil, é representada por 22 gêneros e cerca de 400 espécies, que habitam, na sua maior parte, as florestas pluviais, restingas e cerrados (LORENZI e SOUZA, 2008).

As Lauráceas destacam-se, entre as demais famílias botânicas, principalmente, em dois aspectos. Primeiro, pela representatividade, tanto em riqueza de táxons quanto em número de indivíduos, verificada em diversos inventários florísticos e fitosociológicos realizados em áreas de florestas nativas do sul e sudeste do país, fato que confirma a hipótese de que a Floresta Atlântica é um dos principais centros de diversidade deste grupo (GUEDES-BRUNI et al., 2006; CARVALHO et al., 2006; KURTZ e ARAÚJO, 2000). Segundo, pela sua importância econômica, em virtude da boa qualidade de sua madeira e do alto valor de seus óleos essenciais no comércio (MARQUES, 2001). Algumas espécies da família, como *Ocotea catharinensis* Mez. (canela-bicha), *Ocotea odorífera* Vellozo) Rohwer (canela-sassafrás) e *Ocotea porosa* (Ness. e Mart.) Barroso (imbuia), apresentam um intenso histórico de exploração extrativista ao longo dos anos (QUINET e ANDREATA, 2002), principalmente para a extração de madeira para exportação, o que conduziu tais espécies ao risco de extinção.

Contudo, a família Lauraceae também é conhecida por possuir um grande número de espécies aromáticas e produtoras de óleos, estando compreendidas, principalmente, nos gêneros *Cinnamomum*, *Aniba*, *Ocotea* e *Nectandra*. Tais espécies alcançam alto valor no mercado e são, frequentemente, utilizadas como fonte de matéria prima em indústrias.

O gênero *Cinnamomum* é constituído por, aproximadamente, 350 espécies, muitas das quais são produtoras de óleos essenciais, com destaque para *Cinnamomum canphora* (L.) Presl., popularmente conhecida como cânfora. O óleo extraído da espécie, linalol, é utilizado, em larga escala, por indústrias de cosméticos e aromáticas (DUÑG et al., 1993; PINO e FUENTES, 1998; PÉLISSIER et al., 1995; JANTAM e GOH, 1992; STUBBS et al., 2004; MÖLLENBECK et al., 1997).

O gênero *Aniba*, por sua vez, compreende cerca de 40 espécies, destacando-se, no Brasil, *Aniba rosaeodora* Ducke, popularmente conhecida por pau-rosa, produtora de óleo aromático usado na indústria de perfumaria e cosméticos. Esta espécie foi vastamente explorada pelo fato de o óleo poder ser extraído das folhas, galhos, casca, madeira e raízes (ALCÂNTARA et al., 2010; MAIA et al., 2007; SAMPAIO et al., 2012; SIMIĆ et al., 2004; LIMA et al., 2008). Devido à exploração predatória, ocorreu uma drástica redução de suas populações naturais, levando à espécie ao risco de extinção (CORRÊA, 1984). Uma alternativa encontrada para sua conservação foi a propagação *in vitro*, por meio de embriões e gemas axilares e por mudas de regeneração natural (HANDA et al., 2005; JARDIM et al., 2010; LEITE et al., 1999; ALENCAR e FERNANDES, 1978; MAY e BARATA, 2004).

O gênero *Ocotea*, com cerca de 350 espécies, apresenta *Ocotea odorífera* (Velloso) Rohwer, canela sassafrás, como a principal representante do gênero no Brasil. A espécie têm grande importância econômica devido as suas propriedades medicinais, sendo que o seu óleo essencial é um poderoso antisséptico, fungicida e repelente de insetos (OLTAMARI et al., 2004; GONÇALVES et al., 2005; JUNIOR, 2010 et al.; CASTRO e LIMA, 2011).

Por fim, o gênero *Nectandra* abrange cerca de 175 espécies, das quais 43 podem ser encontradas no Brasil, especificamente nas Florestas Amazônica e Atlântica (BAITELLO et al., 2003). A grande maioria dos estudos das espécies deste gênero são motivados pela presença de propriedades digestivas, diuréticas, anestésicas, anti-inflamatórias e antireumáticas (CORRÊA, 1984; MELO et al., 2006; BÖHLKE et al., 1996). No entanto, mesmo com grande potencial para a produção de óleos essenciais, as espécies deste gênero são pouco estudadas, como é o caso de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (FILHO et al., 2008; ROMOFF et al., 2010), objeto de estudo da presente dissertação.

1.4. Descrição da espécie

1.4.1. *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

A espécie *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., conhecida popularmente como canela-preta, é uma espécie arbórea pertencente à família Lauraceae. Trata-se de uma espécie nativa da Floresta Atlântica (Floresta Ombrófila Densa), Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecídua e Decídua, de ocorrência natural nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, além do Paraguai e Argentina (MARCHIORI, 1997). Destaca-se por ser uma das espécies mais frequentes e características da floresta latifoliada do Alto Uruguai e da floresta que se estende ao longo da Serra Geral do Rio Grande do Sul (Figura 1) (REITZ et al., 1989).

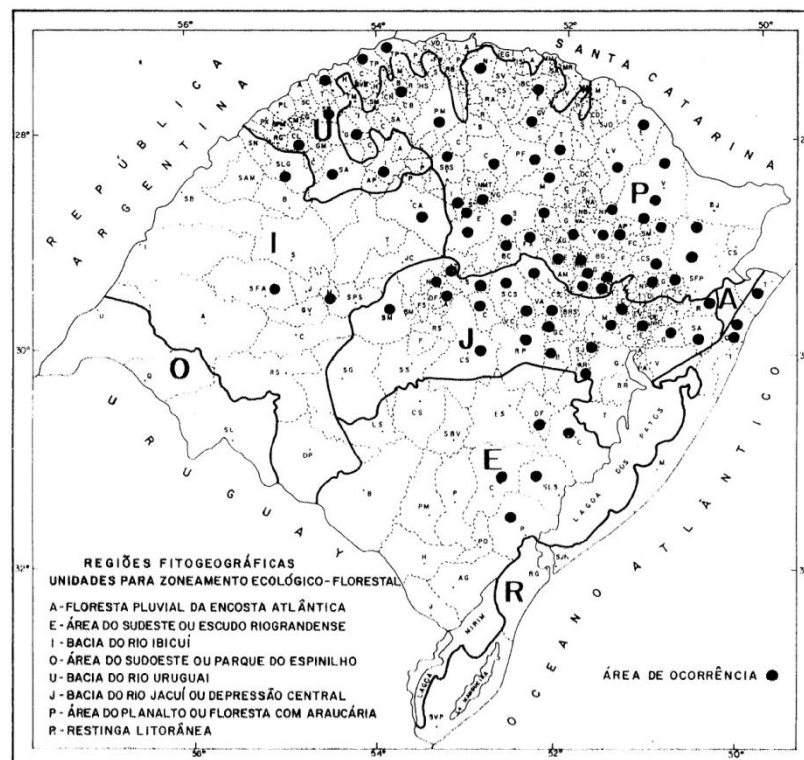


Figura 1 – Representação do mapa do estado do Rio Grande do Sul com áreas de ocorrência de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. indicadas por círculos. Fonte: REITZ et al. (1989). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

É uma árvore de grande porte, varia de 15 a 30 m de altura e 40 a 80 cm de diâmetro, apresenta tronco um pouco tortuoso, casca áspera e escura. Distingue-se, das demais canelas, por apresentar folhas mais estreitas, medindo de 7 a 15 cm de comprimento por 2 a 4 cm de largura, subcoriáceas, sem domácias e cheiro característico menos intenso que as demais espécies do gênero (MARCHIORI, 1997; REITZ et al., 1989; LORENZI, 1998). Floresce a partir de junho, processo que se prolonga até outubro, com o amadurecimento dos frutos ocorrendo de dezembro até abril.

A madeira é adequada para construção civil, esquadrias e tábuas em geral (LORENZI, 1998). Devido às excelentes características xilotecnológicas, esta madeira, assim como aquela de todas as canelas, poderia ter numerosas aplicações, no entanto, tem sido relegada para segundo plano devido ao cheiro desagradável, que pode voltar, quando está em lugares úmidos.

A espécie apresenta algumas propriedades indicadas pela medicina tradicional, tais como antireumática, antiinflamatória e analgésica, as quais foram constatadas por estudos fitoquímicos que revelaram a presença de fenilpropanóides (GARCEZ et al., 2009), lignanas tetrahidrofurânicas e alcalóides (SANTOS FILHO e GILBERT, 1975). Segundo Apel et al., (2006), os óleos essenciais de *Nectandra megapotamica* possuem atividade microbiana contra *Staphylococcus aureus*, atividade antiinflamatória e antitumoral indicando um potencial farmacológico para seus óleos essenciais.

1.5. Isolamento de DNA genômico de espécies florestais

O isolamento de DNA genômico íntegro e de alto peso molecular é essencial para muitas aplicações na biologia molecular, compreendendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), digestão com enzimas de restrição, 'Southern Blot', construção de bibliotecas genômicas, entre outros (MICHIELS et al., 2003). Nos estudos baseados nessas técnicas, considerando-se as diversas aplicações, principalmente aquelas baseadas em marcadores moleculares, em que, muitas vezes, um grande número de indivíduos é avaliado, é fundamental a disponibilidade

de métodos de isolamento rápidos e eficientes para a obtenção de soluções de DNA genômico de boa qualidade (ARRIEL et al., 2002).

Desde o primeiro procedimento de isolamento de DNA descrito para plantas, desenvolvido por Murray e Thompson (1980) e, posteriormente, àquele desenvolvido por Taylor e Powell (1982), inúmeras modificações, a partir de protocolos base, têm sido realizadas com o intuito de otimizar tais procedimentos, visando aplicá-los a uma ampla gama de espécies vegetais. Tais modificações são necessárias devido à grande heterogeneidade de quimiotipos, principalmente quando estão envolvidas espécies arbóreas florestais, em que, muitas vezes, o isolamento de DNA a partir de um protocolo de extração padrão exige diferentes estratégias para a obtenção de material de qualidade e rendimento adequados.

Um procedimento de isolamento de DNA de alta qualidade inicia-se no momento da coleta do material vegetal. Deve ser dada preferência a tecidos mais jovens (brotações), devido ao menor teor de polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários, que podem coprecipitar com o DNA no processo de isolamento (ZHANG e STEWART, 2000), além do fato de que o DNA extraído a partir de tecidos jovens apresenta maior estabilidade para armazenamento por longos períodos (LODHI et al., 1994). No entanto, o inconveniente da utilização de tecidos jovens é o baixo rendimento de DNA isolado, o que exige uma grande quantidade de material vegetal para a obtenção de um rendimento satisfatório (MAURO et al., 1992).

As principais características desejadas em um protocolo de isolamento de DNA genômico incluem alta recuperação bem como a remoção de impurezas e compostos inibidores (TERRY, 2002). O método de isolamento de ácidos nucleicos de espécies vegetais mais difundido, atualmente, é baseado no surfactante catiônico Brometo de Cetil Trimetil Amônio, popularmente conhecido como CTAB. Esta substância se tornou amplamente utilizada pela sua capacidade de separar os ácidos nucleicos de polissacarídeos por solubilização. No entanto, em muitos casos, o isolamento de DNA com CTAB não é capaz de alcançar a pureza necessária para aplicações posteriores. Uma alternativa tem sido a utilização de soluções salinas concentradas e o isolamento com o emprego de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), juntamente com Acetato de Potássio (ANGELES et al., 2005; CRUZ et al., 1997; LEE e NICHOLSON, 1997; SAHARE e SRINIVASU, 2012; SHARMA e PUROHIT, 2012).

1.6. Compostos inibidores de PCR e qualidade do DNA isolado

Grandes quantidades de polissacarídeos, polifenóis e metabólitos secundários, como alcalóides, flavonóides e taninos, presentes na grande maioria das espécies arbóreas, geralmente, interferem no isolamento de DNA genômico (MISHRA et al., 2008), principalmente pelo fato de coprecipitarem, de maneira irreversível, com os ácidos nucleicos (DABO et al., 1993; VARMA et al., 2007). Durante o procedimento de isolamento, esses compostos são, facilmente, identificados por conferirem uma coloração, que varia de castanho claro à escuro, e uma consistência gelatinosa ao DNA dissolvido em tampão Tris-EDTA (TE). A principal consequência da contaminação por esses compostos é a inutilização do DNA isolado para aplicação em PCR e digestão, pelo fato de atuarem diretamente como inibidores da enzima Taq DNA polimerase e endonucleasas de restrição, respectivamente (CSAIKL et al., 1998; FANG et al., 1992; LUMARET et al., 1997; MICHAUD et al., 1995; PANDEY et al., 1996; POREBSKI et al., 1997).

A presença de compostos fenólicos, durante o isolamento de DNA, confere ao mesmo uma coloração castanha (GUILLEMAUTN e MARÉCHAL-DROUARD, 1992; KATTERMAN e SHATTUCK, 1983). Para a remoção de polifenóis, presentes em grandes quantidades em folhas maduras e armazenadas inadequadamente, o uso de polivinilpolipirrolidona (PVP) tem sido relatado por inúmeros autores (CRUZ et al., 1997; DOYLE e DOYLE, 1987; KIM et al., 1997; KRIŽMAN et al., 2006; POREBSKI et al., 1997; ROGERS e BENDICH, 1985). O PVP forma ligações de hidrogênio complexas com os compostos polifenólicos, que podem ser separados do DNA por meio de centrifugação (MALIYAKAL, 1992). Lodhi et al. (1994), ainda, sugerem manter o material vegetal congelado a fim de reduzir esses compostos, além de utilizar o PVP no processo de isolamento.

Já a contaminação por polissacarídeos confere, ao DNA isolado, uma consistência altamente viscosa, o que dificulta sua pipetagem e inviabiliza sua utilização em eletroforese (DO e ADAMS, 1991). A extração com fenol é altamente eficiente na remoção de polissacarídeos (FANG et al., 1992; GEHRIG et al., 2000; PADMALATHA e PRASAD, 2006; POREBSKI et al., 1997; TEL-ZUR et al., 1999; RETHER et al., 1993). No entanto, devido a sua alta toxicidade e restrições quanto ao descarte dos resíduos, a sua utilização tem sido limitada. Uma alternativa rápida,

eficiente e de baixo custo, para remover a contaminação por polissacarídeos é o uso de NaCl em altas concentrações (FANG et al., 1992; LODHI et al., 1994).

Entretanto, mesmo adotando-se as estratégias citadas anteriormente, é fundamental realizar uma análise criteriosa da pureza do DNA isolado. A espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-VIS) é um dos métodos mais utilizados na análise de ácidos nucleicos, tanto no sentido de avaliar a pureza do DNA extraído, quanto no sentido de quantificar a sua concentração.

Esse método foi descrito, pela primeira vez, como um procedimento para avaliar a contaminação, por ácidos nucleicos, em amostras de proteínas (WARBURGB e CHRISTIAN, 1942), em que uma amostra de proteína pura, isenta de contaminação por ácidos nucleicos, deveria ter uma razão A_{260}/A_{280} igual a 0,57 (Tabela 1). Devido a sua praticidade e confiabilidade para a análise de amostras de proteínas, tal procedimento passou a ser aplicado de maneira inversa: analisar a pureza de amostras de ácido nucleico, isentas de contaminação por proteínas.

Alguns autores discutiram a utilização dessa razão, por não considerarem-na uma medida confiável da pureza do DNA (GLASEL, 1995; MANCHESTER, 1995; WILFINGER et al., 1997), com base no argumento de que o coeficiente de extinção em 260 e 280 nm para o DNA (20 e 10 respectivamente) é muito maior que aquele empregado para proteínas (0,57 e 1 respectivamente), assim, uma contaminação significativa por proteínas não mudaria, significativamente, a razão A_{260}/A_{280} em uma amostra de DNA. No entanto, inúmeros estudos vêm aplicando essa metodologia na análise da pureza de DNA, apresentando resultados satisfatórios (SÁ et al., 2011; NGUYEN et al., 2009; SAHU et al., 2012; PETERSON et al., 1997; LIN et al., 2001; ALJANABI e MARTINEZ, 1997; PIRTTILÄ et al., 2001).

Tabela 1 – Absorvância de Ácido Nucleico e Proteína. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

% Proteína	% Ácido Nucleico	A260/A280	% Proteína	% Ácido Nucleico	A260/A280
100	0	0,57	45	55	1,89
95	5	1,06	40	60	1,91
90	10	1,32	35	65	1,93
85	15	1,48	30	70	1,94
80	20	1,59	25	75	1,95
75	25	1,67	20	80	1,97
70	30	1,73	15	85	1,98
65	35	1,78	10	90	1,98
60	40	1,81	5	95	1,99
55	45	1,84	0	100	2,00
50	50	1,87			

Fonte: Warburg e Christian (1942)

Basicamente, essas estimativas podem ser realizadas em espectrofotômetros convencionais ou equipamentos específicos, como, PowerWave®, PicoDrop® e NanoDrop®. Os espectrofotômetros convencionais utilizam cubetas de quartzo para a contenção da amostra e exigem uma quantidade mínima para realizar as leituras de absorvância, aproximadamente 1 ml, necessitando realizar diluições da amostra de DNA, e podendo ser uma fonte de contaminação adicional. Em contrapartida, os equipamentos específicos utilizam uma pequena quantidade de amostra (entre 1 e 2 µL), sendo que em alguns, como no caso do PicoDrop®, a amostra pode ser recuperada após a análise.

Para a estimativa da concentração nos espectrofotômetros convencionais, deve ser realizada a diluição da amostra para, então, efetuar-se a leitura a 260 nm, que corresponde ao pico de absorvância de ácidos nucléicos, em que uma unidade de absorvância corresponde a 50 µg mL⁻¹ (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Os valores obtidos são substituídos em uma equação para obter-se a concentração respectiva. Logo, para a estimativa da pureza do DNA extraído, devem ser realizadas leituras de absorvância nos comprimentos de onda de 230 e 280 nm, correspondentes aos picos de absorção de polissacarídeos e proteínas respectivamente (PAGE et al., 2010). Por fim, procede-se ao cálculo das razões A260/A230 e A260/A280.

No caso da utilização de equipamentos específicos, como aqueles citados anteriormente, as estimativas da concentração e pureza da amostra são fornecidas,

automaticamente, pelo 'software' específico de cada equipamento. Além de usar pequenos volumes de amostra, o que elimina a necessidade de diluições, esses equipamentos são capazes de quantificar as amostras 200 vezes mais concentradas que aquelas capazes de mensuração nos espectrofotômetros que utilizam cubetas (PAGE et al., 2010).

A razão A260/A280 é considerada a principal medida empregada na análise da pureza de ácidos nucleicos, sendo que valores inferiores a 1,6 são considerados ruins e valores entre 1,8 e 2,0 são considerados bons. Já para a razão A260/A230, considerada medida secundária, os valores considerados satisfatórios encontram-se na faixa 1,6 – 1,9 (PAGE et al., 2010; SCIENTIFIC, 2008a).

1.7. Secagem de amostras foliares para isolamento de DNA genômico

Conforme comentado anteriormente, a obtenção de soluções de DNA genômico de boa qualidade é essencial para o sucesso das análises moleculares subsequentes. Logo, as metodologias utilizadas para coleta, tratamento e conservação das amostras interferem, diretamente, na qualidade de DNA isolado.

Tratando-se, especificamente, de espécies arbóreas florestais, as quais, na grande maioria dos casos, encontram-se em desenvolvimento em locais distantes dos laboratórios de pesquisa, aliado às dificuldades de coleta devido ao elevado porte e reduzido número de indivíduos disponíveis, o armazenamento das amostras foliares, durante o transporte até o laboratório e após sua chegada, é fundamental para mantê-las viáveis por longos períodos de tempo (BHATTACHARJEE et al., 2009). O método mais comumente utilizado para preservar amostras foliares é colocá-las em saco plástico de fecho hermético contendo sílica gel (CHASE e HILLS, 1991). Esse procedimento é eficiente pelo fato de desidratar o material, rapidamente, evitando-se, assim, a degradação do DNA (ŠTORCHOVÁ et al., 2000). O método oferece inúmeras vantagens, como baixo custo, simplicidade, possibilidade de reutilização e preservação do material por longos períodos. Além disso, no estado desidratado, o DNA é menos suscetível à degradação química ou enzimática (MURRAY E THOMPSON, 1980).

Uma alternativa ao uso de sílica gel é a desidratação de amostras foliares em estufa de circulação de ar forçado. Os métodos empregados diferem no sentido de que o primeiro (sílica gel) ocorre à temperatura ambiente, com a sílica gel absorvendo a umidade, enquanto o segundo (desidratação) ocorre em uma temperatura constante, com circulação e renovação do ar. Em ambos os métodos, o processo de secagem visa impedir a deterioração do material por meio da redução do teor de água, atuando negativamente na ação de enzimas e micro-organismos pela desidratação, permitindo a conservação das amostras por um longo período de tempo (SILVA e CASALI, 2000).

1.8. MATERIAL E MÉTODOS

A maior parte dos experimentos, a seguir descritos, foi realizada no Laboratório de Marcadores Moleculares do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da UFSM, localizado em Santa Maria, RS. Algumas análises, porém, foram efetuadas no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário, Centro de Ciências Rurais da UFSM, localizado em Santa Maria, RS.

1.9. Coleta do material vegetal

Para a realização deste estudo foram coletadas amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. no Parque Estadual Quarta Colônia, localizado entre os municípios de Agudo e Ibarama – RS (coordenadas geográficas 29°27'5721" S e 53°16'51.38" O) e Centro Marista de Eventos (Cerrito), localizado em Santa Maria – RS (coordenadas geográficas 29°42'2.18" S e 53°47'17.24" O). No total, foram coletadas amostras de 35 indivíduos adultos, sendo 20 no primeiro local e 15, no segundo. Todas as árvores tiveram suas coordenadas geográficas catalogadas por meio do equipamento de Global Positioning System (GPS) Garmin Etrex Legend HCx. As amostras foram coletadas com o auxílio de podão telescópico, sendo armazenadas em sacos plásticos com fecho hermético contendo sílica gel e acondicionadas em gelo para serem transportadas até o laboratório.

1.10. Secagem, armazenamento e formação de bulks

Após a chegada ao laboratório, parte do material coletado foi mantido em temperatura ambiente, acondicionado em sacos de papel pardo, para secagem natural - estas amostras foram denominadas "Amostras TA". Outra parte das amostras foi submetida à secagem artificial, utilizando-se: a) o método convencional, a partir de estufa de circulação de ar forçado, com temperatura constante de 40 °C,

onde o material permaneceu por 24 h, as quais foram denominadas “Amostras S40”; e b) o método de secagem em Forno de Micro-ondas (FMO), onde o material foi submetido a quatro ciclos de 30 s (Figura 3) em potência máxima (até atingir massa constante), as quais foram denominadas “Amostras FMO”. O Forno Micro-ondas (Brastemp) apresenta as seguintes especificações: capacidade para 28 L, tensão de alimentação 220 V, corrente de 7,9 A, frequência de 60 Hz (rede), potência de útil de 1.600 W (máxima), frequência de 2.450 MHz (operação), velocidade do prato giratório de 3 rpm. No centro do forno micro-ondas, nos momentos de secagem, foi colocado um béquer contendo 150 mL de água com a finalidade de umedecer o ambiente e evitar a combustão das amostras e possíveis danos ao aparelho (Figura 2).

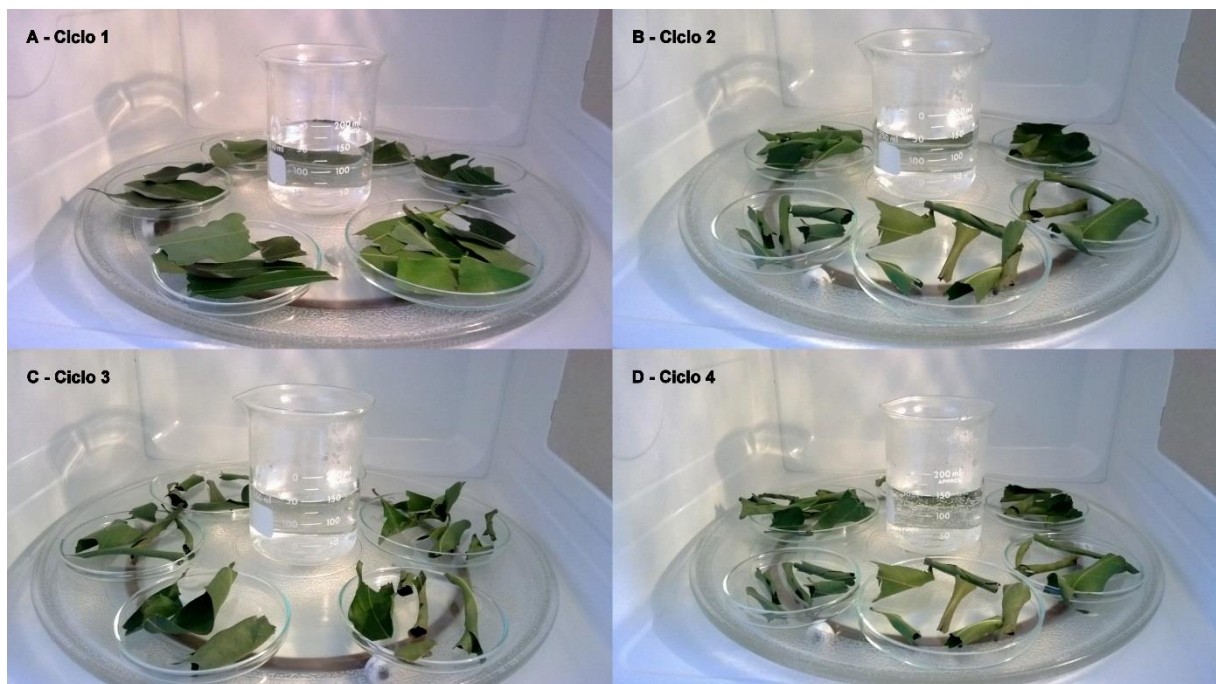


Figura 2 – Aspecto das amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., durante os quatro ciclos de secagem em Forno de Micro-ondas na potência máxima. No centro do forno micro-ondas, nos momentos de secagem, foi colocado um béquer contendo 150 mL de água com a finalidade de umedecer o ambiente e evitar a combustão das amostras e possíveis danos ao aparelho. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Após os procedimentos de secagem, todas as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente, em sacos de papel pardo, previamente identificados.

Para a obtenção de amostras representativas, uma vez que a meta do presente trabalho é desenvolver um protocolo otimizado de isolamento de DNA genômico, em um primeiro momento para a espécie e, na sequência, aplicável à família Lauraceae, foram constituídos *bulks* com as amostras foliares.

1.11. Análise comparativa de quatro protocolos de isolamento de DNA genômico de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Neste experimento foram testados quatro protocolos de isolamento de DNA genômico e três tipos de métodos de secagem de amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Em todos, foram pesados 150 mg de material vegetal, constituído por folhas, que foram, posteriormente, macerados em gral com o auxílio de nitrogênio líquido.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 4 x 3, totalizando 12 tratamentos, com oito repetições (constituídas por amostras foliares coletadas em indivíduos diferentes), em um total de 96 unidades experimentais. Os níveis do fator “A” referiram-se aos protocolos de isolamento de DNA genômico [Dellaporta et al. (1983); Ferreira e Grattapaglia (1996); Khanuja (1999), Mazza e Bittencourt (2000)] e os níveis do fator “B”, aos métodos de secagem das amostras foliares (TA, S40, FMO). Os quatro procedimentos de isolamento de DNA genômico são descritos a seguir.

Protocolo 1 – Extração com SDS

Método proposto por Dellaporta et al. (1983)

Procedimento: Após macerar o tecido foliar, o mesmo foi inserido em um microtubo de 2 mL contendo 750 µL de tampão de extração TE (Tris-HCl a 100 mM, pH 8,0; EDTA a 50 mM; NaCl a 500 mM; β-Mercaptoetanol a 0,2% e água ultrapura, q.s.p.) pré-aquecido a 65 °C. Foram adicionados 50 µL de SDS a 20%, sendo misturados por inversão. Após, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C, por 30 a

60 min, misturando-se a cada 10 min. A seguir, foram adicionados 250 µL de acetato de potássio a 5 M, misturados por inversão e incubados por 20 min no gelo, misturando-os a cada 5 min. Após, os tubos foram centrifugados por 20 min a 25.000 x g. A etapa de filtragem em filtro Miracloth foi suprimida. Após, o sobrenadante foi transferido para novos microtubos, sendo adicionados 500 µL de isopropanol gelado; misturados, por inversão, e incubados a -20 °C por 30 min. Na sequência, os tubos foram centrifugados por 15 min a 20.000 x g, sendo, após, descartado, cuidadosamente, o sobrenadante. O precipitado foi seco em papel toalha por 10 min. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em 700 µL de tampão TE (Tris-HCl a 50 mM, pH 8,0; EDTA a 10 mM, pH 8,0), fazendo-se, após um *spin* por 10 min para remover detritos insolúveis. O sobrenadante foi retirado e colocado em novos microtubos de 2 mL, aos quais foram adicionados 75 µL de acetato de sódio a 3 M e 500 µL de isopropanol gelado, sendo misturados, cuidadosamente, por inversão. Após, foram incubados por 1 h a -20 °C e centrifugados por 30 s. Descartaram-se os sobrenadantes e os *pellets* foram lavados com etanol a 80%. Por fim, o *pellet* foi seco e ressuspensionado em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl a 10 mM, pH 8,0; EDTA a 1 mM, pH 8).

Protocolo 2 – Método proposto por Ferreira e Grattapaglia (1996)

Procedimento: Após ser macerado o tecido foliar, o mesmo foi inserido em um microtubo de 2 mL, sendo, em seguida, adicionados 700 µL de tampão CTAB (Tris HCl a 100 mM, pH 8,0; EDTA a 20 mM; NaCl a 1,4 M; CTAB a 2%; β-Mercaptoetanol a 0,2% e água ultrapura, q.s.p.) e pré-aquecidos a, aproximadamente, 65 °C. Após, foram incubadas as amostras em banho-maria nessa temperatura durante 1 h, agitando-a a cada 15 min para homogeneização do material. Após, foram adicionados 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA) (24:1) e agitadas, cuidadosamente, por 5 min; em seguida, foram centrifugadas por 10 min a 5.220 x g. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 2 mL. A seguir, foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado (a -20 °C), os quais foram misturados, suavemente, por inversão dos tubos. As amostras foram armazenadas em freezer à temperatura de -20 °C, por, pelo menos, 1 h, para a formação do

sedimentado, sendo, na sequência, centrifugadas a 11.750 x g durante 20 min para a precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado, cuidadosamente, para não promover a perda do *pellet*. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol a 70%, por 5 a 10 min e, a seguir, uma vez com etanol absoluto, por 3 min. A fase aquosa foi descartada e os *pellets*, secos em estufa a 37 °C por, aproximadamente, 30 min, ou até observar a ausência de soluções líquidas nos microtubos. O DNA extraído foi ressuspenso em 150 µL de TE (Tris-HCl a 1 M, pH 8,0; EDTA a 500 mM) e foram adicionados 3 µL de RNase (10 mg mL⁻¹). Finalmente, foi efetuada a incubação a 37 °C por 30 min.

Protocolo 3 – Método proposto por Mazza e Bittencourt (2000)

Procedimento: A etapa de liofilização do material vegetal por 72 horas foi suprimida. Após ter sido macerado o tecido foliar, o mesmo foi inserido em um microtubo de 2 mL, sendo, em seguida, adicionados 850 µL de tampão extração CTAB (Tris HCl a 100 mM, pH 8,0; EDTA a 20 mM, pH 8,0; CTAB a 2%; PVP 40.000 a 1%; β-Mercaptoetanol a 0,1%; Proteinase K a 0,01%; e água ultrapura, q.s.p.) pré-aquecido a, aproximadamente, 65 °C. As amostras foram incubadas em banho-maria a essa temperatura durante 45 min, agitando-as a cada 15 min para homogeneização do material. Após ter sido atingida a temperatura ambiente, foram adicionados 500 µL de CIA (24:1). Na sequência, foram agitados, cuidadosamente, por inversão, durante 15 min; sendo, imediatamente, centrifugados por 15 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 2 mL, sendo adicionados 3 µL de RNase (a 10 mg mL⁻¹). Foram agitados, lentamente, por inversão, e as amostras foram mantidas em banho de gelo por 40 min. A seguir, foram adicionados 600 µL de CIA (24:1), agitando-se, por inversão, durante 15 min. Após, foram centrifugados por 10 min a 13.000 rpm, sendo o sobrenadante transferido para um novo microtubo de 2 mL, em que foram adicionados 800 µL de Etanol absoluto P.A gelado, misturando-se, suavemente, por inversão, até a precipitação do DNA. Na sequência, foram mantidos em freezer a -20 °C por 50 min. Decorrido esse tempo, com o auxílio de uma alça de vidro, o DNA foi “pescado” o, lavado com etanol gelado a 70% por 30 min e com Etanol gelado a 95%, por mais

30 min. Finalmente, o *pellet* foi seco e ressuspendido em 100 μ L de TE (Tris-HCl a 10 mM, pH 8,0; EDTA a 1 mM, pH 8,0).

Protocolo 4 – Método proposto por Khanuja (1999)

Procedimento: Após ter macerado o tecido foliar, o mesmo foi inserido em um microtubo de 2 mL, sendo, em seguida, adicionados 900 μ L de tampão CTAB (Tris HCl a 100 mM, pH 8,0; EDTA a 25 Mm; NaCl a 1,5 M; CTAB a 2,5%; PVP a 1%; β -Mercaptoetanol a 0,2%; e água ultrapura, q.s.p.), pré-aquecido a, aproximadamente, 60 °C. As amostras foram incubadas em banho-maria a essa temperatura durante 1 – 2 h, sendo agitadas a cada 15 min para homogeneização do material. Após, foram adicionados 900 μ L de CIA (24:1) e misturados, cuidadosamente, por inversão, durante 15 min; em seguida, foram centrifugados por 10 min a 8.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 2 mL, aos quais foram adicionados 450 μ L de NaCl a 5M e misturados suavemente. Foram adicionados 0.6 volumes de isopropanol, sendo mantidos em repouso por 1 h à temperatura ambiente. Após, foram misturados, cuidadosamente, até a formação do *pellet*, sendo, de imediato, centrifugados por 10 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, lavado com etanol a 80%. O *pellet* foi seco por 15 min a temperatura ambiente e, após, foi dissolvido em 150 μ L de TE *High salt* (NaCl a 1 M; Tris-HCl a 10 mM, pH 8,0; EDTA a 1 mM). Foram adicionados 5 μ L de RNase (10 mg ml⁻¹) e incubados por 30 min a 37 °C. Foi adicionado um volume igual de CIA (a 24:1) e, a seguir, transferido o sobrenadante para novos microtubos de 2 mL, sendo adicionados 2 volumes de etanol gelado absoluto e centrifugados, por 10 min a 10.000 rpm. Por fim, foi descartado o sobrenadante, lavado o *pellet* com etanol a 80%, seco o *pellet* e ressuspendido em 200 μ L de água ultrapura.

1.11.1. Análise da qualidade e concentração das soluções de DNA genômico

A análise da qualidade e concentração das amostras de DNA genômico obtidas a partir do emprego dos diferentes protocolos foi realizada por meio de um espectrofotômetro de UV-Vis NanoDrop® ND-1000 (Figura 3). O 'software' do equipamento baseia-se na equação de Lambert-Beer para correlacionar a absorvância com a concentração da amostra, de acordo com a Equação 1 (SCIENTIFIC, 2008b).

$$A = E . b . c \quad (1)$$

Em que: "A" representa a absorvância, representada em unidades de absorvância (A); "E" é o coeficiente de absorvidade molar dependente do comprimento de onda (ou coeficiente de extinção), em unidades de mol-cm L⁻¹; "b" é o comprimento do caminho, em cm; e "c" representa a concentração do analito, em mol L⁻¹ ou molaridade (M). No caso particular da quantificação de ácidos nucleicos, a equação de Lambert-Beer é modificada (Equação 2) para usar o coeficiente de extinção específico para DNA em ng-cm μL⁻¹ (SCIENTIFIC, 2008b).

$$c = (A . e) / b \quad (2)$$

Em que "c" corresponde à concentração de DNA em ng μL⁻¹; "A" é a absorvância a 260 nm (comprimento de onda correspondente ao pico de absorvância de DNA); "e", o coeficiente de extinção (para DNA é igual a 50 ng-cm μL⁻¹); e "b", a altura da coluna criada no espectrofotômetro (neste caso corresponde a 1 cm). Logo, quando o aparelho mede a absorvância a 260 nm, obtém-se um valor, que, multiplicado pelo coeficiente de extinção, indica a concentração de DNA na amostra, em ng μL⁻¹ (SCIENTIFIC, 2008b).



Figura 3 – Etapas da análise da qualidade e concentração das soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. em espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop® ND-1000. (A) Descongelamento e mistura da solução; (B) Pipetagem da solução e; (C) Análise da solução pelo 'software'. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Para a análise da qualidade das amostras, foi utilizada a razão A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} , além de uma análise isolada da absorvância a 230 nm. O 'software' do equipamento utiliza as leituras da absorvância nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm para calcular, automaticamente, as razões.

Os dados obtidos na análise de espectrofotometria tiveram a normalidade dos erros testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Foi realizada a análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi aplicado, para a comparação das médias, o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do 'software' SISVAR, versão 5.1 (FERREIRA, 2006).

Para avaliar, visualmente, a integridade das soluções de DNA, obtidas mediante o emprego dos quatro protocolos em amostras foliares secas pelos três métodos utilizados, foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de agarose a 0,8%, a 90V durante 30 min. Para avaliar sua funcionalidade, as soluções de DNA isoladas foram digeridas com a enzima de restrição *Hind* III (Invitrogen®). O mix de reação foi composto por 2 μL da enzima de restrição *Hind* III ($1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), 2 μL do tampão 10X (TRIS-HCl a 500 mM, pH 8,0; MgCl_2 a 100 mM; NaCl a 500 mM), 2 μL da amostra de DNA, e 14 μL de água ultrapura, perfazendo um volume final de 20 μL . As condições de reação de digestão pela enzima seguiram as recomendações do fabricante, a seguir descritas. As amostras foram incubadas por 1 h a 37 °C, para

a ativação da enzima, e, após, por 20 min a 65 °C, para inativar a enzima. Após, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 0,8%, a 90 V, durante 60 min. A digestão foi realizada com soluções de DNA genômico obtidas mediante o emprego dos quatro protocolos, a partir das amostras foliares selecionadas (S40, TA ou FMO).

1.11.2. Correlação entre as curvas de absorvância de DNA esperadas e observadas

Para elaborar a curva de absorvância das soluções de DNA genômico obtidas a partir dos diferentes protocolos e métodos de secagem, foi utilizado um espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, em que foram realizadas leituras de absorvância nas faixas de 220 nm à 330 nm. Para elaborar uma curva padrão de absorvância esperada para uma solução de DNA livre de contaminantes, foram utilizados dados disponíveis no Manual do Usuário do equipamento (SCIENTIFIC, 2008b).

A fim de verificar a associação entre as curvas de absorvância de DNA esperadas e observadas foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Pearson (r), que pode variar de -1 à 1, sendo que, quanto mais próximos desses valores, mais forte será a associação das variáveis em análise (próximo de -1 = correlação negativa, próximo de 1 = correlação positiva), enquanto o valor zero indica ausência de correlação. O coeficiente foi calculado por meio do 'software' BioEstat, versão 5.3 (AYRES et al, 2007), e o grau de associação entre as curvas foi determinado por meio da classificação proposta por Callegari-Jacques (2003), que está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação utilizada para avaliar o grau de correlação entre as variáveis analisadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Coeficiente r^*	Grau de correlação
0	Nula
0 - 0,3	Fraca
0,3 - 0,6	Regular
0,6 - 0,9	Forte
0,9 - 1	Muito forte
1	Perfeita

* Coeficiente r = coeficiente de correlação de Pearson. Fonte: Callegari-Jacques (2003).

1.12. Otimização de protocolo de isolamento de DNA genômico a partir de folhas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Com base nos resultados obtidos nas análises de pureza e concentração dos protocolos testados (apresentadas na seção de Resultados e discussão), foi selecionado o método proposto por Dellaporta et al. (1983). Assim, foram realizados quatro experimentos unifatoriais independentes, empregando-se a metodologia descrita anteriormente, porém efetuando-se alterações na concentração de soluções já utilizadas, como é o caso do detergente SDS e de acetato de potássio, originalmente utilizados a 20% e a 5 M, respectivamente, ou incluindo-se soluções, como a de Polivinilpirrolidona (PVP) e a de Cloreto de Sódio (NaCl), esta incluída no tampão de extração, avaliando-as em diferentes concentrações (Tabela 3), neste protocolo de isolamento de DNA genômico. Como fonte de DNA genômico foram, igualmente, utilizados 150 mg de material vegetal, proveniente de *bulks* formados pelas amostras foliares, as quais foram acondicionadas em sacos de papel pardo, para secagem natural, posteriormente, foram maceradas em gral e pistilo com o auxílio de nitrogênio líquido.

O delineamento experimental utilizado em cada um dos experimentos foi o inteiramente casualizado, em esquema unifatorial, com um total de quatro tratamentos [referentes às concentrações da solução incluída no protocolo Dellaporta et al. (1983)], conforme apresentado na Tabela 3. Em cada experimento foram empregadas oito repetições, totalizando 32 unidades experimentais.

Tabela 3 – Modificações efetuadas no protocolo Dellaporta et al. (1983), que incluíram diferentes concentrações de soluções originalmente empregadas ou uma nova solução, avaliando-se diferentes concentrações, com a finalidade de otimizar o isolamento de DNA genômico a partir de amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Solução	Concentração Testada
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	10; 15; 20* ou 25 %
Polivinilpirrolidona (PVP)	0; 1; 2 ou 3 %
Cloreto de sódio (NaCl) incluído no tampão Tris-EDTA	0; 0,5; 1 ou 1,5 M
Acetato de Potássio	2,5; 5*; 7,5 ou 10 M

* Indica a concentração originalmente utilizada no protocolo Dellaporta et al. (1983).

Na análise da qualidade das soluções de DNA genômico obtidas em cada modificação, foram utilizadas as razões A260/A230 e A260/A280, utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis. O ‘software’ do equipamento utilizou as leituras de absorvância nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm para calcular, automaticamente, as razões.

Os dados obtidos na análise de espectrofotometria tiveram a normalidade dos erros testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias, pelo teste de Bartlett. Foi realizada a análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi aplicado, para a comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software SISVAR, versão 5.1 (FERREIRA, 2006).

A fim de verificar a associação entre as curva de absorvância de DNA esperadas e observadas foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Pearson (r), que pode variar de -1 à 1, sendo que quanto mais próximos desses valores, mais forte será a associação, negativa ou positiva, das variáveis em análise, enquanto o valor zero indicará ausência de correlação. O coeficiente foi calculado por meio do ‘software’ BioEstat, versão 5.3 (AYRES et al., 2007).

Para auxiliar na seleção da(s) melhor(es) modificação(ões) foram elegidos os seguintes critérios, aos quais foram, simultaneamente, atribuídos pesos: razão A260/A230, razão A260/A280, concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) e coeficiente de correlação de Pearson (r) entre o valor esperado e aquele observado para as curvas

de absorvância das soluções de DNA (Tabela 4). De acordo com os critérios elaborados para a seleção, as melhores modificações deverão apresentar o menor escore, conforme está apresentado na Tabela 4.

Os valores para as razões A260/A230 e A260/A280, utilizados como referência para elaboração dos respectivos escores, estão em consonância com os dados obtidos na literatura, em que são considerados indicadores de uma amostra de qualidade valores na faixa de 1,6 – 1,9, para a primeira razão (PAGE, 2010), e valores na faixa de 1,8 – 2,0, para a segunda razão (SCIENTIFIC, 2008a). No que se refere à concentração de DNA, é esperado que um protocolo de isolamento seja capaz de obter altos rendimentos. Assim, quanto maior o rendimento obtido, menor o escore atribuído. Para o Coeficiente de Correlação de Pearson, valores mais próximos de 1 indicam alta correlação, entre os dados esperados e aqueles observados.

Tabela 4 – Critérios e escores atribuídos à respectiva faixa de valor considerados na seleção da(s) melhor(es) modificação(ões) efetuada(s) no protocolo de isolamento de DNA genômico Dellaporta et al. (1983), avaliadas no presente estudo em folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Critério	Escore	Faixa de Valor
Razão A260/A230	1	$1,6 \leq A260/A230 \leq 1,9$
	2	$1,9 < A260/A230 < 1,6$
Razão A260/A280	1	$1,8 \leq A260/A280 \leq 2$
	2	$2 < A260/A280 < 1,8$
Concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)	1 à 4	Decrescente
r^*	1 à 4	Decrescente

* Coeficiente de correlação de Pearson. Fonte: o autor.

1.13. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.14. Análise comparativa de quatro protocolos de isolamento de DNA genômico a partir de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. secas por três diferentes métodos

1.14.1. Análise da qualidade e concentração das soluções de DNA genômico obtidas

Para a razão A260/A230 foi verificado efeito significativo dos fatores principais protocolo de isolamento e método de secagem das amostras foliares ($p=0,000$ e $p=0,0020$, respectivamente), não sendo observada interação ($p=0,2466$) entre os fatores, o que indica que, o protocolo de isolamento não está relacionado ao método de secagem das amostras foliares. Em relação aos protocolos de isolamento, aquele desenvolvido por Ferreira e Grattapaglia apresentou o melhor resultado, diferindo de Dellaporta, o qual, por sua vez, diferiu de Khanuja e Mazza e Bittencourt, sendo que os últimos não diferiram entre si (Tabela 5). No que diz respeito aos métodos de secagem das amostras foliares, TA apresentou o melhor resultado, diferindo de FMO e S40, os quais não diferiram entre si (Tabela 5).

Tabela 5 – Médias da razão A260/A230 estimadas para as soluções de DNA genômico em função dos diferentes protocolos de isolamento e métodos de secagem das amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Protocolo de Isolamento	Método de Secagem			Média	
	S40 ¹	TA ²	FMO ³		
Dellaporta et al. (1983)	1,22	1,76	1,33	1,44	B*
Ferreira e Grattapaglia (1996)	2,33	2,60	2,64	2,52	A
Khanuja (1999)	0,65	1,32	0,69	0,89	C
Mazza e Bittencourt (2000)	0,70	0,77	0,71	0,73	C
Média	1,23 b	1,61 a	1,34 b		
CV (%)		30,89			

* Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A/a" refere-se à maior média observada. ¹ S40 = amostras secas em estufa com temperatura constante de 40 °C; ² TA = amostras secas naturalmente; e ³ FMO = amostras secas em forno Micro-ondas.

Conforme mencionado anteriormente, a razão A260/A230 é considerada uma medida secundária para de análise da pureza de amostras soluções de DNA. No entanto, pelo fato de muitas espécies vegetais apresentarem conteúdos relativamente altos de polissacarídeos e grande parte desses serem detectados a 230 nm, essa estimativa medida deve ser considerada na análise da pureza de ácidos nucléicos extraídos de plantas. Logo, para a variável em questão, os valores esperados, geralmente, situam-se na faixa de 1,6 – 1,9 (PAGE, 2010), sendo que um valor menor ou igual a 1,6 e 1,9 indicará a presença de polissacarídeos.

A maior média A260/A230 (2,52) foi obtida a partir do emprego do protocolo Ferreira e Grattapaglia, enquanto que com os outros métodos as soluções obtidas apresentaram razões bastante inferiores a 1,6. Uma vez que o método que se destacou se baseia na utilização de clorofórmio : álcool isoamílico (CIA) – o qual promove a extração de proteínas e polissacarídeos, os quais são dissolvidos nesse solvente orgânico - associado ao isopropanol, na etapa de precipitação do ácido nucléico, o alto valor da razão obtida indica que o protocolo em questão foi eficiente na remoção de polissacarídeos, porém também indica que o solvente orgânico está presente na solução de DNA genômico obtida.

Esse resultado foi ratificado pelo aspecto visual das soluções obtidas, conforme pode ser observado na Figura 4. Após a etapa final de ressuspensão do *pellet*, as soluções obtidas com os protocolos de Ferreira e Grattapaglia e Mazza e

Bittencourt, apresentaram um aspecto viscoso e coloração castanha clara (Figura 4), características de contaminação por polissacarídeos e compostos fenólicos respectivamente (SANGWAN et al., 1998; SHIODA e MARAKAMI-MUOFUSHI, 1987; TEL-ZUR et al., 1999).

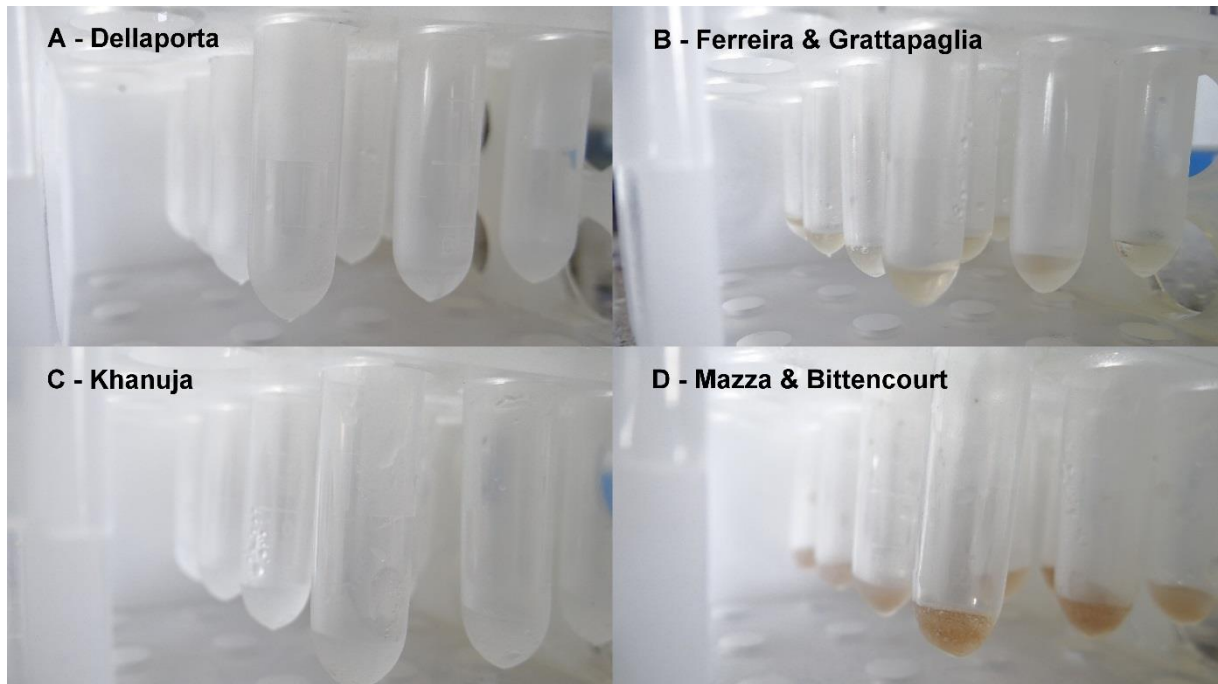


Figura 4 – Aspecto das soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. mediante o emprego dos diferentes protocolos de isolamento testados no presente estudo, independentemente do método de secagem das amostras foliares utilizado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Essa aparente contradição pode ser explicada pelo fato de que a razão A260/A230 é restrita aos polissacarídeos detectados no comprimento de onda de 230 nm, enquanto que esses compostos podem ser detectados em um amplo espectro, variando de 200 a 500 nm (NAVARINI et al., 1999). Da mesma forma, os compostos fenólicos possuem um grande espectro de absorvância, sendo, frequentemente, detectados nos comprimentos de onda de 190 a 380 nm (CICCHETTI e CHAINTREAU, 2009; KHODDAMI et al., 2013; VILLIERS et al., 2010).

A contaminação por compostos fenólicos é um problema comumente encontrado nos protocolos de isolamento de DNA (VARMA et al., 2007). Tais

compostos são liberados durante a lise celular e sofrem a ação da enzima polifenoloxidase (PFO ou PPO), que, quando em contato com o oxigênio, ocasiona um escurecimento dos compostos fenólicos (CHOUDHARY et al., 2008; LOMMIS, 1994; MOHAMMADI et al., 2009). Por fim, os polifenóis oxidados formam ligações irreversíveis com os ácidos nucleicos, conferindo às soluções de DNA, a mesma coloração.

Os resultados obtidos são ratificados pelas curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas com o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (Figuras 9,10 e 11), conforme será apresentado e discutido na sequência. Nessas curvas nota-se que o pico de absorvância ocorreu no comprimento de onda de 245 nm. Nesse sentido, Robles e Niell (1996) constataram que, no comprimento de onda de 240 nm podem ser detectadas duas formas do monossacarídeo galactose, o qual é um dos constituintes da hemicelulose da parede celular vegetal. Com relação aos polifenóis, possivelmente algum composto foi detectado no comprimento de onda de 245 nm, tendo em vista que a espécie alvo do estudo produz elevados teores de fenilpropanóides (GARCEZ et al., 2009) e, também, pelo fato desses compostos serem extremamente variáveis, tanto na sua ocorrência quanto no tipo (VARMA et al., 2007).

No que diz respeito ao método de secagem das amostras foliares, no presente estudo, aquele que empregou a temperatura ambiente (TA) produziu uma solução de DNA genômico de melhor qualidade (média da razão $A_{260}/A_{230} = 1,61$, Tabela 5), enquanto as razões observadas nos outros métodos de secagem indicam que as soluções obtidas estão relativamente mais comprometidas pela associação com polissacarídeos (1,23 e 1,34 para S40 e FMO respectivamente, Tabela 5).

Thomson e Henry (1993), de modo semelhante ao que foi realizado no presente estudo, testaram quatro métodos de secagem das amostras foliares de pêssogo (*Prunus persica*): secagem à temperatura ambiente, secagem à 42 °C ou à 65 °C e secagem em forno micro-ondas. Os autores citados anteriormente verificaram que as soluções de DNA isoladas a partir das amostras foliares secas à temperatura ambiente apresentaram resultados de pureza e rendimento equivalentes às soluções de DNA isoladas a partir das amostras frescas. Igualmente, Tai e Tanksley (1990) realizaram um estudo comparativo da extração de DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) a partir de amostras foliares frescas e secas em estufa à 45 °C, por um período de 24 h. Estes autores constataram, igualmente,

que as soluções de DNA extraídas das amostras secas foram de qualidade equivalente às isoladas de amostras frescas.

No presente estudo, ainda que as amostras foliares secas em estufa (S40) e forno micro-ondas (FMO) não tenham apresentado resultados satisfatórios, foi possível isolar DNA. Logo, pode-se inferir que, utilizando outro protocolo, que não foi incluído no presente trabalho, ou efetuando-se modificações nos protocolos testados, poderiam ser obtidas soluções de DNA genômico com qualidade e rendimento adequados.

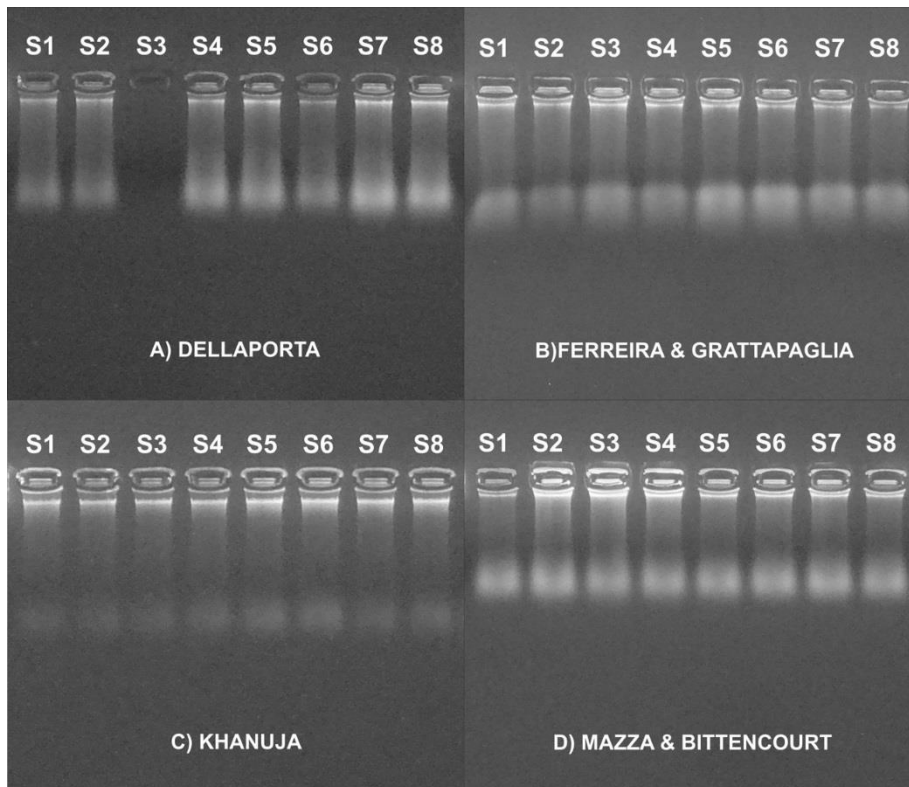


Figura 5 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas em estufa a 40 °C (S40), obtidas mediante o emprego dos quatro protocolos de isolamento de DNA avaliados. As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e coradas com Gelred®. A letra S é indicativa do método de secagem empregado (S40), enquanto os numerais representam repetições. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

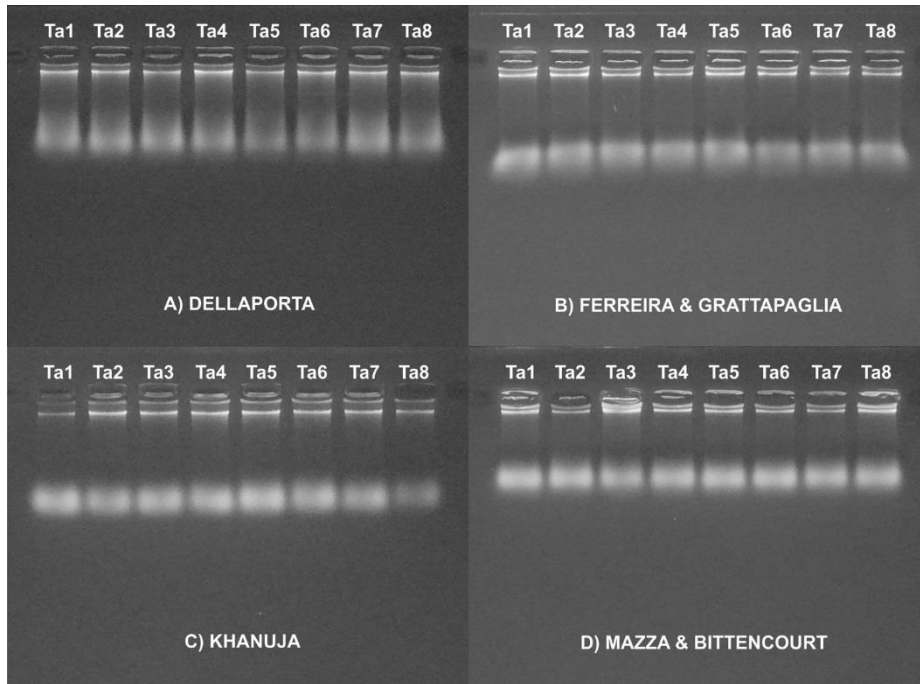


Figura 6 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas à temperatura ambiente (Ta) por 24 h, obtidas mediante o emprego dos quatro protocolos de isolamento de DNA avaliados. As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. As letras Ta são indicativas do método de secagem empregado, enquanto os numerais representam repetições. Santa Maria, RS, 2014.

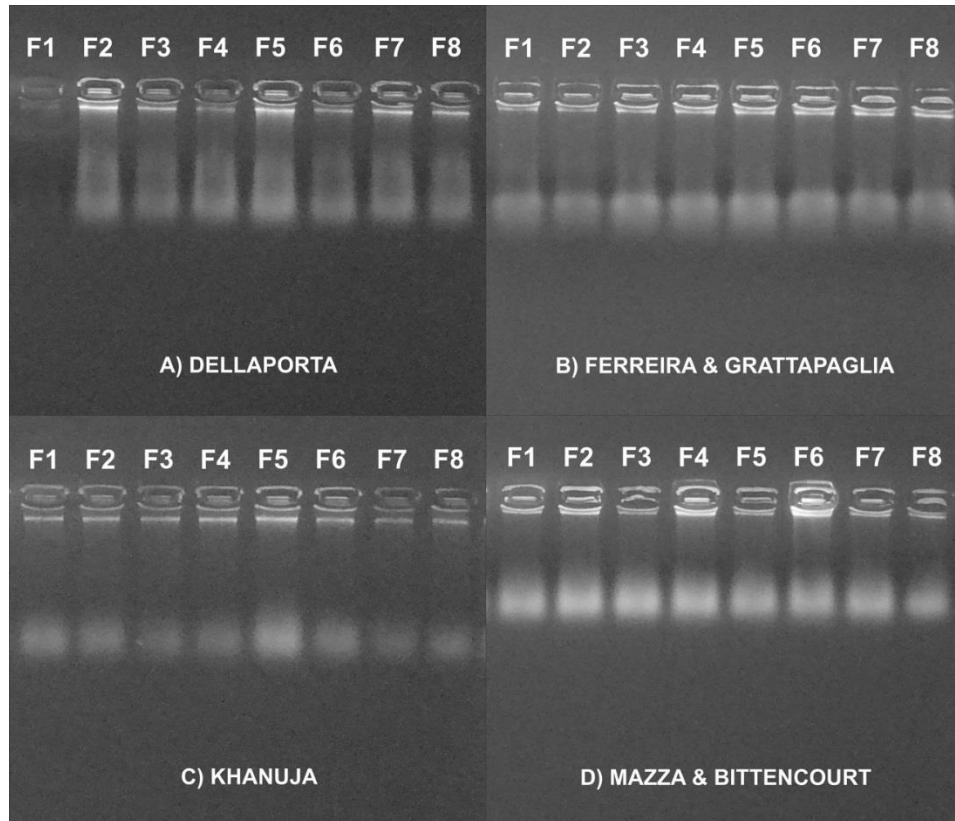


Figura 7 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas em forno de micro-ondas (FMO) por 2 min, obtidas mediante o emprego dos quatro protocolos de isolamento de DNA avaliados. As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. A letra F é indicativa do método de secagem empregado, enquanto os numerais representam repetições. Santa Maria, RS, 2014.

Ao final do procedimento de Dellaporta, que apresentou uma razão A260/A230 (1,44) inferior àquela obtida com o uso do protocolo de Ferreira e Grattapaglia (Tabela 5), as soluções obtidas não apresentaram aspecto viscoso ou coloração castanha (Figura 4). O protocolo Dellaporta baseia-se na precipitação simultânea de proteínas e polissacarídeos por altas concentrações de acetato de potássio, na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). A extração orgânica, neste caso, não é necessária, o que pode ser considerada uma vantagem em relação aos demais protocolos avaliados. Dellaporta et al. (1983) e Jobes et al. (1995) relataram que a adição de acetato de potássio forma um complexo com SDS, resultando na remoção de polissacarídeos.

Em um estudo realizado por Xu et al. (2004), referente ao isolamento de DNA de *Rosa roxburghii* Tratt, uma espécie nativa da China, conhecida por conter

elevados teores de polissacarídeos, polifenóis e metabólitos secundários, os autores verificaram que o emprego de isopropanol combinado ao acetato de sódio, na etapa de precipitação do DNA, é eficiente na remoção desses compostos. O mesmo foi constatado por Saha et al. (2010), em trabalho que comparou dois métodos de extração de DNA de *Cymbopogon winterianus* e *Cymbopogon flexuosus* (espécies vegetais com propriedades medicinais e aromáticas) e por Japelaghi e Haddad (2011), os quais isolaram DNA de espécies frutíferas ricas em polifenóis e polissacarídeos.

A fim de realizar uma análise criteriosa da variável A260/A230, a absorvância em 230 nm foi avaliada isoladamente. Para A230 foi verificado efeito significativo apenas dos protocolos de isolamento de DNA ($p=0,000$), não sendo observado efeito significativo dos métodos de secagem das amostras foliares ($p=0,3828$) nem da interação ($p=0,7930$) entre os fatores. A menor absorvância observada foi no protocolo de Dellaporta (2,92), seguido pelo de Ferreira e Grattapaglia (3,12) e Mazza e Bittencourt (3,63), os quais não diferiram entre si, mas diferiram de Khanuja (19,52) (Tabela 6).

A priori, considerando-se apenas a absorvância a 230 nm (pico de absorvância de polissacarídeos), com exceção do protocolo Khanuja, os demais apresentaram valores considerados baixos, podendo, assim, serem considerados eficientes na remoção desses compostos durante o isolamento de DNA. No entanto, conforme será apresentado e discutido na sequência, os protocolos de Ferreira e Grattapaglia e Mazza e Bittencourt tiveram os picos de absorvância em 245 nm e 220 nm, respectivamente, enquanto o protocolo de Dellaporta teve o pico de absorvância em 260 nm (pico de absorvância de DNA) (Figuras 9, 10 e 11).

Dessa forma, analisando-se somente a razão A260/A230 e a variável A230, isoladamente, não é possível decidir qual dos protocolos estudados é o mais eficiente na remoção de polissacarídeos. Ao passo que, incluindo-se a análise da curva de absorvância de 220 a 330 nm, é possível concluir que o protocolo de Dellaporta foi mais eficiente na remoção de polissacarídeos, devido ao uso de SDS associado a acetato de potássio, conforme discutido anteriormente.

Tabela 6 – Médias de absorvância no comprimento de onda de 230 nm das soluções de DNA genômico em função dos diferentes protocolos de isolamento e métodos de secagem das amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Protocolo de Isolamento	Método de Secagem				
	S40 ¹	TA ²	FMO ³	Média	
Dellaporta et al. (1983)	2,49	4,09	2,18	2,92	B
Ferreira e Grattapaglia (1996)	3,04	3,18	3,15	3,12	B
Khanuja (1999)	18,37	20,45	19,76	19,52	A
Mazza e Bittencourt (2000)	2,51	3,43	4,94	3,63	B
Média	6,60 a	7,79 a	7,11 a		
CV(%)			47,57		

* Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A/a" refere-se à maior média observada. ¹ S40 = amostras secas em estufa com temperatura constante de 40 °C; ² TA = amostras secas naturalmente; e ³ FMO = amostras secas em forno Micro-ondas.

A análise da razão A260/A280 revelou efeito significativo do fator principal protocolo de isolamento ($p=0,0000$) e não significativo do método de secagem das amostras foliares ($p=0,0944$), sendo verificada interação ($p=0,0020$) entre os fatores. Esse resultado indica que, dependendo do protocolo de isolamento a ser utilizado, devido às diferentes combinações de reagentes de cada procedimento e do tipo de secagem da amostra foliar, que pode alterar a constituição química do material, ocorre uma variação na razão A260/A280. As razões médias observadas estão apresentadas na Tabela 7.

Considerando-se que, para a razão A260/A280, o valor esperado deve situar-se entre 1,8 e 2,0 e, simultaneamente, que valores inferiores a 1,8 e superiores a 2,0 indicam contaminação por proteínas (SCIENTIFIC, 2008a), os melhores resultados obtidos, no presente estudo, foram observados com os protocolos Dellaporta, independentemente do método de secagem das amostras foliares, Ferreira e Grattapaglia com secagem FMO e Mazza e Bittencourt, com TA e FMO.

O isolamento de soluções de DNA das amostras que foram secas pelo método TA utilizando o protocolo de Mazza e Bittencourt e Dellaporta apresentaram valores da razão A260/A280 dentro da faixa esperada, 1,8 e 2,05, respectivamente. O procedimento Mazza e Bittencourt foi o único testado, no presente estudo, que faz uso de Proteinase K associada ao tampão de extração, além de duas etapas de extração com CIA. O uso de Proteinase K é recomendando por atuar como

desnaturante de proteínas, remover contaminantes e inativar enzimas que degradam o DNA (VARMA et al., 2007). Doosty et al. (2012) utilizaram a Proteinase K e obtiveram valores de A260/A280 que variou entre 1,8 e 1,9 em *Satureja khuzistanica*, uma espécie conhecida pelas suas propriedades medicinais. De modo semelhante, Shankar et al. (2011), isolaram DNA genômico de cultivares de banana (*Musa sp.*) e obtiveram valores entre 1,76 e 1,88; confirmando a qualidade das soluções de DNA resultantes da digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Hind III*.

O SDS, por sua vez empregado no procedimento Dellaporta, é um agente detergente que atua como solubilizante de lipídios e desnaturante de proteínas, ajudando na separação desses compostos do ácido nucléico (SHARMA et al., 2008). Keb-Lannes et al. (2002) utilizaram acetato de potássio a 5M e isopropanol combinado a acetato de sódio a 3M e obtiveram uma razão A260/A280 que oscilou entre 1,64 e 2,05; sendo amplificado com sucesso por meio de marcadores do tipo Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (em inglês 'Amplified Fragments Length Polymorphism - AFLP'). Ogunkanmi et al. (2008) utilizaram o protocolo de Dellaporta e obtiveram uma razão A260/A280 que variou entre 1,7 e 1,9 nas soluções de DNA genômico resultantes, as quais foram capazes de amplificação pela técnica de marcadores de DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (em inglês 'Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD'). Moyo et al. (2008) obtiveram uma razão que variou entre 1,76 e 2,0; sendo verificada sua qualidade para aplicações posteriores por meio de digestão com a enzima de restrição *EcoRI*.

Tabela 7 – Médias da razão A260/A280 estimadas para as soluções de DNA genômico, em função da interação entre os diferentes protocolos de isolamento e métodos de secagem das amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Protocolo de Isolamento	Método de Secagem									
	S40 ¹			TA ²			FMO ³			Média
Dellaporta et al. (1983)	2,17	b	A	2,05	b	A	2,14	b	A	2,12
Ferreira e Grattapaglia(1996)	2,41	a	A	2,21	a	A	2,29	b	A	2,30
Khanuja (1999)	2,40	a	B	2,25	a	B	2,57	a	A	2,40
Mazza e Bittencourt (2000)	1,55	c	B	1,80	c	A	1,70	c	A	1,68
Média	2,13			2,08			2,17			
CV (%)										8,32

* Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A/a" refere-se à maior média observada. ¹ S40 = amostras secas em estufa com temperatura constante de 40 °C; ² TA = amostras secas naturalmente; e ³ FMO = amostras secas em forno Micro-ondas.

Em relação à concentração, houve diferença significativa entre os protocolos de isolamento e os métodos de secagem das amostras foliares ($p=0,0000$), não sendo verificada interação significativa ($p=0,1337$) entre esses fatores (Tabela 8). Na análise da concentração, o protocolo de Mazza e Bittencourt destacou-se pela superioridade na quantidade de DNA isolado, independentemente do método de secagem das amostras foliares empregado. A hipótese é de que o uso da Proteinase K seja responsável por essa eficiência, uma vez que essa enzima atua na inibição da atividade de hidrolases, em particular as nucleases, enzimas que atuam, especificamente, na clivagem de ácidos nucléicos (ALEKSANDRUSHKINA e VANYUSHIN, 2009; OH et al., 2013; SAMEJIMA e EARNSHAW, 2005). Essas enzimas encontram-se, naturalmente, nos vacúolos nas células vegetais (BOLLER e KENDE, 1979; WILSON, 1975), sendo liberadas durante a lise celular junto com o DNA, que é, posteriormente, degradado pelas nucleases. Logo, a inexistência de uma enzima capaz de inibir a ação das nucleases acarreta em uma redução significativa na quantidade de DNA isolado, como pode ser observado na Tabela 8, nos três protocolos que não incluem a proteinase K.

Tabela 8 – Médias de concentração (ng μL^{-1}) estimadas para as soluções de DNA genômico, em função dos diferentes protocolos de isolamento e métodos de secagem das amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Protocolo de Isolamento	Método de secagem			Média	
	S40 ¹	TA ²	FMO ³		
Dellaporta et al. (1983)	174,41	362,04	157,49	231,31	C
Ferreira e Grattapaglia (1996)	351,55	502,26	408,96	420,93	B
Khanuja (1999)	79,28	243,07	81,32	134,55	D
Mazza e Bittencourt (2000)	547,74	849,57	676,25	691,19	A
Média	288,24 b	489,24 a	331,00 b		
CV (%)	25,43				

* Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A/a" refere-se ao melhor resultado. ¹ S40 = amostras secas em estufa com temperatura constante de 40 °C; ² TA = amostras secas naturalmente; e ³ FMO = amostras secas em forno Micro-ondas.

No que diz respeito à secagem das amostras foliares, a secagem à temperatura ambiente (TA) sobressaiu-se em relação aos demais métodos testados, os quais não diferiram entre si (Tabela 8).

Entretanto, deve-se ressaltar que a concentração média das soluções de DNA obtidas com o emprego de qualquer um dos protocolos de isolamento (Khanuja, Dellaporta e Ferreira e Grattapaglia) ou método de secagem das amostras foliares (S40 e FMO) considerados menos eficientes neste quesito, no presente estudo, possibilitaria sua posterior aplicação em análises moleculares. Para ilustrar, Feng et al. (2009) estudaram a diversidade genética de *Pinus koraiensis* por meio de marcadores moleculares do tipo Polimorfismo Amplificado relacionado à Sequência (em inglês 'Sequence Related Amplified Polymorphism – SRAP), utilizando 50 ng de DNA 'template' em reações de PCR. Hanai et al. (2010), em um estudo referente à variabilidade genética de indivíduos da espécie *Ocotea catharinensis* com marcadores moleculares RAPD, utilizaram de 10 a 20 ng de DNA.

Na análise das soluções de DNA por meio de eletroforese em gel de agarose, de maneira geral, pode-se observar que os quatro protocolos testados isolaram DNA íntegro independentemente do método de secagem das amostras foliares (Figura 5, 6 e 7). Com relação à intensidade das bandas formadas, que indica a concentração de DNA nas amostras, a análise visual ratificou os resultados obtidos na análise da concentração em espectrofotômetro (Tabela 8). O protocolo de Khanuja apresentou

as bandas de menor intensidade nos três métodos de secagem das amostras foliares, confirmando a menor concentração de DNA extraída em relação aos demais protocolos (Figura 5, 6 e 7). O procedimento Mazza e Bittencourt apresentou as bandas de maior intensidade em S40, TA e FMO, comprovando a alta concentração de DNA obtida nas soluções.

Na análise da digestão das soluções de DNA, por meio da enzima de restrição *Hind* III (Figura 8), é possível observar que apenas o DNA isolado com o protocolo Dellaporta foi digerido. A digestão de amostras de DNA por meio de endonucleases requer grandes quantidades de DNA, de alta qualidade (BORSE et al., 2011). Com relação à qualidade, a razão A260/A230, que indica a presença de contaminantes fenólicos e polissacarídeos, sendo esses inibidores da atividade de endonucleases, apenas as soluções de DNA obtidas pelo emprego do protocolo Dellaporta apresentaram um valor dentro da faixa esperada (1,6 – 1,9). Os demais protocolos produziram soluções de DNA genômico fora dessa faixa esperada, indicando a presença de contaminantes, o que impediu a digestão do DNA.

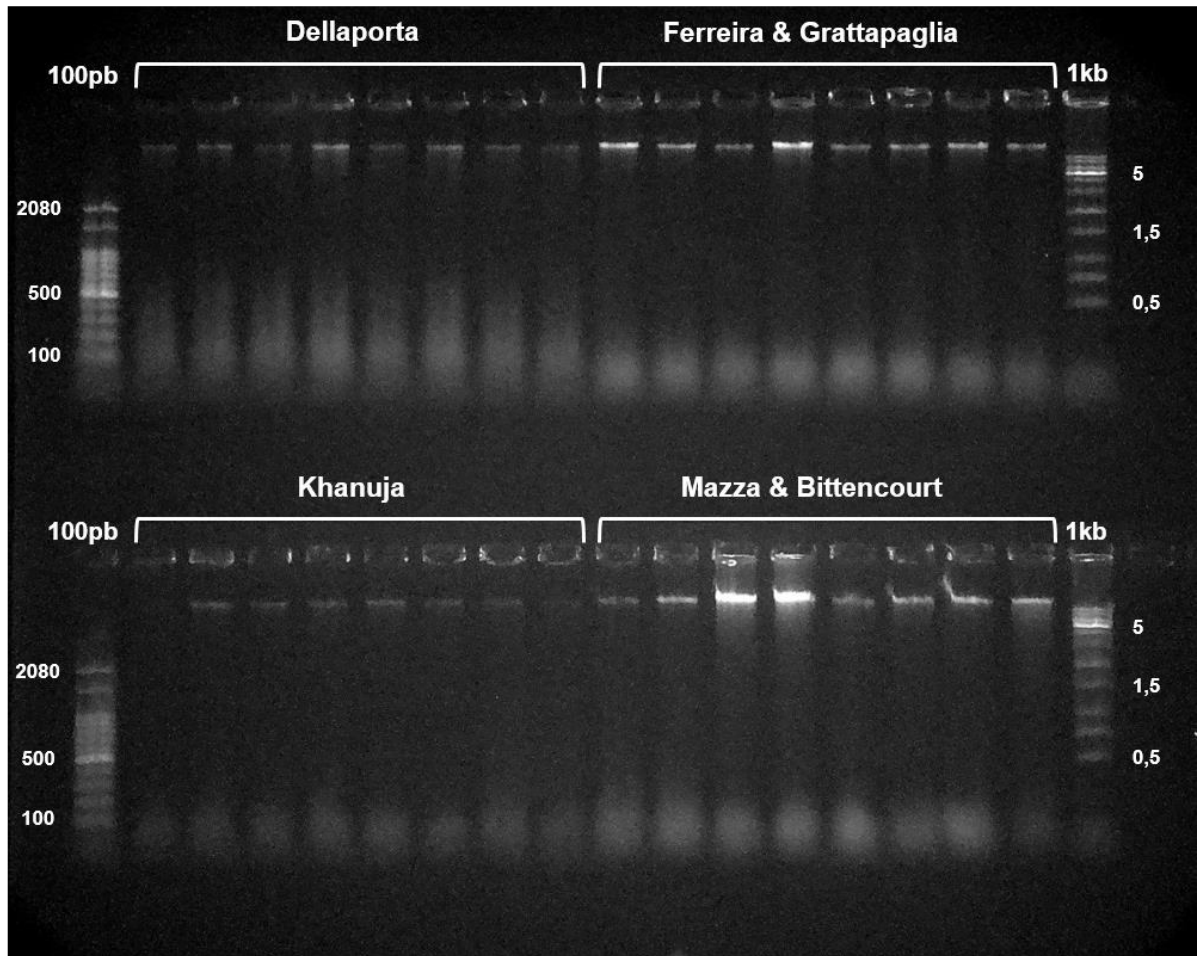


Figura 8 – Gel de agarose a 1% evidenciando a funcionalidade relativa das soluções de DNA genômico de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., obtidas por meio do emprego dos quatro protocolos de isolamento estudados, após reações de digestão com a enzima de restrição *Hind* III. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

1.14.2. Correlação entre a curva de absorvância de DNA esperada e observada

A análise da correlação da curva de absorvância de uma solução de DNA pura com as curvas das soluções de DNA obtidas, revelou que, para as amostras foliares secas pelo método S40, o maior Coeficiente de Correlação de Pearson foi observado com o emprego do protocolo Dellaporta (Tabela 9). O valor r obtido (0,9581) indica um grau de correlação muito forte entre a curva esperada e àquela observada. Analisando-se a Figura 9, é possível observar que somente as soluções de DNA obtidas com o procedimento Dellaporta tiveram o pico de absorvância em 260 nm. As demais, resultantes dos protocolos Ferreira e Grattapaglia apresentaram

o pico em 245 nm, enquanto aquelas de Khanuja, em 220 nm e Mazza e Bittencourt, em 225 nm.

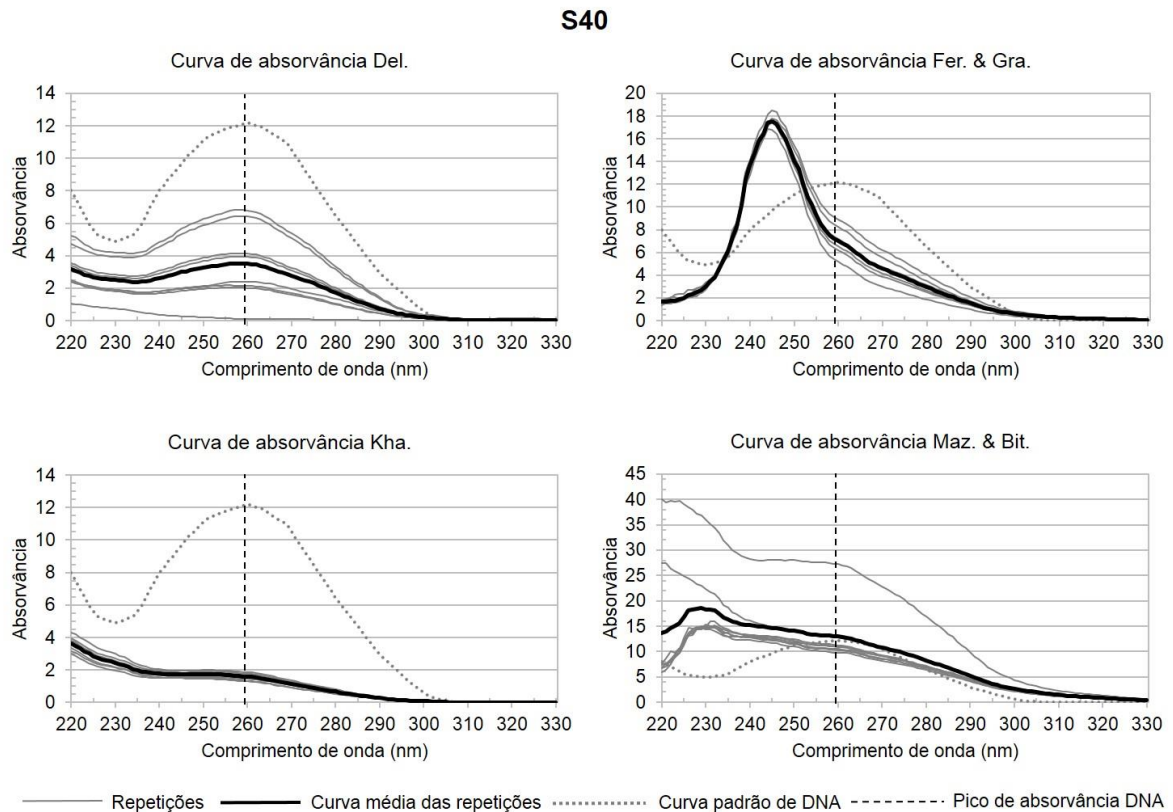


Figura 9 – Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas previamente em estufa a 40 °C (S40), mediante o emprego de diferentes protocolos. Del = Dellaporta; Fer. e Gra. = Ferreira e Grattapaglia; Kha = Khanuja; Maz. e Bit. = Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Tabela 9 – Matriz de correlação entre a curva de absorvância de soluções de DNA isoladas por meio do emprego dos diferentes protocolos a partir de amostras foliares secas em estufa a 40 °C (S40) e a curva padrão de uma solução de DNA pura (abaixo da diagonal) e matriz dos valores de probabilidade de erro 'p' (acima da diagonal). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

	CP ¹	F ²	M ³	D ⁴	K ⁵
CP	1	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
F	0,7336	1	0,0001	0,0001	0,0001
M	0,7800	0,6602	1	0,0001	0,0001
D	0,9581	0,7201	0,9149	1	0,0001
K	0,6673	0,5121	0,9306	0,8469	1

¹CP = curva padrão de DNA; ²F = Ferreira e Grattapaglia; ³M = Mazza e Bittencourt; ⁴D = Dellaporta; ⁵K = Khanuja.

Para as soluções de DNA obtidas a partir de amostras foliares secas à temperatura ambiente (TA), a maior correlação foi obtida utilizando-se o protocolo Dellaporta, com $r = 0,9873$ (Tabela 10), indicando um grau de correlação muito forte entre a curva esperada e observada, sendo o maior coeficiente obtido entre os três métodos de secagem das amostras foliares testadas. Esse resultado ratifica os resultados e as discussões anteriormente apresentados, em que as amostras TA foram superiores às demais em relação à qualidade da solução de DNA extraído.

Analisando-se a Figura 10, os picos de absorvância das soluções TA seguiram o mesmo padrão das amostras S40, em que somente as amostras isoladas com o protocolo Dellaporta apresentaram o pico de absorvância em 260 nm. Ferreira e Grattapaglia apresentaram em 245 nm, enquanto Khanuja e Mazza e Bittencourt, em 220 nm.

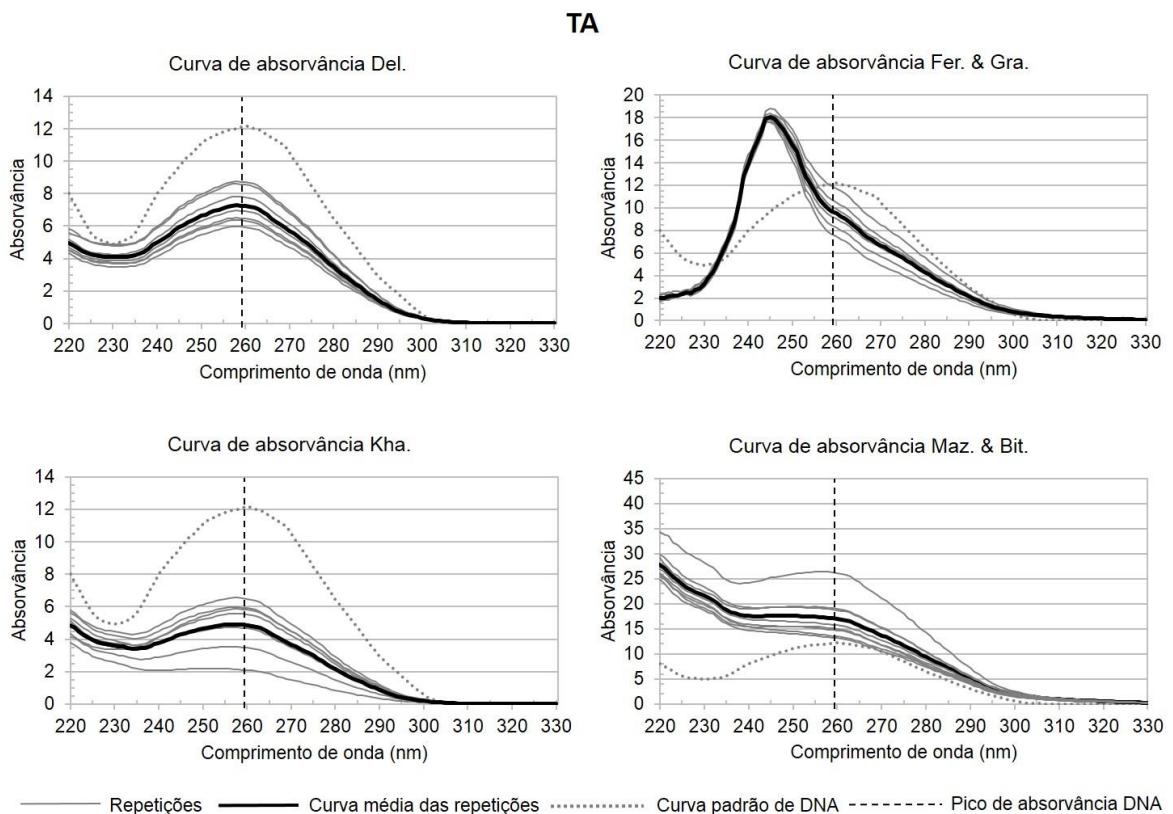


Figura 10 – Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas a temperatura ambiente (TA), mediante o emprego de diferentes protocolos. Del = Dellaporta; Fer. e Gra. = Ferreira e Grattapaglia; Kha = Khanuja; Maz. e Bit. = Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Tabela 10 – Matriz de correlação entre a curva de absorvância de soluções de DNA isoladas por meio do emprego dos diferentes protocolos a partir de amostras foliares secas a temperatura ambiente (TA) e a curva padrão de uma solução de DNA pura (abaixo da diagonal) e matriz dos valores de probabilidade de erro 'p' (acima da diagonal). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

	CP ¹	F ²	M ³	D ⁴	K ⁵
CP	1	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
F	0,8152	1	0,0001	0,0001	0,0001
M	0,7792	0,6165	1	0,0001	0,0001
D	0,9873	0,8171	0,856	1	0,0001
K	0,9401	0,7761	0,9395	0,9793	1

¹CPD = curva padrão de DNA; ²F = Ferreira e Grattapaglia; ³M = Mazza e Bittencourt; ⁴D = Dellaporta; ⁵K = Khanuja.

As soluções FMO também seguiram o padrão descrito para as S40 e TA, em que Dellaporta apresentou o maior coeficiente de correlação, $r = 0,9603$ (Tabela 11). Analisando-se a Figura 11, novamente pode-se observar que as soluções de DNA isoladas com o protocolo Dellaporta apresentaram o pico de absorvância em 260 nm. Ferreira e Grattapaglia em 245 nm, Khanuja e Mazza e Bittencourt em 220 nm.

FMO

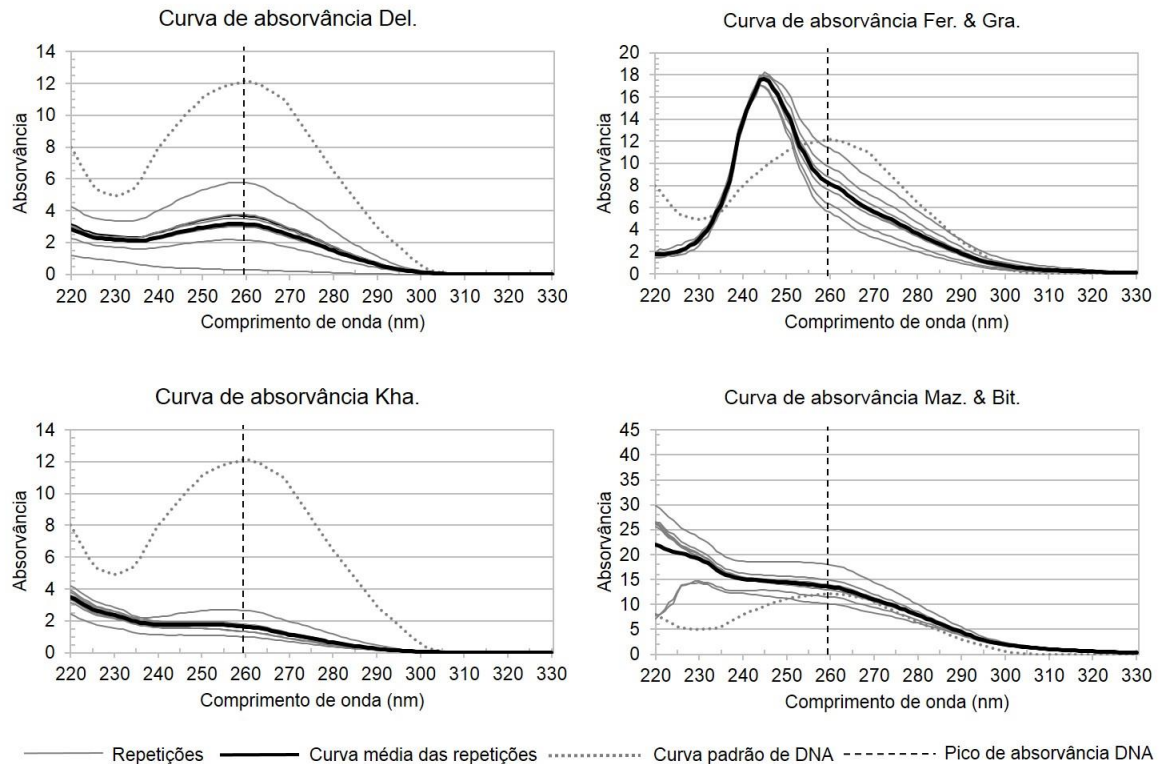


Figura 11 – Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas a temperatura ambiente (TA), mediante o emprego de diferentes protocolos. Del = Dellaporta; Fer. e Gra. = Ferreira e Grattapaglia; Kha = Khanuja; Maz. e Bit. = Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Tabela 11 – Matriz de correlação entre a curva de absorvância de soluções de DNA isoladas por meio do emprego dos diferentes protocolos a partir de amostras foliares secas a temperatura ambiente (TA) e a curva padrão de uma solução de DNA pura (abaixo da diagonal) e matriz dos valores de probabilidade de erro 'p' (acima da diagonal). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

	¹ CP	² F	³ M	⁴ D	⁵ K
CP	1	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
F	0,7778	1	0,0001	0,0001	0,0001
M	0,749	0,5907	1	0,0001	0,0001
D	0,9603	0,7558	0,8984	1	0,0001
K	0,6923	0,5377	0,9863	0,8609	1

¹CPD = curva padrão de DNA; ²F = Ferreira e Grattapaglia; ³M = Mazza e Bittencourt; ⁴D = Dellaporta; ⁵K = Khanuja.

A análise das curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas permitiu verificar os picos de absorvância, possibilitando, assim, uma análise mais detalhada

e confiável da qualidade das soluções obtidas. Conforme discutido anteriormente, devido à grande diversidade de polifenóis, polissacarídeos e metabólitos secundários existentes em espécies florestais, esses compostos podem ser detectados em um amplo espectro de comprimento de onda, além daqueles considerados nas razões A260/A230 e A260/A280, implicando na necessidade de incluir esse tipo de análise nos procedimentos de isolamento de soluções de DNA.

1.15. Otimização do protocolo Dellaporta et al. (1983) para isolamento de soluções de DNA genômico a partir de folhas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Na análise das diferentes concentrações de SDS, não foi verificado efeito significativo sobre a variável-resposta razão A260/A230 ($p=0,3579$), sendo observado efeito significativo sobre a razão A260/A280 e, igualmente, sobre a concentração de DNA ($p=0,0013$ e $p=0,0417$ respectivamente). O SDS é um detergente aniônico que atua como solubilizador de membranas e desnaturante de proteínas, promove a dissociação das proteínas ligadas aos ácidos nucleicos e age, ainda, como inibidor da ação das nucleases (MOORE et al., 2004).

Analisando-se a Figura 12, observa-se que, para a razão A260/A230, embora não tenha sido verificado efeito significativo das diferentes concentrações de SDS, as médias dessa variável, utilizando-se concentrações de SDS a 10%, 20% e 25%, apresentaram-se dentro da faixa esperada de 1,6 – 1,9, enquanto que, a 15%, o valor ficou acima do esperado. Já para a razão A260/A280, as médias observadas foram muito próximas, em todas as concentrações, no entanto, o resultado de SDS a 20% diferiu significativamente dos demais, representando, igualmente, o valor mais próximo ao esperado. De modo semelhante, Shan et al. (2008), testando diferentes concentrações de SDS, verificaram que a maior razão A260/A280, bem como a maior concentração de DNA na solução, foi resultado da utilização de SDS a 18%. No que se refere à concentração de DNA, concentrações de SDS a 15%, 20% e 25% resultaram nas maiores médias, que diferiram significativamente apenas da concentração 10% (Figura 13).

Analisando-se a Figura 14, observa-se que todas as concentrações de SDS resultaram em amostras de DNA íntegras, com destaque para SDS a 15 e a 25%, que apresentaram a maior intensidade de bandas, correspondendo à maior concentração de DNA.

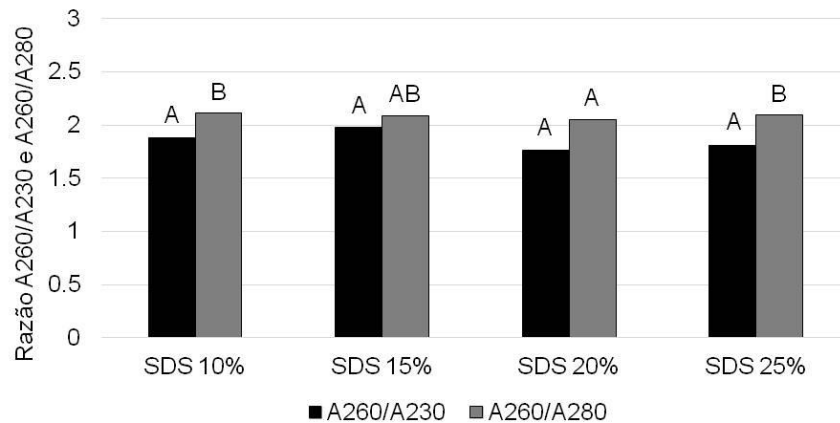


Figura 12 – Médias observadas para as razões A260/A230 e A260/A280 e para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

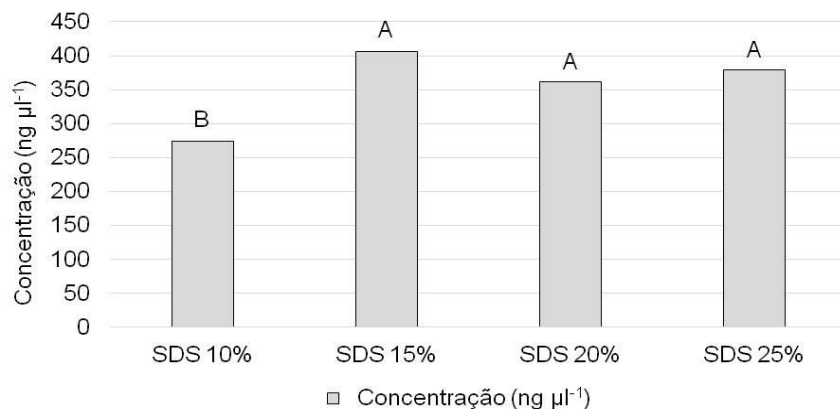


Figura 13 – Médias observadas para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

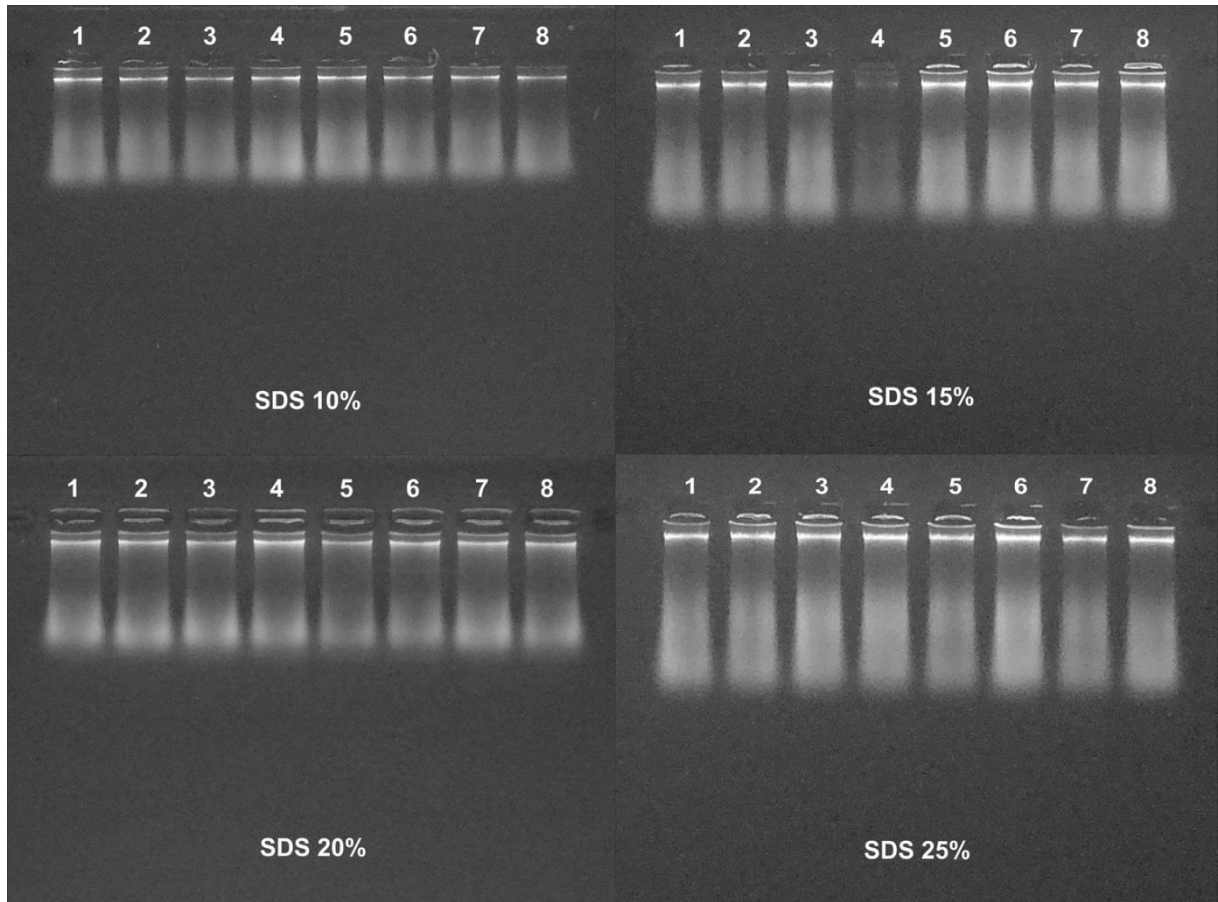


Figura 14 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas à temperatura ambiente, obtidas mediante o emprego de quatro diferentes concentrações de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) no protocolo de Dellaporta et al. (1983). As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. Santa Maria, RS, 2014.

Na análise das diferentes concentrações de PVP, foi verificado efeito significativo sobre a razão A260/A280 e sobre a concentração de DNA nas soluções ($p=0,0000$ e $p=0,0045$ respectivamente) e não significativo sobre a razão A260/A230 ($p=0,2562$), da mesma maneira ao que foi observado em relação ao SDS. O PVP é, comumente, utilizado para remover compostos fenólicos, juntamente com elevadas concentrações de NaCl, para inibir a coprecipitação de polissacarídeos com o DNA (BORSE et al., 2011).

Igualmente ao que foi discutido anteriormente em relação ao SDS, embora não tenha sido verificado efeito significativo das concentrações de PVP sobre a razão A260/A230, houve um incremento, em relação à ausência de PVP, no valor dessa variável dentro da faixa esperada de 1,6 – 1,9 utilizando-se PVP a 1 ou a 2%,

como pode ser observado na Figura 15. Tal incremento pode ser explicado pelo fato de o PVP formar complexos por meio de pontes de hidrogênio com os compostos polifenólicos, que podem ser separados do DNA por centrifugação (MALIYAKAL, 1992). Lodhi et al. (1994), em um estudo referente à extração de DNA de cultivares de framboesa (*Rubus idaeus*) e maçã (*Malus domestica*), verificaram que o uso de PVP a 1% foi eficiente na remoção de polifenóis e polissacarídeos.

Já para a razão A260/A280, todas as concentrações de PVP avaliadas diferiram entre si, sendo observado um aumento no valor da razão diretamente relacionado ao aumento na concentração de PVP. Em consequência, a ausência de PVP no procedimento de isolamento resulta em uma razão A260/A280 mais adequada. No que se refere à concentração de DNA (Figura 16), igualmente, o melhor resultado foi obtido na ausência de PVP, o qual diferiu daquele observado com o emprego das demais concentrações (PVP a 1, a 2 e a 3%). Tal comportamento também foi verificado por Shan et al. (2008), em que o aumento na concentração de PVP resultou em uma redução significativa na concentração de DNA. Analisando-se a Figura 17, pode-se observar que todas as concentrações de PVP resultaram em amostras de DNA íntegras, com destaque para PVP a 2 e a 3%, que apresentaram a menor intensidade de bandas, correspondendo à menor concentração de DNA.

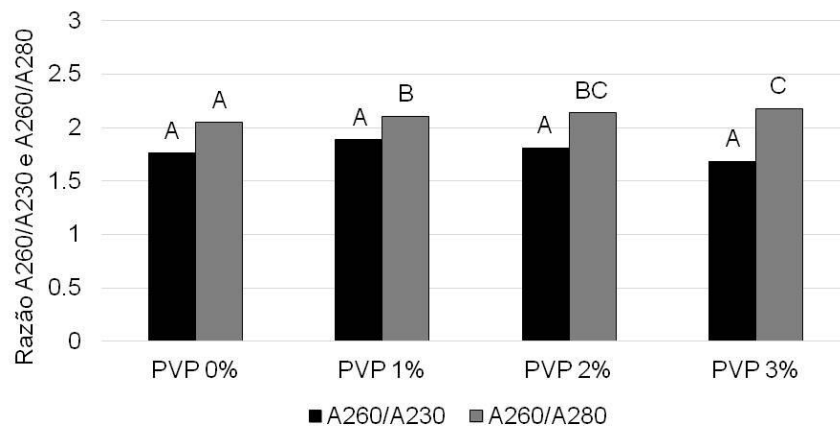


Figura 15 – Médias observadas para as razões A260/A230 e A260/A280 e para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Polivinilpirrolidona (PVP) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

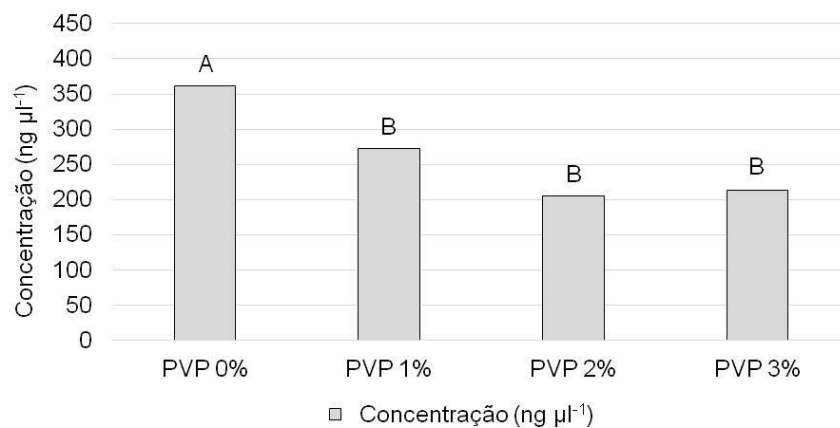


Figura 16 - Médias observadas para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Polivinilpirrolidona (PVP) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

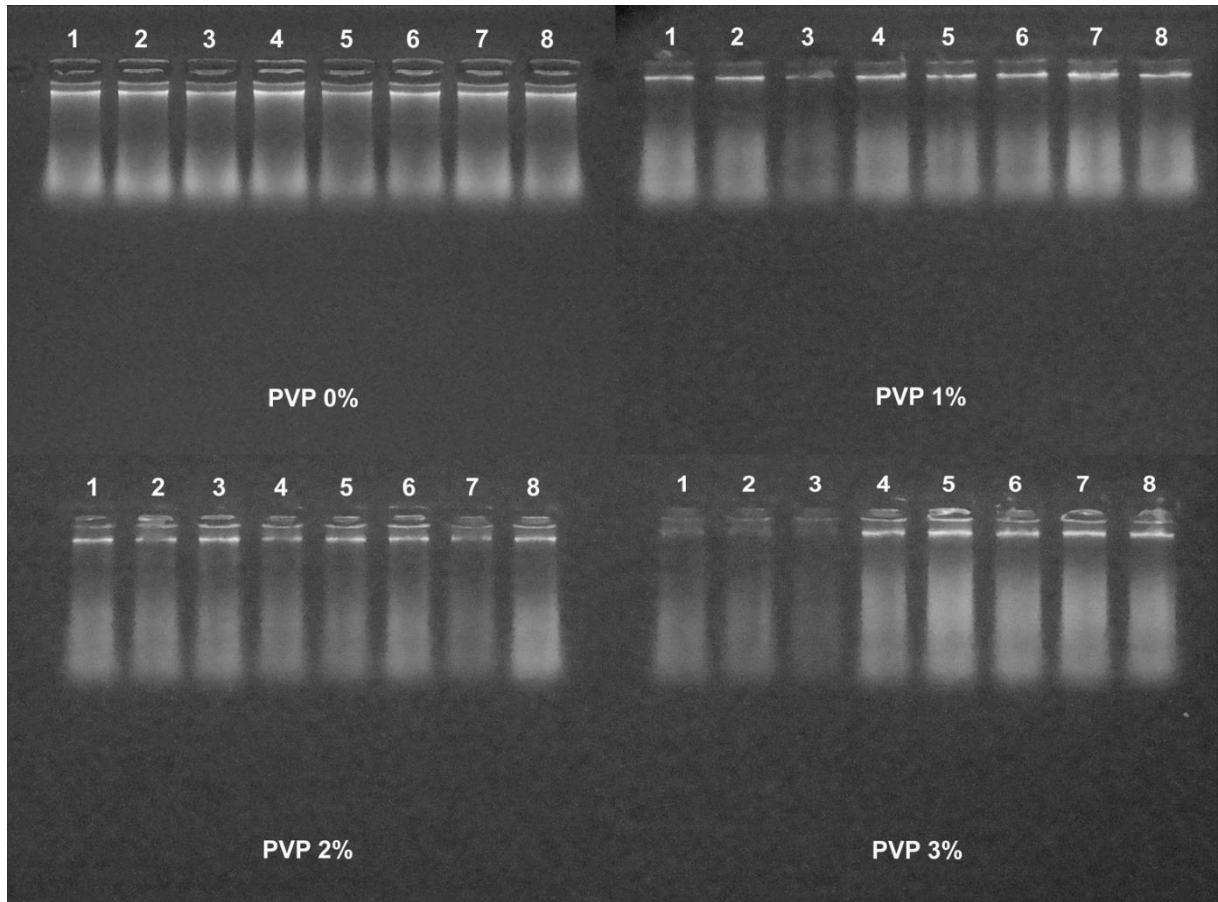


Figura 17 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas à temperatura ambiente, obtidas mediante o emprego de quatro diferentes concentrações de Polivinilpirrolidona (PVP) no protocolo de Dellaporta et al. (1983). As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. Santa Maria, RS, 2014.

Na análise das diferentes concentrações de Acetato de Potássio foi verificado efeito significativo sobre a razão A260/A230, A260/A280 e, também, sobre a concentração de DNA ($p=0,0081$; $p=0,0000$; $p=0,0000$ respectivamente). O acetato de potássio é, normalmente, utilizado após a incubação da amostra com o tampão de extração, extraindo proteínas e polissacarídeos por precipitação, os quais são, posteriormente, removidos por centrifugação (HERZER, 2001). Sua aplicação visa, basicamente, à purificação do DNA, por meio de uma precipitação seletiva, em que o complexo SDS-proteínas é precipitado (CARRIER et al., 2011).

Os melhores resultados, para todas as variáveis, podem ser obtidos com o emprego da concentração original (a 5 M) do protocolo Dellaporta et al. (1983), como pode ser observado na Figura 18. Para a razão A260/A230 as concentrações

de 5 M e 7,5 M de Acetato de Potássio, apresentaram os melhores resultados e não diferiram entre si, diferindo, porém, de 2,5 e 10 M. No que se refere à razão A260/A280, o melhor resultado foi verificado a 5 M, o qual diferiu das demais concentrações avaliadas. Para a concentração de DNA (Figura 19), o maior valor foi verificado a 5 M, o qual diferiu daqueles observados a 2,5 e a 7,5 M; os quais diferiram da concentração 10 M.

Tan et al. (2013), em um estudo comparativo de seis métodos de extração de DNA de *Vigna unguiculata* L. Walp, verificaram que o protocolo Dellaporta et al. (1983) apresentou os melhores resultados no que se refere à pureza, qualidade e integridade do DNA, em decorrência do uso de Acetato de Potássio a 5 M. Ribeiro e Lovato (2007), igualmente, realizaram um estudo comparando cinco protocolos de isolamento de DNA de espécies do gênero *Dalbergia*, utilizando amostras foliares frescas e de herbário, e constataram que os protocolos de Dellaporta et al. (1983) e Jobes et al. (1995) resultaram em soluções de DNA de melhor qualidade, o que teria sido decorrente do uso de Acetato de Potássio a 5 M, que ambos compartilham.

Analisando-se a Figura 20, pode-se observar que todas as concentrações de Acetato de Potássio resultaram em soluções de DNA íntegras, com destaque para as concentrações 2,5; 7,5 e 10 M, que apresentaram a menor intensidade de bandas, correspondendo a menores concentrações de DNA.

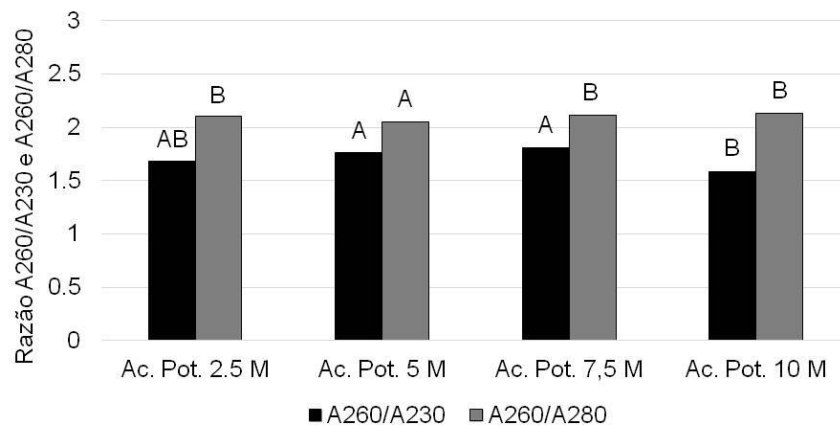


Figura 18 – Médias observadas para as razões A260/A230 e A260/A280 e para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Acetato de Potássio no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

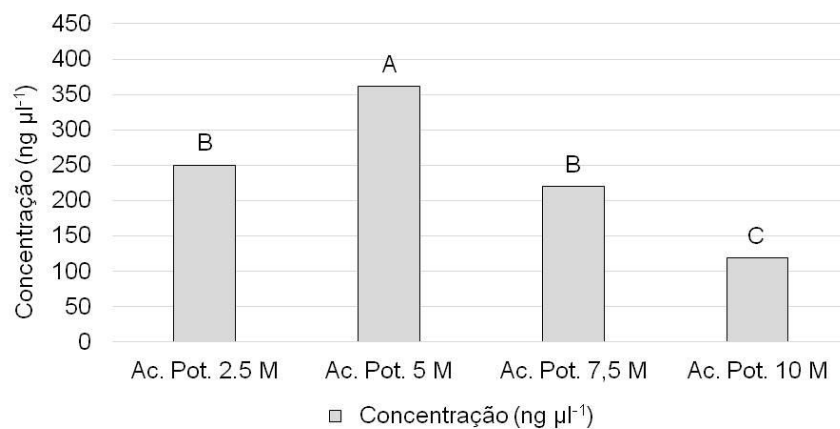


Figura 19 - Médias observadas para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Acetato de Potássio no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

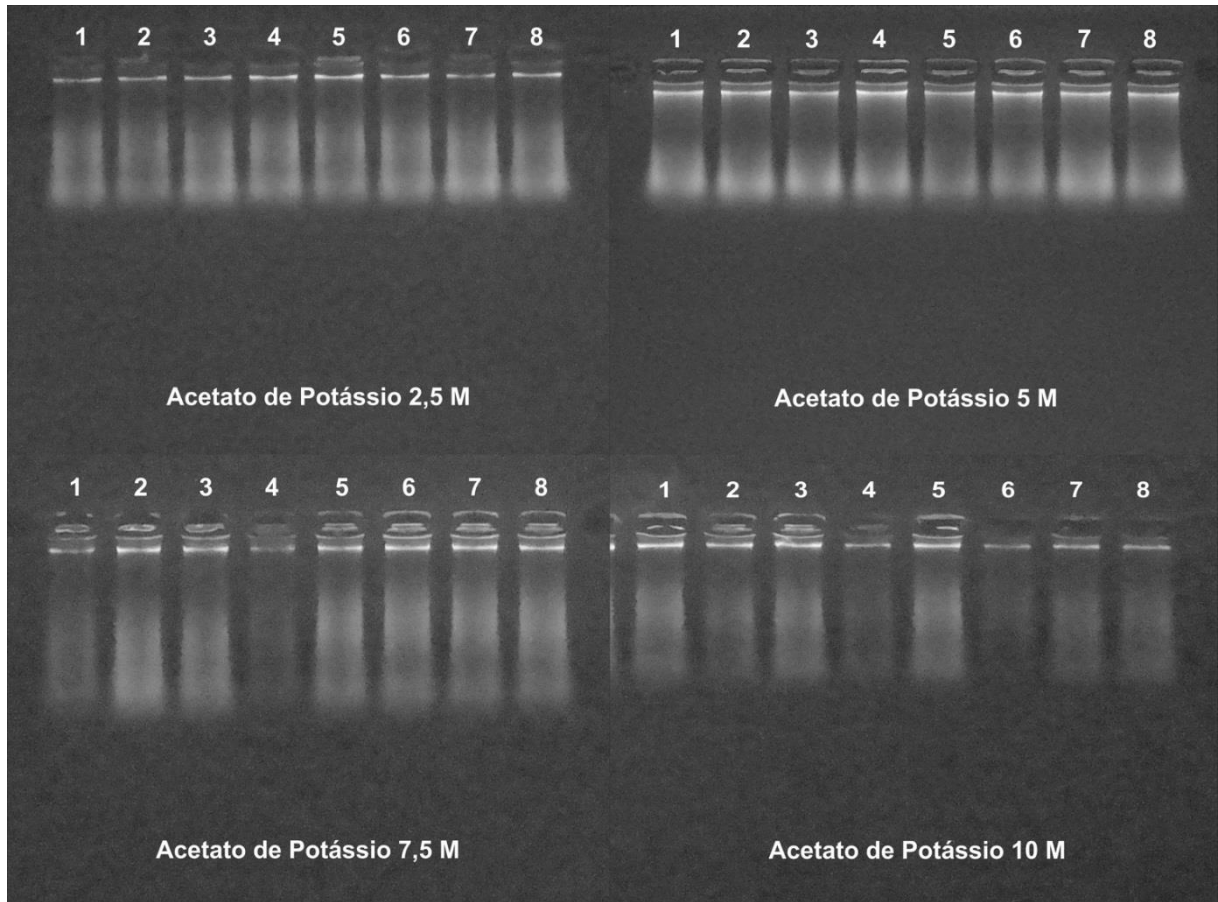


Figura 20 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas à temperatura ambiente, obtidas mediante o emprego de quatro diferentes concentrações de Acetato de Potássio no protocolo de Dellaporta et al. (1983). As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. Santa Maria, RS, 2014.

Na análise das diferentes concentrações de NaCl, adicionado ao tampão de eluição do *pellet*, foi verificado efeito significativo das diferentes concentrações sobre a razão A_{260}/A_{230} , A_{260}/A_{280} e, igualmente, sobre a concentração de DNA ($p=0,0000$). NaCl é, frequentemente, utilizado no tampão de extração para remover polissacarídeos, geralmente em concentrações acima de 0,5 M (VARMA et al., 2007). No caso de espécies com elevados teores desses compostos, um passo de purificação adicional pode ser realizado, utilizando-se NaCl no tampão de eluição (ROGERS et al., 1985).

Os melhores resultados, para todas as variáveis, foram obtidos na ausência de NaCl no tampão Tris-EDTA (TE), conforme a composição original do protocolo Dellaporta et al. (1983), os quais diferiram de todas as demais concentrações, como

pode ser observado na Figura 21. Porém, tendo em vista que, para a razão A260/A230, cujos valores esperados situam-se na faixa de 1,6 – 1,9 (PAGE, 2010), todas as concentrações de NaCl avaliadas resultaram em valores superiores a 1,9, indicando contaminação por polifenóis e polissacarídeos e, em consequência, de menor qualidade e que poderiam comprometer eventuais aplicações analíticas posteriores das soluções de DNA genômico.

Para a razão A260/A280, o valor mais próximo do esperado foi obtido, também, na ausência de NaCl, diferindo das concentrações 1,5, 1 M, as quais diferiram, por sua vez, de 0,5 M (Figura 21). No que se refere à concentração de DNA na solução, foi verificada uma redução significativa na concentração de DNA obtida (Figura 22), sendo a maior concentração de DNA observada na ausência de NaCl, a qual diferiu das concentrações de DNA a 0,5, 1 e 1,5 M.

Diferentemente do relatado por esses autores, o uso de NaCl adicionado ao tampão de extração, no presente estudo, não promoveu uma remoção de polissacarídeos. Em estudo realizado por Fang et al. (1992), em que foram testadas diferentes concentrações de NaCl, na faixa compreendida entre 0,5 a 3 M, a concentração 2 M foi mais eficiente na remoção de polissacarídeos, aumentando a sua solubilidade em etanol, de modo que não coprecipitem com o DNA. Lodhi et al. (1994) constataram que para as espécies alvo do seu estudo, framboesa (*Rubus idaeus*) e maçã (*Malus domestica*), a concentração 2,5 M foi eficaz na remoção de polissacarídeos. Sahu et al. (2012) utilizaram a concentração 0,5 M e obtiveram valores superiores a 2 para a razão A260/A230.

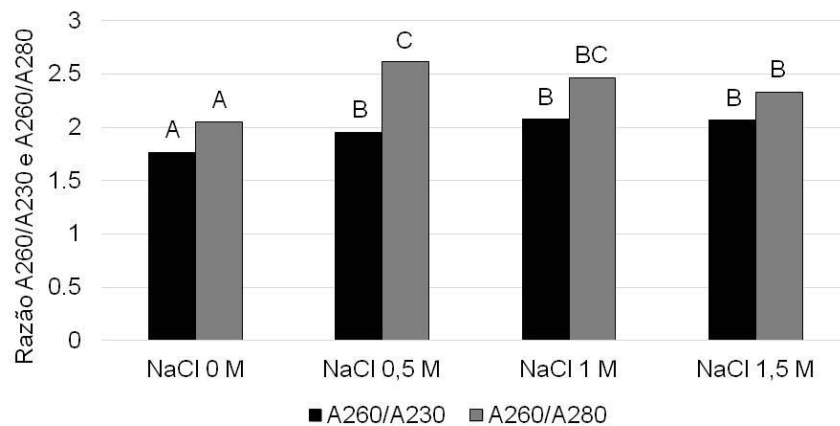


Figura 21 – Médias observadas para as razões A260/A230 e A260/A280 e para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

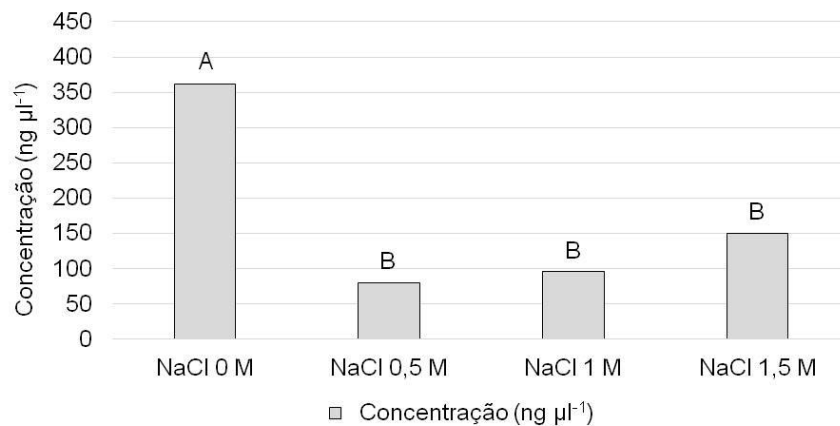


Figura 22 - Médias observadas para as razões A260/A230 e A260/A280 e para a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) nas soluções de DNA genômico isoladas a partir de amostras foliares, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das modificações que incluíram quatro concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl) no protocolo Dellaporta et al. (1983). Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "A" refere-se ao melhor resultado. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

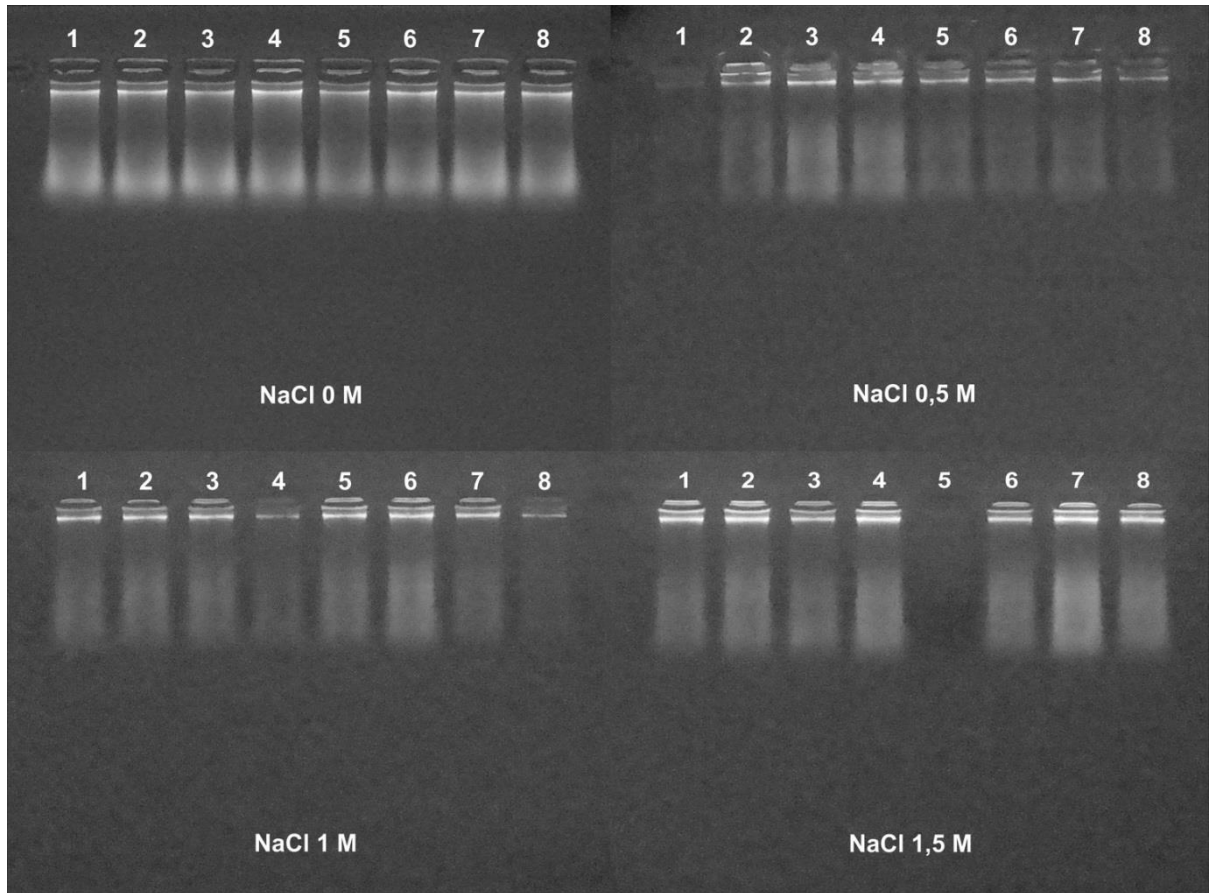


Figura 23 – Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de folhas jovens de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., secas à temperatura ambiente, obtidas mediante o emprego de quatro diferentes concentrações de Cloreto de ódio (NaCl) no protocolo de Dellaporta et al. (1983). As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com Gelred®. Santa Maria, RS, 2014.

O uso de escores, atribuídos às variáveis-resposta avaliadas no presente estudo, permitiu a sua análise conjunta (Tabela 12), que auxiliou a seleção das modificações que renderam os melhores resultados. A base para elaboração dos escores seguiu dados de literatura citados anteriormente, como aqueles de Page (2010) e Scientific (2008a) para as razões A260/A230 e A260/A280 respectivamente. Enquanto que, para a concentração de DNA na solução e Correlação de Pearson, os maiores valores observados foram considerados melhores, de acordo com o que, convencionalmente utilizado.

Assim, a observação da Tabela 12, em que são apresentados os escores individuais, atribuídos a cada modificação para cada variável, e, também, o somatório desses escores, observa-se que, pela análise do somatório dos escores

individuais, os melhores resultados (somatório igual a 6, o menor obtido) foram obtidos com o emprego de SDS a 25%, PVP a 1%, Acetato de Potássio a 5 M (conforme o protocolo original), ou com a ausência de NaCl (conforme protocolo original). Entretanto, uma análise dos escores individuais, associada à discussão dos resultados obtidos, efetuada anteriormente, possibilita que sejam consideradas eficientes, adicionalmente, algumas das “modificações” estudadas que obtiveram somatório 7, a saber: a ausência de PVP do protocolo (PVP a 0%) e Acetato de Potássio a 7,5 M, caso a concentração requerida de DNA na solução para uma eventual aplicação posterior não seja limitante.

Tabela 12 – Escores atribuídos, individualmente, às variáveis razão A260/A230, razão A260/A280, concentração de DNA na solução ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) e Coeficiente de Correlação de Pearson (r), e seu somatório (Σ), nas modificações realizadas no protocolo de isolamento de DNA genômico de Dellaporta et al. (1983) a partir de folhas jovens, secas à temperatura ambiente, de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Modificação	A260/A230 ¹	A260/A280 ²	Concentração ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) ³	r^4	Σ^5
SDS ⁶ a 10%	1	2	4	3	10
SDS a 15%	2	2	1	2	7
SDS a 20%	1	2	3	4	10
SDS a 25%	1	2	2	1	6
PVP ⁷ a 0%	1	2	1	3	7
PVP a 1%	1	2	2	1	6
PVP a 2%	1	2	4	2	9
PVP a 3%	1	2	3	4	10
Ac. Pot. ⁸ a 2,5 M	1	2	2	3	8
Ac. Pot. a 5 M	1	2	1	2	6
Ac. Pot. a 7,5 M	1	2	3	1	7
Ac. Pot. a 10 M	1	2	4	4	11
NaCl ⁹ a 0 M	1	2	1	2	6
NaCl a 0,5 M	2	2	4	4	12
NaCl a 1 M	2	2	3	3	10
NaCl a 1,5 M	2	2	2	1	7

¹1 = média na faixa $1,6 \leq \text{A260/A230} \leq 1,9$; 2 = média na faixa $1,9 \leq \text{A260/A230} \leq 1,6$; ²1 = média na faixa $1,8 \leq \text{A260/A280} \leq 2$; 2 = média na faixa $2 \leq \text{A260/A280} \leq 1,8$; ³1 = maior concentração – 4 = menor concentração (escala decrescente, quanto menor o valor, melhor será considerada a modificação); ⁴1 = mais forte Correlação de Pearson – 4 = mais fraca (escala decrescente); ⁵ Σ = somatório dos escores individuais atribuídos às variáveis (escala decrescente); ⁶SDS = Dodecil Sulfato de Sódio; ⁷PVP = Polivinilpirrolidona; ⁸Ac. Pot. = Acetato de Potássio; ⁹NaCl = Cloreto de Sódio.

6 CONCLUSÕES

O método de secagem de amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. à temperatura ambiente é eficiente no isolamento de seu DNA genômico.

Dentre os protocolos estudados, aquele desenvolvido por Dellaporta et al. (1983), permitiu a obtenção de soluções de DNA genômico em concentração adequada e qualidade suficiente para aplicações em técnicas genômicas menos exigentes.

As modificações que incluem o emprego de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 25% ou Polivinilpirrolidona (PVP) a 1% efetuadas no protocolo Dellaporta et al. (1983) contribuem para melhorar a concentração e, até certo ponto, a qualidade do DNA genômico isolado. Com base nesses resultados, é descrito, a seguir, o protocolo final para o isolamento de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

1. Macerar 150 mg de tecido foliar em nitrogênio líquido.
2. Inserir o macerado em microtubo de 2 mL e adicionar 750 µL de tampão de extração TE (Tris-HCl a 100 mM, pH 8,0; EDTA a 50 mM; NaCl a 500 mM; β-Mercaptoetanol a 0,2%, PVP 1% e água ultrapura, q.s.p.) pré-aquecido a 65 °C.
3. Adicionar 50 µL de SDS a 25%, misturar por inversão.
4. Incubar em banho-maria a 65 °C, por 60 min, misturar cuidadosamente a cada 10 min.
5. Adicionar 250 µL de acetato de potássio a 5 M, misturar por inversão e incubar por 20 min no gelo, misturar cuidadosamente a cada 5 min.
6. Centrifugar as amostras por 20 min a 25.000 x g.
7. Transferir o sobrenadante para novos microtubos.
8. Adicionar 500 µL de isopropanol gelado, misturar por inversão, e incubados a -20 °C por 30 min.
9. Centrifugar por 15 min a 20.000 x g.

10. Descartar, cuidadosamente, o sobrenadante e secar o precipitado em papel toalha por 10 min.
11. Ressuspender o *pellet* em 700 μ L de tampão TE (Tris-HCl a 50 mM, pH 8,0; EDTA a 10 mM, pH 8,0).
12. Fazer um *spin* por 10 min para remover detritos insolúveis, retirar o sobrenadante e colocar em novos microtubos de 2 mL.
13. Adicionar 75 μ L de acetato de sódio a 3 M e 500 μ L de isopropanol gelado, misturar cuidadosamente por inversão.
14. Incubar por 1 h a -20 °C.
15. Centrifugar as amostras por 30 s a 10.000 x g.
16. Descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* com etanol a 80%.
17. Secar o *pellet* e ressuspender em 100 μ L de tampão TE (Tris-HCl a 10 mM, pH 8,0; EDTA a 1 mM, pH 8).
18. Dividir as amostras em alíquotas e armazenar a -20 °C.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo trouxe relevantes contribuições para a secagem de amostras foliares de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. visando ao isolamento do DNA genômico, haja vista as distâncias geralmente existentes entre as populações arbóreas naturais, a serem investigadas, e os laboratórios, bem como os custos e o labor envolvido nos procedimentos rotineiros de coleta, transporte e armazenamento que incluem sílica gel, gelo ou outras medidas de resfriamento. Igualmente, o estudo realizado, apesar de não ter atingido o objetivo de desenvolver um protocolo otimizado de isolamento de DNA genômico da espécie, permitiu uma melhor compreensão acerca dos problemas que estão relacionados, principalmente levando-se em conta que não há relatos de um procedimento adequado para a extração de DNA da referida.

Os resultados obtidos indicam que os protocolos Ferreira e Grattapaglia (1996), Mazza e Bittencourt (2000) e Khanuja (1999), foram capazes de isolar DNA dos demais componentes celulares presentes em tecidos foliares, porém, as soluções de DNA genômico resultantes não estavam livres de contaminantes. Já o protocolo Dellaporta et al. (1983), isolou DNA em quantidade suficiente para aplicações posteriores, assim como os demais também o fizeram, mas menos contaminado.

Dentre as quatro modificações testadas no protocolo Dellaporta, houve um incremento nas variáveis-resposta analisadas quando foram utilizados SDS a 25% ou PVP a 1%, sendo o primeiro incluído no protocolo original na concentração 20% e o último, ausente. A inclusão de Cloreto de Sódio (NaCl), igualmente avaliada, foi demonstrada ser desnecessária, por não ter sido eficiente na remoção de polissacarídeos, o que contradisse o resultado obtido por alguns autores com outras espécies. Entretanto, dado o grande número de soluções utilizadas nos procedimentos de isolamento de DNA, testes adicionais devem ser realizados visando melhorar a qualidade do DNA obtido.

Os estudos genômicos relacionados à espécie encontram-se, ainda, em desenvolvimento, como, por exemplo, àqueles que incluem a análise da variabilidade genética via marcadores de DNA do tipo SRAP e RAPD, de

populações ou fragmentos florestais. Em relação aos marcadores RAPD, estão sendo testados iniciadores que foram aplicados com sucesso na espécie *Ocotea catharinensis* Mez., que, da mesma maneira que *Nectandra megapotamica*, é considerada uma espécie produtora de elevados teores de metabólitos secundários, dentre os quais se destacam os óleos essenciais, os quais são de interesse na saúde humana, animal e na proteção vegetal. Essas aplicações dos óleos essenciais, as quais vem sendo estudadas pelo Grupo de Pesquisa liderado pela Prof^a Berta Heinzmann, co-orientadora do presente projeto de dissertação, somadas à importância ambiental da espécie, integrante de formações florestais do bioma Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul, constituem nossas motivações para os trabalhos de pesquisa envolvendo *Nectandra megapotamica*, os quais terão continuidade no período de doutoramento do autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; JUNIOR, V. F. V. Composição química de óleos essenciais de espécies de *Aniba* e *Licaria* e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 141-145, 2010.
- ALENCAR, J. C.; FERNANDES, N. P. Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies, pau-rosa (*Aniba duckei*, Kostermans). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 8, n. 4, p. 523-541, 1978.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- ALEKSANDRUSHKINA, N. I.; VANYUSHIN, B. F: Endonucleases and their involvement in plant apoptosis. **Russian Journal Plant Physiology**, v. 56, p. 291–305, 2009.
- ANGELES, J. G. C.; LAURENA, A. C.; TECSON-MENDOZA, E. M. Extraction of Genomic DNA From the Lipid-Polysaccharide-, and Phenol-Rich Coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 23, p. 297a-297i, 2005.
- APEL, M. A. et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest (São Paulo – Brazil). **Pharmacology**, v. 3, p. 376-383, 2006.
- ARRIEL, N. H. C. et al. Análise comparativa de quatro protocolos de extração de DNA genômico, em gergelim. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.6, n. 2, p.525-535, 2002.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.3. Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. 364 p. 2007.
- BAITELLO, J. B. et al. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP-Rima, v. 3, p. 149-223, 2003.
- BARROSO, G.M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, v.1, 2 ed., 2002, 309 p.
- BHATTACHARJEE, R. et al. Field collection, preservation and large scale DNA extraction procedures for cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 3424-3430, 2009.
- BÖHLKE, M. et al. Costaricine, a new antiplasmodium bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 6, p. 576-580, 1996.
- BOLLER, T.; KENDE, H. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. **Plant Physiology**, v. 63, p. 1123-1132, 1979.

BORSE, T. et al. Biochemical role of ascorbic acid during the extraction of nucleic acids in polyphenol rich medicinal plant tissues. **Journal Plant Molecular Biology Biotechnonology**, v. 2, p. 1-7, 2011.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CARRIER, G. et al. An efficient and rapid protocol for plant nuclear DNA preparation suitable for next generation sequencing methods. **American Journal of Botany**, v. 0, p. e13-e15, 2011.

CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; BRAGA, J. M. A. Composição e riqueza florística do componente arbóreo da Floresta Atlântica submontana na região de Imbaú, Município de Silva Jardim, RJ. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 727-740, 2006.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorífera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 203-208, 2011.

CICCHETTI, E.; CHAINTREAU, A. Comparison of extraction techniques and modeling of accelerated solvent extraction for the authentication of natural vanilla flavors. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3043-3052, 2009.

CHASE, M. W.; HILLS, H. H. Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. **Taxon**, v. 40, p. 215-220, 1991.

CHOUDHARY, K. et al. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh leaves of *Vigna* species suitable for Rapd and restriction digestion. **Advances in Biological Research**, v. 2, p. 83-89, 2008.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 3, p. 238-239; v. 5, p. 108-129, 1984.

CRUZ, M.; RAMIREZ, F.; HERNANDEZ, H. DNA Isolation and Amplification from Cacti. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 15, p. 319-325, 1997.

CSAIKL, U. M. et al. Comparative Analysis of Different DNA Extraction Protocols: A Fast, Universal Maxi-Preparation of High Quality Plant DNA for Genetic Evaluation and Phylogenetic Studies. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 16, p. 69-86, 1998.

DABO, S. M.; MITCHELL, E. D.; MELCHER, U. A method for the isolation of nuclear DNA from cotton (*Gossypium*) leaves. **Analytical Biochemistry**, v. 210, p. 34-38, 1993.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A Plant DNA Minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Report**, v. 1, p. 19-21, 1983.

DO, N.; ADAMS, R. P. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. **Biotechniques**, v. 10, n. 2, p. 162-166, 1991.

DOOSTY, B. et al. Comparative analysis and optimization of diferente DNA extraction protocols in *Satureja khuzistanica*. **International Journal of Biology**, v. 4, p. 111-116, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUÑG, N. X. et al. The Essential Oil of *Cinnamomum camphora* (L.) Sieb. var. *linaloolifera* from Vietnam. **Journal of Essential Oil Research**, v. 5, n. 4, p. 451-453, 1993.

FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **BioTechniques**, v. 13, n. 1, p. 52-55, 1992.

FENG, F. et al. Application of SRAP in the genetic diversity of *Pinus koraiensis* of different provenances. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 6, p. 1000-1008, 2009.

FERREIRA, D. F. **Programa Sisvar: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos**. SISVAR versão 5.1. Lavras: UFLA, 2006. (Software).

FILHO, A. A. S. et al. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 10, p. 1307-1310, 2008.

GARCEZ, F. R. et al. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407-411, 2009.

GEHRIG, H. H. et al. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, n. 4, p. 369-376, 2000.

GLASEL, J. A. Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by 260nm/280nm Absorbance Ratios. **Biotechniques**, v. 18, n. 1, p. 62-63, 1995.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GUEDES-BRUNI, R. R. et al. Composição florística e estrutura de dossel em trecho de Floresta Ombrófila Densa Atlântica sobre Morrote Mamelonar na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 3, p. 429-442, 2006.

GUILLEMAUT, P.; MARÉCHAL-DROUARD, L. Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive, and reliable method. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 10, p. 60-65, 1992.

HANAI, L. R. et al. Methylation patterns revealed by MSAP profiling in genetically stable somatic embryogenic cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). **In Vitro Cellular e Development Biology – Plant**, v. 46, n. 4, p. 368-377, 2010.

HANDA, L.; SAMPAIO, P. T. B.; QUISEN, R. C. Cultura in vitro de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2005.

HERZER, S. DNA purification. In: GERSTEIN, A. S. **Molecular Biology problem solver: A laboratory Guide**. New York: Wiley-Liss, 2001, p. 167-196.

JANTAM, I. BIN.; GOH, S. H. Essential Oils of *Cinnamomum* Species from Peninsular Malaysia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, n. 2, p. 161-171, 1992.

JAPELAGHI, R. H; HADDAD, R. Rapid and eficiente isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. **Molecular Biotechnology**, v. 49, p. 129-137, 2011.

JARDIM, L. S. et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, n. 2, p. 275-280, 2010.

JOBES, D. V.; HURLEY, D. L.; THIEN, L. B. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. **Taxon**, v. 44, p. 349-386, 1995.

JUNIOR, A. R. P. et al. Bioatividade de óleos essenciais de sassafrás e eucalipto em cascudinho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 637-643, 2010.

KATTERMAN, F. R.; SHATTUCK, V. I. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. **Preparative Biochemistry**, vol. 13, n. 4, p. 347-359, 1983.

KEB-LANES, M. et al. A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in *Agavaceae* and other tropical plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p. 299a-299e, 2002.

KIM, C. S. et al. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 1085-1086, 1997.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KRIŽMAN, S.; BAILEY, L. G.; BAUM, B. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 15, n. 1, 1997.

- KURTZ, B. C.; ARAÚJO, D. S. D. Composição florística e estrutura do componente arbóreo de um trecho de Mata Atlântica na Estação Ecológica do Paraíso, Cachoeiras do Macacú, RJ, Brasil. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 78, p. 69-112, 2000.
- LEE, M. H.; NICHOLSON, P. Isolation of genomic DNA from plant tissues. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 805-806, 1997.
- LEITE, A. M. C. et al. Diretrizes para o resgate e conservação da variabilidade genética de espécies Amazônicas I – pau-rosa. **Embrapa Amazônia Ocidental, Documentos 6**, Manaus, 1999, p. 43.
- LIMA, R. B. S. et al. Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaeodora*Ducke) seeds. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 19-25, 2008.
- LIN, R-C. et al. A rapid and efficient DNA minipreparation suitable for screening transgenic plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 379, 2001.
- LODHI, M. A.; YE, G.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. A simples and eficiente method for DNA extractions from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.
- LOMMIS, M. D. Overcoming problems of phenolic and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods in Enzymology**, v. 31, p. 528-544, 1974.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivos de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 2, 1998.
- LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p. 85-89.
- LUMARET, R. et al. Chloroplast DNA extraction procedure for species high in phenolics and polysaccharides. **Molecular Tools for Screening Biodiversity**, p. 15-17, 1997.
- MAIA, J. G. S. et al. Plant sources of amazon rosewood oil. **Química. Nova**, v. 30, n. 8, p. 1906-1910, 2007.
- MALIYAKAL, E. J. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. **Nucleic Acid Research**, v. 20, n. 9, p. 2381, 1992.
- MANCHESTER, K. L. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. **Biotechniques**, v. 19, p. 208-210, 1995.
- MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas**. Santa Maria, RS: Ed. da UFSM, 1997.
- MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

- MAURO, M. C. et al. Genetic Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphisms in *Vitis*. **Journal of Heredity**, v. 88, n. 1, p. 18-21, 1992.
- MAY, P. H.; BARATA, L. E. S. Rosewood exploitation in the Brazilian Amazon: Options for sustainable production. **Economic Botany**, v. 58, n. 2, p. 257-265, 2004.
- 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.
- MELO, J. O. et al. Anti-inflammatory Activity of Crude Extract and Fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. **Biological e pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2241-2245, 2006.
- MICHAUD, H. et al. A Procedure for the Extraction Chloroplast DNA from Broad-Leaved Tree Species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 13, n. 2, 1995.
- MICHIELS, A. et al. Extraction of high-quality genomic DNA from látex-containing plants. **Analytical Biochemistry**, v. 315, p. 85-89, 2003.
- MISHRA, K. M. et al. A simple method of DNA extraction from coffee seeds suitable for PCR analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 409-413, 2008.
- MOHAMMDI, A. et al. Direct electron transfer of polyphenol oxidase on carbon nanotube surfaces: Application in Biosensing. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 4, p. 895-905, 2009.
- MÖLLENBECK, S. et al. Chemical Composition and Analyses of Enantiomers of Essential Oils from Madagascar. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, n. 2, p. 63-69, 1997.
- MOORE, E. et al. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. In: KOWALCHUK, G. A.; BRUIJN, F. J.; HEAD, I. M.; VAN DER ZIJPP, A. J.; VAN ELSAS, J. D. (Ed.) **Molecular Microbial Ecology Manual**. 2. ed. New York: Springer, 2004, p. 1-15.
- MOYO, M. et al. Optimising DNA isolation for medicinal plants. **South African Journal of Botany**, vol. 74, p. 771-775, 2008.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.
- NAVARINI, L. et al. Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, p. 71-81, 1999.
- NGUYEN, C. T. T. et al. Comparison of DNA extraction efficiencies using various methods for the detection of genetically modified organisms (GMOs). **International Food Research Journal**, v. 16, p. 21-30, 2009.

- OGUNKANMI, A. L. et al. An improved method of extracting genomic DNA from preserved tissues of *Capsicum annum* for PCR amplification. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 2, p. 115-119, 2008.
- OH, S. Y. et al. Development of an ammonium sulfate DNA extraction method for obtaining amplifiable DNA in a small number of cells and its application to clinical specimens. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 10, 2013.
- OLTAMARI, A. C. et al. Safrole Analysis by GC-MS of Prototrophic (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) Cell Cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, n. 3, p. 231-235, 2004.
- PADMALATHA, K.; PRASAD, M. N. V. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 230-234, 2006.
- PAGE, A. F. Detection and Avoidance of Polysaccharides in Plant Nucleic Acid Extractions. **Thermo Fisher Scientific – NanoDrop Products**, Wilmington, 2010.
- PANDEY, R. N.; ADAMS, R. P.; FLOURNOY, L. E. Inhibition of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) by Plant Polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 14, n. 1, 1996.
- PÉLISSIER, Y. et al. Volatile Components of Leaves, Stems and Bark of *Cinnamomum camphora* Nees et Ebermaier. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 3, p. 311-315, 1995.
- PETERSON, D. G.; BOEHM, K. S.; STACK, S. M. Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), A plant containing high levels of polyphenolic compounds. **Plant Molecular Biology**, v. 15, n. 2, p. 148-153, 1997.
- PINO, J. A.; FUENTES, V. Leaf Oil of *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 5, p. 531-532, 1998.
- PIRTILÄ, A. M. et al. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 3, p. 273, 2001.
- POREBSKI, S.; BAILEY, L. G.; BAUM, B. R. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. **Plant Molecular Biology**, v. 12, n. 1, 1997.
- QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 82, p. 59-121, 2002.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul**. SUDESUL/Herbário Barbosa Rodrigues, 1989. p.122-129,194-200.

- RETHEER, B.; DELMAS, G.; LAOUEDJ, A. Isolation of polysaccharide-free DNA from plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 4, p. 333-337, 1993.
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A. **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central**. Manaus: Inpa-DFID, 1999. 816 p.
- RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Comparative analysis of diferente DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 173-187, 2007.
- ROBLES, M. D.; NIELL, F. X. Separation and determination of α - and β -Galactose from agar-type polysaccharides by liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 34, p. 517-520, 1996.
- ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology**, v. 5, p. 69-76, 1985.
- ROHWER, J. G. Lauraceae: *Nectandra*. **Flora Neotropica**, v. 60, p. 1-332, 1993.
- ROMOFF, P. et al. Chemical composition of volatile oils from leaves of *Nectandra megapotamica* Spreng. (Lauraceae). **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1119-1121, 2010.
- SÁ, O.; PEREIRA, J. A.; BAPTISTA, P. Optimization of DNA Extraction for RAPD and ISSR Analysis of *Arbutus unedo* L. Leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 4156-4164, 2011.
- SAHA, D. T. S. et al. Optimization and comparison of efficiency between two DNA isolation protocols in *Cymbopogon* species. **General and Applied Plant Physiology**, v. 36, p. 232-238, 2010.
- SAHARE, P.; SRINIVASU, T. Method for the Isolation of Genomic DNA from Medicinal Plants Producing Large Amount of Secondary Metabolites. **International Journal of Engineering and Science**, v. 1; p. 37-39, 2012.
- SAHU, S. K.; THANGARAJ, M.; KATHIRESAN, K. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. **ISRN Molecular Biology**, v. 1, p. 1-6, 2012.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Spectrophotometry of DNA or RNA. In: **Molecular Cloning**. 3 ed, 2001. Cold Spring Harbor, New York: Cold spring Harbor Laboratory Press. 3: A8.20-A8.21.
- SAMEJIMA, K.; EARNSHAW, W. C. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, 2005, v. 6, p. 677-688, 2005.

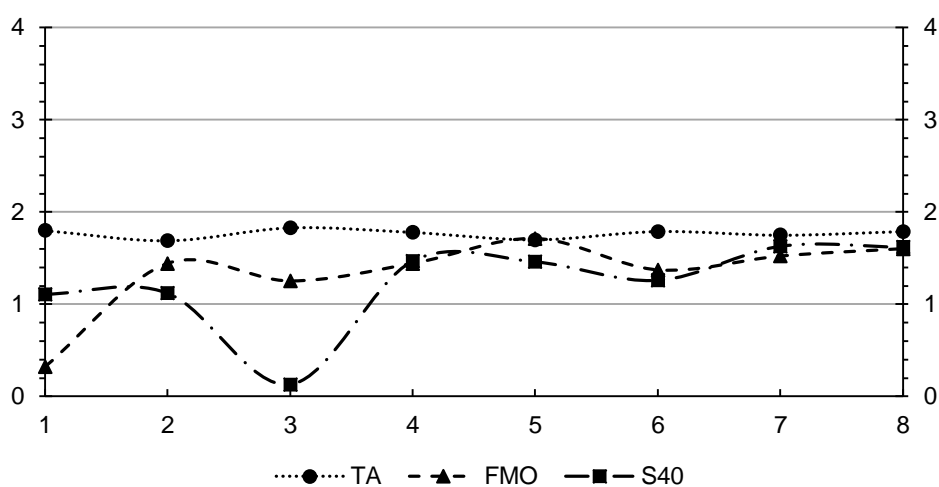
- SAMPAIO, L. F. S. et al. Linalool from Rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) Oil Inhibits Adenylate Cyclase in the Retina, Contributing to Understanding its Biological Activity. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 1, p. 73-77, 2012.
- SANGWAN, N. S.; SANGWAN, R. S.; KUMAR, S. Isolation of genomic DNA from the antimalarial plant *Artemisia annua*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 16, n. 4, p. 365, 1998.
- SANTOS FILHO, D.; GILBERT, B. The alkaloids of *Nectandra megapotamica*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 821-822, 1975.
- SCIENTIFIC, T. F. **Technical Bulletin NanoDrop 1000 & 8000 – 260/280 and 260/230 Ratios**. T009. 2008a.
- SCIENTIFIC, T. F. **NanoDrop 1000 Spectrophotometer V 3.7: User's Manual**. 105 p. 2008b.
- SHAN, G. et al. Purification of total DNA extracted from activated sludge. **Journal of Environmental Sciences**, v. 28, p. 80-87, 2008.
- SHANKAR, K. et al. An improved DNA extraction protocol from four *in vitro* Banana cultivars. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 84-90, 2011.
- SHARMA, P.; PUROHIT, S. D. An improved method of DNA isolation from polysaccharide rich leaves of *Boswellia serrata* Roxb. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 67-71, 2012.
- SHARMA, P.; MISHRA, A. K.; MISRA, R. S. A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1018-1022, 2008.
- SHIODA, M.; MARAKAMI-MUOFUSHI, K. Selective inhibition of DNA polymerase alpha by a polysaccharide purified from smile of *Physarum polycephalum*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 146, p. 61-66, 1987.
- SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais**. Viçosa: Arte Livros, 2000. 135p.
- SIMIĆ, A. et al. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 9, p. 713-717, 2004.
- ŠTORCHOVÁ, H. et al. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. **Taxon**, v. 49, p. 79-84, 2000.
- STUBBS, B. J.; SPECHT, A.; BRUSHETT, D. The Essential Oil of *Cinnamomum camphora* (L.) Nees and Eberm. - Variation in Oil Composition Throughout the Tree in Two Chemotypes from Eastern Australia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 3, p. 200-205, 2004.

- TAI, T. H.; TANKSLEY, S. D. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 8, p. 297-303, 1990.
- TAN, H. et al. Comparative analysis of six DNA extraction methods in Cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp). **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 7, p. 82-90, 2013.
- TAYLOR, B.; POWELL, A. Isolation of Plant DNA and RNA. **Focus**, v. 4, n. 3, p. 4-6, 1982.
- TEL-ZUR, N. et al. Modified CTAB Procedure for DNA Isolation from Epiphytic Cacti of the Genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, p. 249-254, 1999.
- TERRY, C. F.; HARRIS, N.; PARKES, H. C. Detection of Genetically Modified Crops and Their Derivatives: Critical Steps in Sample Preparation and Extraction. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 3, p. 768-774, 2002.
- THOMSON, D.; HENRY, R. Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, p. 202-206, 1993.
- VARMA, A. et al. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 386-392, 2007.
- VILLIERS, A. et al. Improving HPLC separation of polyphenols. **LCGC Europe**, v. 23, p. 466-478, 2010.
- WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolation and crystallization of enolase. **Biochemische Zeitschrift**, v. 310, p. 384-421, 1942.
- WERFF, H. VAN DER.; RICHTER, H. G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 83, n. 3, p. 409-418, 1996.
- WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **Biotechniques**, v. 22, n. 3, p. 474-481, 1997.
- WILSON, C. M. Plant Nucleases. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 26, p. 187-208, 1975.
- XU, Q.; WEN, X.; DENG, X. A simple protocol for isolation genomic DNA from chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) for RFLP and PCR analyses. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 301a-301g, 2004.
- ZHANG, J.; STEWART, J. Economical and Rapid Method for Extracting Cotton Genomic DNA. **Journal of Cotton Science**, v. 4, p. 193-201, 2000.

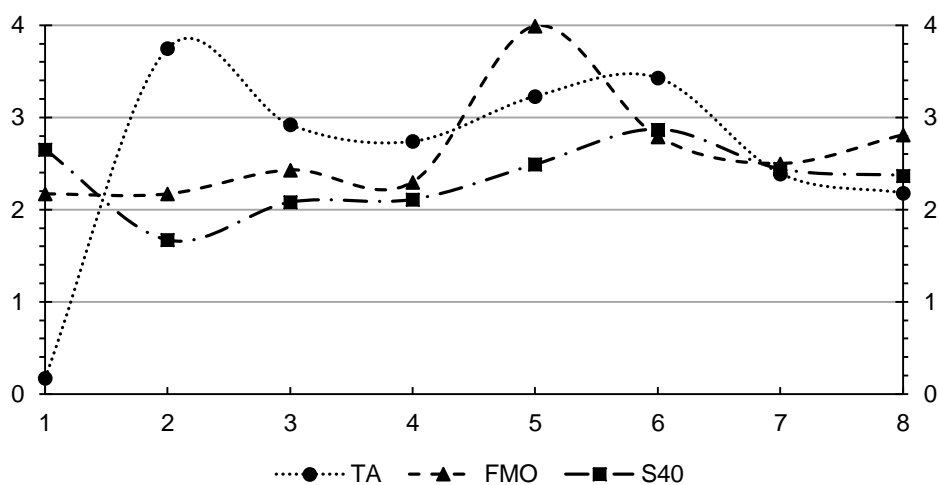
APÊNDICES

Apêndice 1 – Gráficos da análise de espectrofometria em NANODROP 1000 para a razão A260/A230 para todas as repetições nos diferentes protocolos de extração originais e métodos de secagem. (A) Dellaporta, (B) Ferreira e Grattapaglia, (C) Khanuja e (D) Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

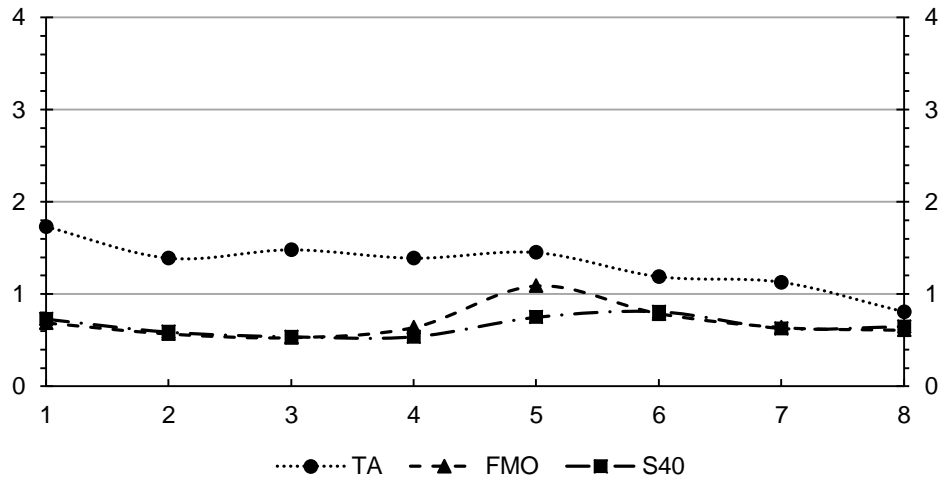
Razão A260/A230 (A)



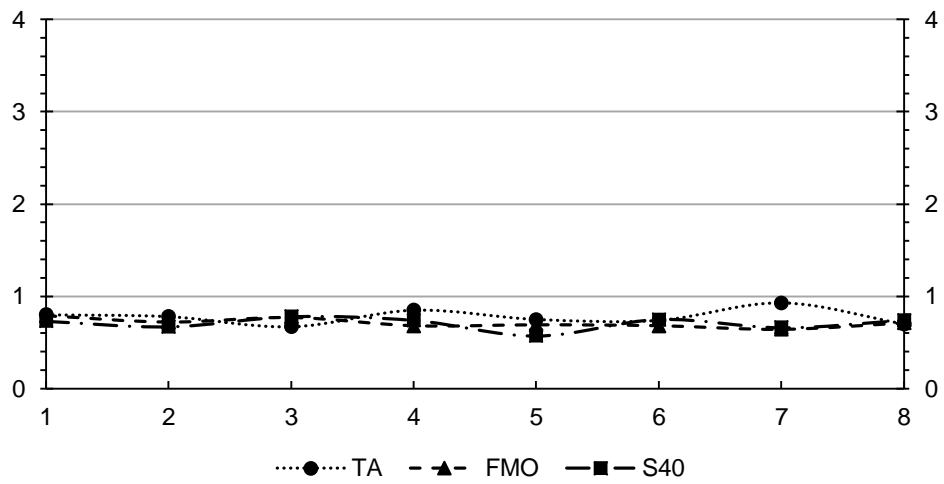
Razão A260/A230 (B)



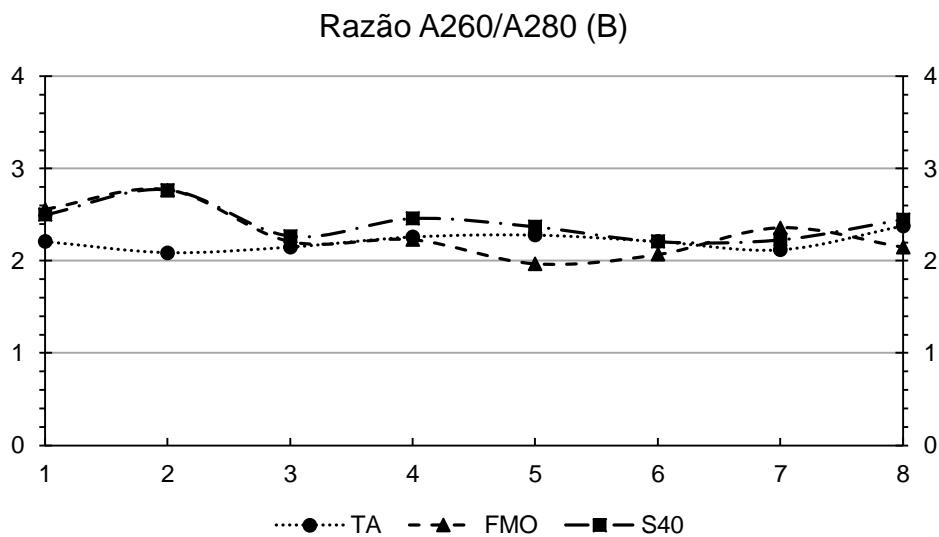
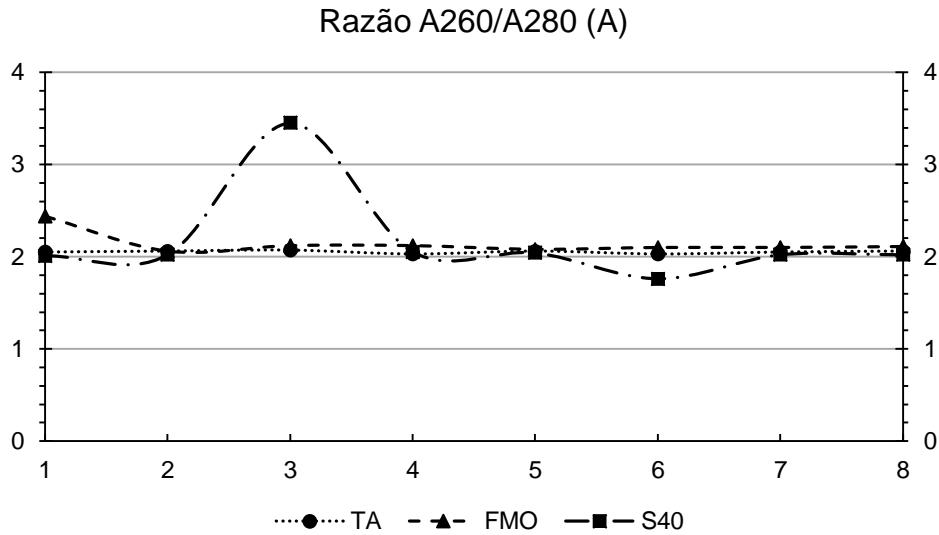
Razão A260/A230 (C)



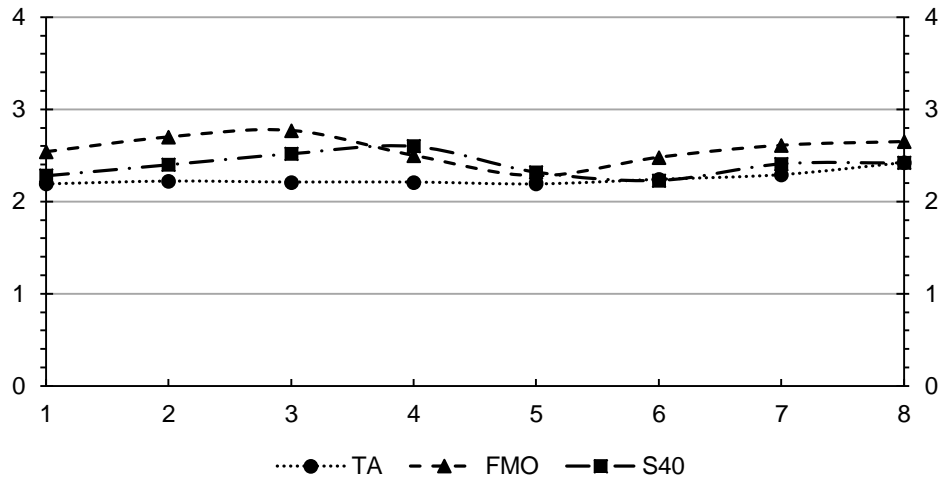
Razão A260/A230 (D)



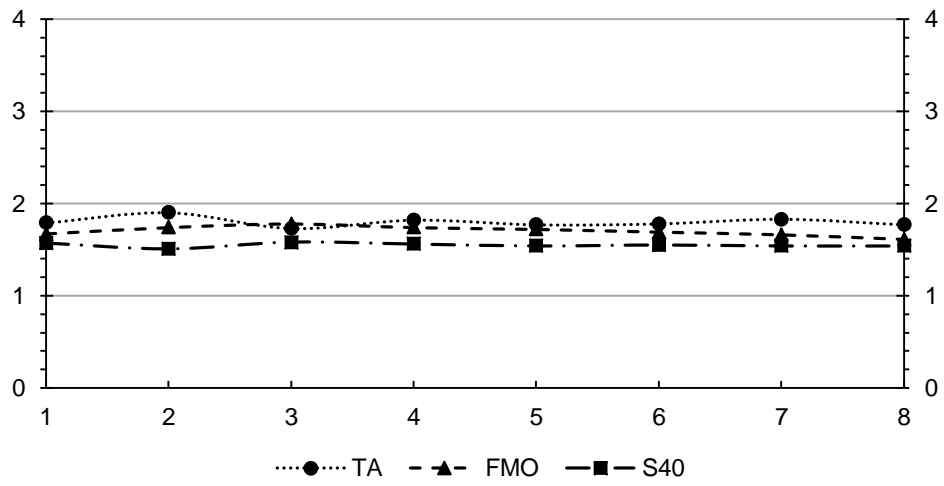
Apêndice 2 – Gráficos da análise de espectrofometria em NANODROP 1000 para razão A260/A280 para todas as repetições nos diferentes protocolos de extração originais e métodos de secagem. (A) Dellaporta, (B) Ferreira e Grattapaglia, (C) Khanuja e (D) Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



Razão A260/A280 (C)

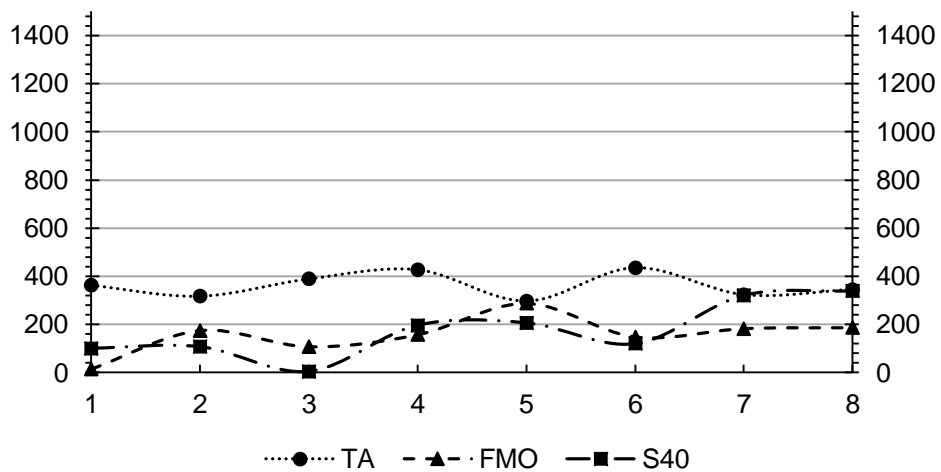


Razão A260/A280 (D)

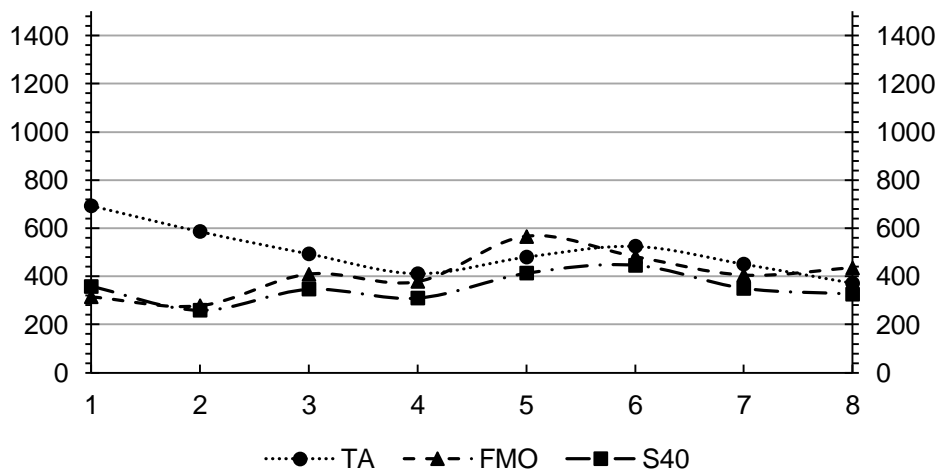


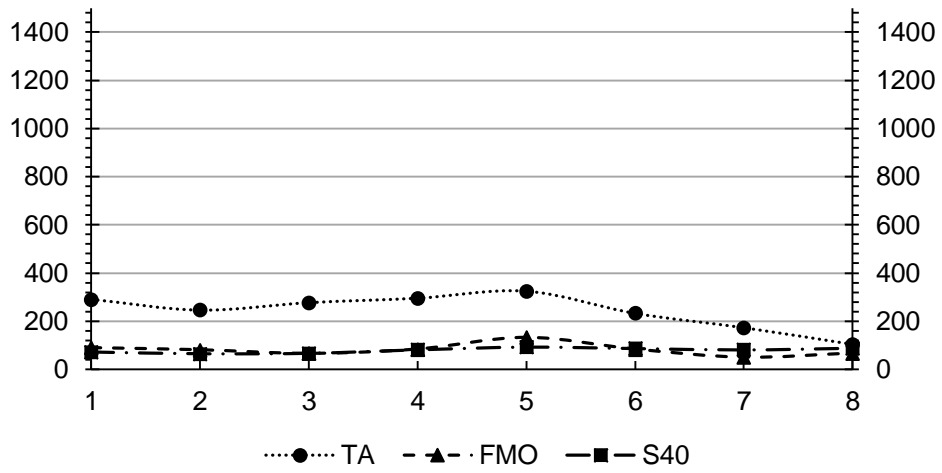
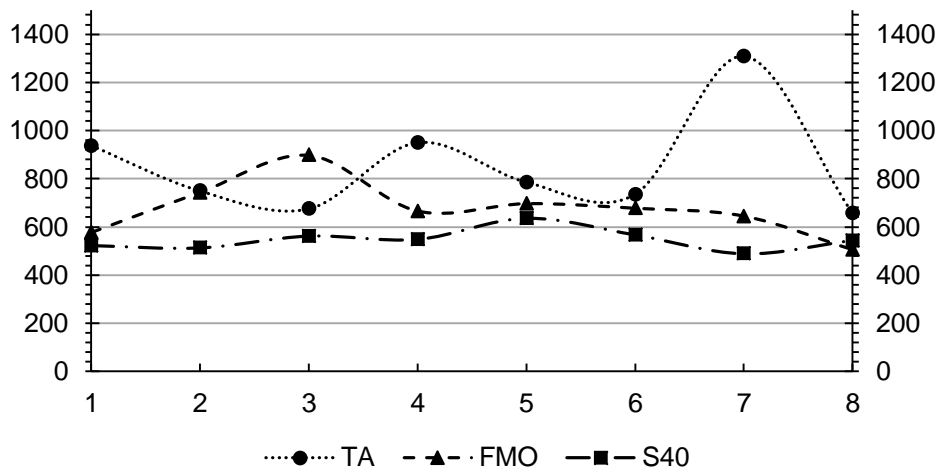
Apêndice 3 – Gráficos da análise de espectrofometria em NANODROP 1000 para a variável Concentração ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) para todas as repetições nos diferentes protocolos de extração originais e métodos de secagem. (A) Dellaporta, (B) Ferreira e Grattapaglia, (C) Khanuja e (D) Mazza e Bittencourt. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Concentração ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) (A)

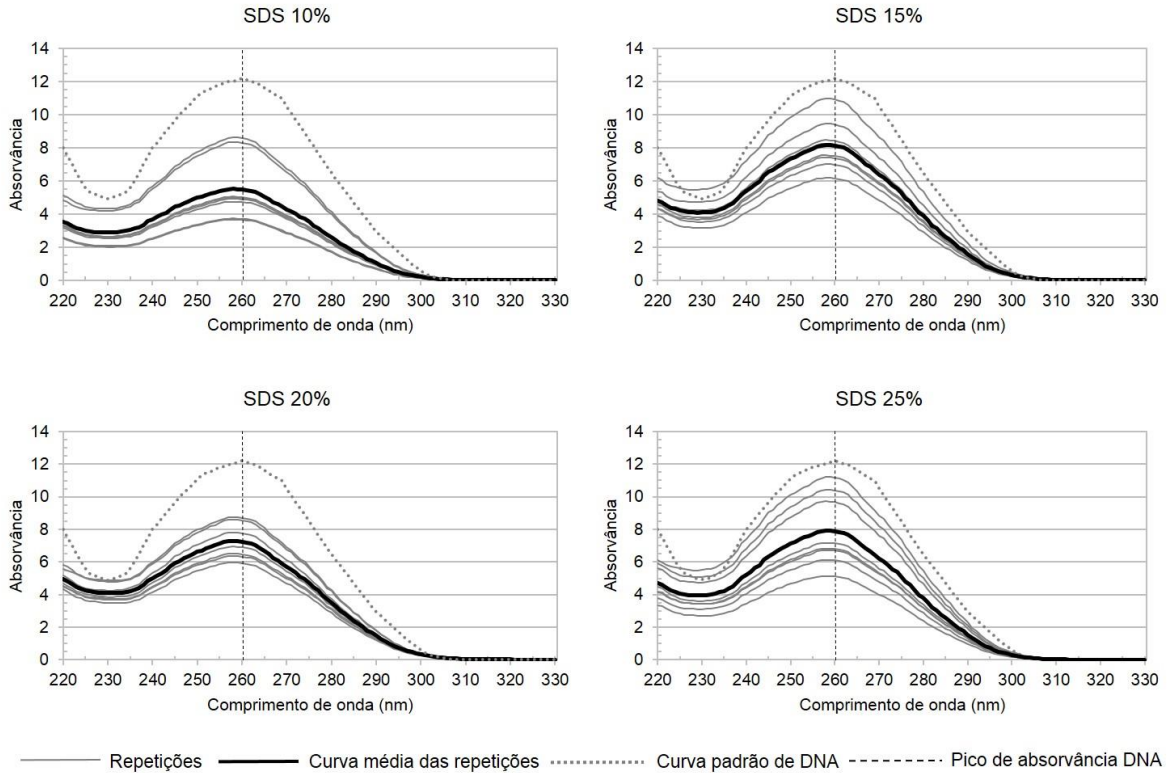


Concentração ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) (B)

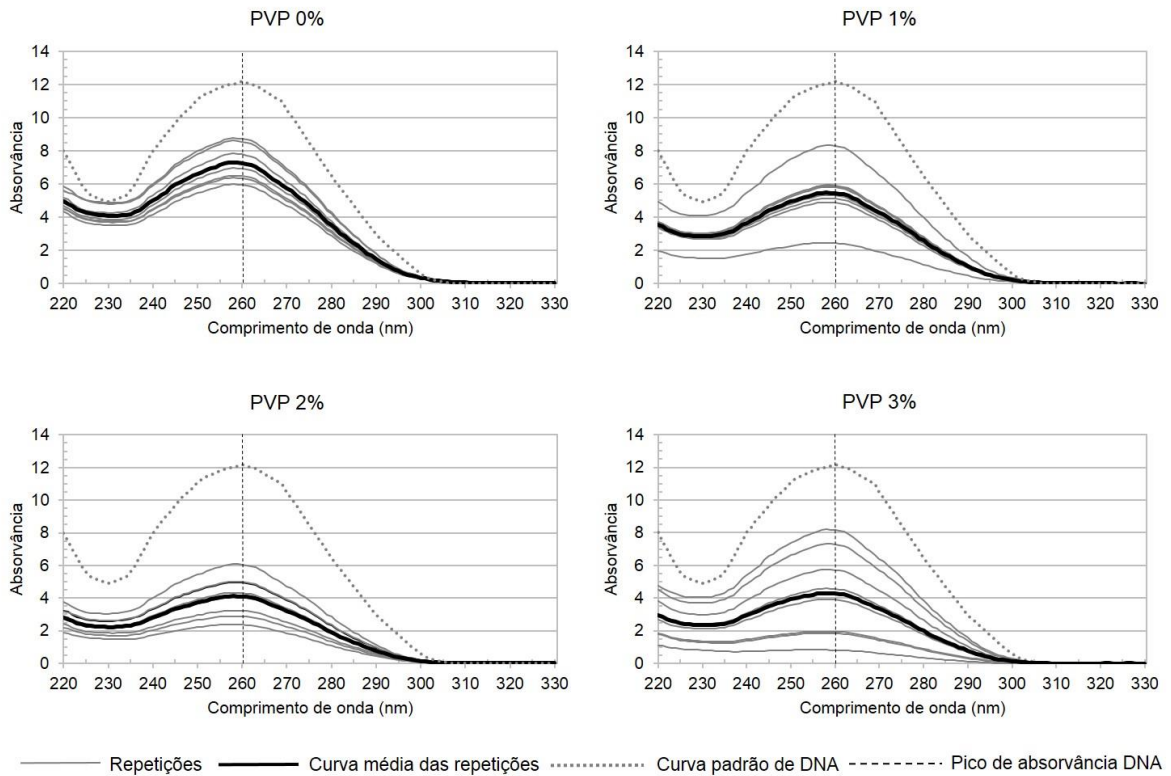


Concentração (ng μl^{-1}) (C)Concentração (ng μl^{-1}) (D)

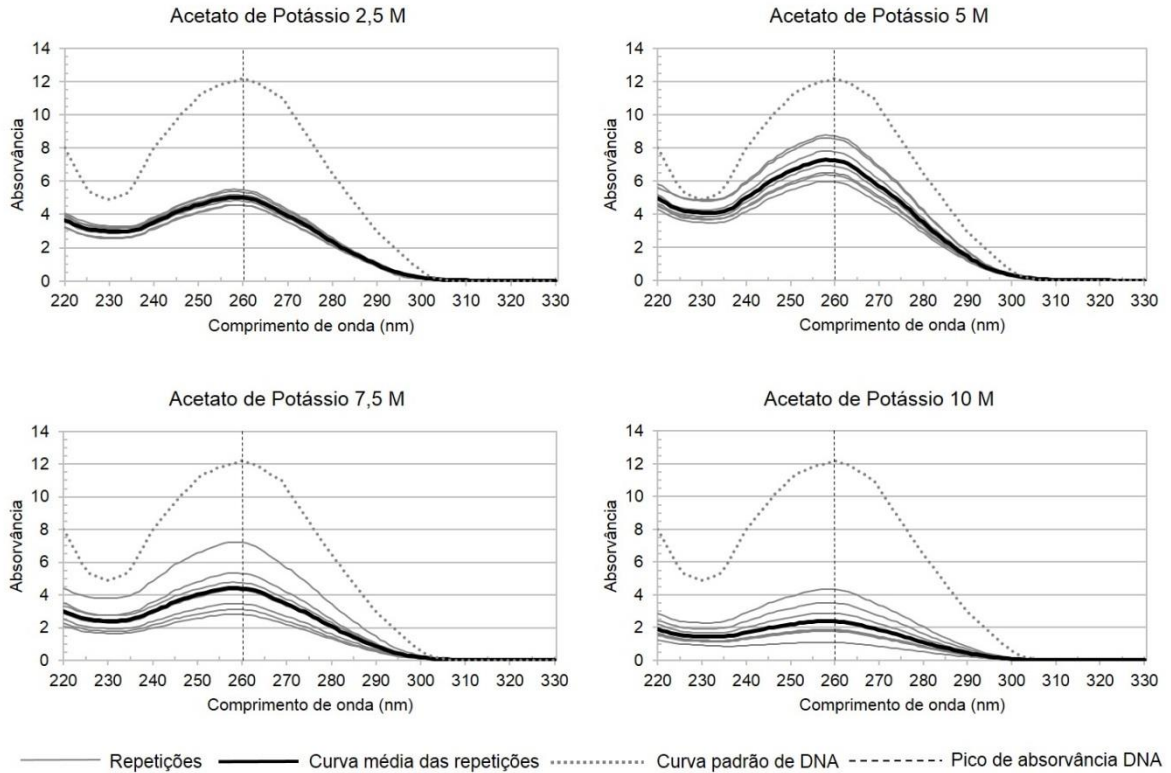
Apêndice 4 – Curva de absorvância das amostras de DNA para as quatro concentrações de PVP. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



Apêndice 5 – Curva de absorvância das amostras de DNA para as quatro concentrações de PVP. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



Apêndice 6 – Curva de absorvância das amostras de DNA para as quatro concentrações de Acetato de Potássio. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



Apêndice 7 – Curva de absorvância das amostras de DNA para as quatro concentrações de NaCl. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

