



O USO DE ETANOL E ISOPROPANOL NA EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS

Fernanda Aparecida Kotz¹; Marisa Artmann², Juliana Roriz Aarestrup³

RESUMO: A extração de DNA é uma etapa importante para se analisar o genoma de espécies vegetais. Diversos protocolos já foram propostos com a finalidade de otimizar essa fase, pois o protocolo, muitas vezes, tem que ser ajustado para determinada amostra de planta. Entretanto, pouco se tem estudado sobre o tipo de álcool mais adequado para precipitação do DNA. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o tempo de precipitação e a qualidade das amostras de DNA de abacate (*Persea americana*), ameixa japonesa (*Prunus salicina*), banana (*Musa paradisiaca*), goiaba (*Psidium guajava*), mamão (*Carica papaya*) e manga (*Mangifera indica*), quando tratadas com etanol e isopropanol, simultaneamente ou separadamente. Percebeu-se que T3, em que se utilizou 50% de etanol e 50% de isopropanol em um mix, foi o melhor tratamento, pois agregou a integridade do DNA, fornecida pelo etanol, e a redução do tempo de precipitação proporcionado pelo isopropanol.

UNITERMOS: Ácidos nucleicos, Vegetais, Álcool, Precipitação.

THE USE OF ETHANOL AND ISOPROPANOL IN DNA EXTRACTION PLANT

ABSTRACT: The DNA extraction is an important step to analyze the genome of plant species. Several protocols have been proposed with the aim of optimizing this stage, because the protocol will often have to be adjusted for a particular plant sample. However, little has been studied about the type of alcohol most suitable for DNA precipitation. Therefore, this study aimed to evaluate the precipitation time and the quality of DNA samples from avocado (*Persea americana*), Japanese plum (*Prunus salicina*), banana (*Musa paradisiaca*), guava (*Psidium guajava*), papaya (*Carica papaya*) and mango (*Mangifera indica*), when treated with ethanol and isopropanol, simultaneously or separately. It was noticed that T3, which used 50% ethanol and 50% isopropanol in a mix, was the best treatment for the added DNA integrity provided by the ethanol, and reducing the time provided by isopropanol precipitation.

UNITERMS: Nucleic acids, Vegetable, Alcohol, Precipitation.

INTRODUÇÃO

Desde que os cientistas James Watson e Francis Crick propuseram a estrutura tridimensional do DNA, a área da biologia molecular vem passando por grandes avanços tecnológicos. Sequências de nucleotídeos e a caracterização das propriedades químicas do DNA passaram a ser intensivamente utilizadas como alvos de pesquisas (Andrade & Caldeira 2009). Com o desenvolvimento técnico-científico, progressos significativos têm sido alcançados através do isolamento, da análise e síntese de sequência de DNA, da introdução desses DNA recombinantes *in*

¹Graduanda em Biomedicina, IUNI Educacional, UNIC Sinop Aeroporto, Sinop, MT, Brasil. e-mail: fernanda_kotz@hotmail.com; ²Profª. Co-orientadora Drª. em Química. IUNI Educacional, UNIC Sinop Aeroporto, Sinop, MT, Brasil, e-mail: artmann_xta@hotmail.com; ³Profª. Orientadora Drª. em Genética. IUNI Educacional, UNIC Sinop Aeroporto, Sinop, MT, Brasil, e-mail: jroriz@yahoo.com.br.



vivo para o estudo da sua função e dos mecanismos que controlam a expressão dos genes (Lima, 2008).

O DNA genômico encontra-se associado a diversas proteínas e enzimas, que agem na arquitetura da molécula, no seu processo de replicação, na manutenção da sua integridade e em outros processos afins (Lewin, 2009). A extração de DNA é a primeira etapa para a utilização de genomas em diferentes técnicas de biologia molecular e a sua pureza e qualidade são sempre os pré-requisitos principais. Dessa forma, inúmeros componentes nucleares necessitam ser dissociados do DNA para que sua análise seja fiel e ausente de contaminantes (Arbi et al., 2010). Para tal, existem diferentes métodos de isolamento de DNA, pois os protocolos devem ser adequados à espécie de planta ou ao tecido vegetal. Mas em todos os procedimentos, o objetivo têm sido obter grandes quantidades de DNA, de forma rápida, eficiente e com alta integridade (Lima, 2008).

A diferença fundamental entre os protocolos de isolamento de DNA vegetal está na composição do tampão de extração. A maioria dispõe de um agente tamponante para manter o pH 8,0, um sal para a degradação de proteínas e neutralizar a carga negativa do DNA e um detergente para dissociar as membranas (Rosa, 2008).

Para se retirar o DNA do núcleo das células, é incentivada a lise da membrana celular, que pode ser por maceração mecânica ou ação química da amostra. Há protocolos que utilizam lisoenzimas para a digestão completa das membranas celulares. Entretanto, tais métodos apresentam um número maior de etapas, geram protocolos mais demorados e aumentam a probabilidade de ocorrerem erros (Rosa, 2008; Momeni et al., 2011). Outra metodologia mais simples e rápida é a extração por aumento de temperatura, em que a amostra é submetida a choques térmicos para a ruptura da membrana celular e liberação do DNA. Mas, essa prática é aplicada apenas para extrações de DNA em pequenas quantidades. Após a eliminação da membrana celular, remove-se a camada lipídica da biomembrana por atividade de detergente, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), pois também auxilia na inativação enzimática e dissocia o DNA das proteínas, que mantém o envelhecimento da molécula. Para a precipitação do DNA, utiliza-se etanol ou isopropanol a 4°C, pois o DNA é insolúvel em álcool e se torna menos denso do que a solução aquosa obtida (Bonatto & Megiolaro, 2012). Contudo, pouco se sabe sobre as diferenças qualitativas da amostra, quando se realiza a substituição do álcool utilizado no processo de precipitação do DNA.

Neste contexto, pretende-se avaliar a potencialidade do etanol e isopropanol como agentes precipitantes, separadamente ou em um *mix* das duas substâncias, a partir da extração artesanal de DNA de abacate (*Persea americana*), ameixa japonesa (*Prunus salicina*), banana (*Musa paradisíaca*), goiaba (*Psidium guajava*), mamão (*Carica papaya*) e manga (*Mangifera indica*).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Química da IUNI Educacional – UNIC Sinop Aeroporto – MT, de fevereiro a junho de 2013.

As amostras vegetais utilizadas foram obtidas comercialmente e previamente refrigeradas a 4°C, até o momento do uso. Foram utilizados frutos maduros de abacate (*Persea americana*), ameixa japonesa (*Prunus salicina*), banana (*Musa paradisíaca*), goiaba (*Psidium guajava*), mamão (*Carica papaya*) e manga (*Mangifera indica*).

Cada amostra foi manipulada separadamente, tomando as devidas precauções para não haver a contaminação do material com outras substâncias ou DNA de outra espécie. O isolamento do DNA genômico foi realizado a partir de 7g do material a fresco. As amostras foram maceradas, em almofariz, na presença de tampão de extração contendo 50 ml de água destilada, 1g de NaCl e



4mL de SDS. Em seguida, foi obtido o filtrado e o material foi dividido em 10 alíquotas de 300 μ L cada, em 10 tubos eppendorfs para cada planta. Após 30 minutos em repouso, estimulou-se a precipitação do DNA por adição de álcool previamente resfriado a -2°C , por três métodos ou tratamentos diferentes: Tratamento 1 (T1): 600 μ L de etanol a 98%; Tratamento 2 (T2): 600 μ L de isopropanol 99%; Tratamento 3 (T3): 300 μ L de etanol a 98% e 300 μ L de isopropanol a 99% ou *mix* de etanol e isopropanol 1:1.

A qualidade do DNA precipitado foi avaliada pelo aspecto visual de cada amostra em eppendorf e as análises do período de precipitação foram realizadas por meio de contagens cronométricas do tempo gasto para cada amostra de DNA resuspender. As imagens das amostras foram capturadas por uma máquina digital da marca Sony, modelo Cyber-shot DSC-W610, com resolução de 14.1 megapixels e para as análises estatísticas, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três tratamentos e duas repetições por tratamento, sendo cada eppendorf perfazendo uma parcela. Os experimentos com abacate, ameixa japonesa, banana, goiaba, mamão e manga foram considerados independentemente. Os dados do período de precipitação, em minutos, foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$ para cálculo estatístico, com exceção das extrações de DNA de abacate em T1, pois os tempos foram superiores a 15 minutos e banana, em T3, devido às qualidades das amostras precipitadas. As informações foram submetidas à análise de variância e comparação entre as médias pelo teste Tukey a 1% de probabilidade, utilizando-se o programa ESTAT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises qualitativas dos bioensaios realizados permitiram verificar que o tampão de extração foi satisfatório para a obtenção de DNA. Para Danner et al. (2011), o macerado obtido na ausência de nitrogênio líquido, mas com o tampão, pode degradar e contaminar as amostras e formar um excesso de espuma durante processo de maceração. Mas conforme Romano & Brasileiro (1999), o uso de tampão de extração é uma alternativa viável à extração de DNA plantas. Ao extrair DNA genômico de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.), Cansanção & Coutinho (2013) também propuseram um protocolo de extração mecânica, ausente de nitrogênio líquido, que ofereceu bons resultados.

Os dados obtidos em T1 demonstraram que houve precipitação do DNA das amostras de abacate, ameixa japonesa, banana, goiaba, mamão e manga (figura 1).

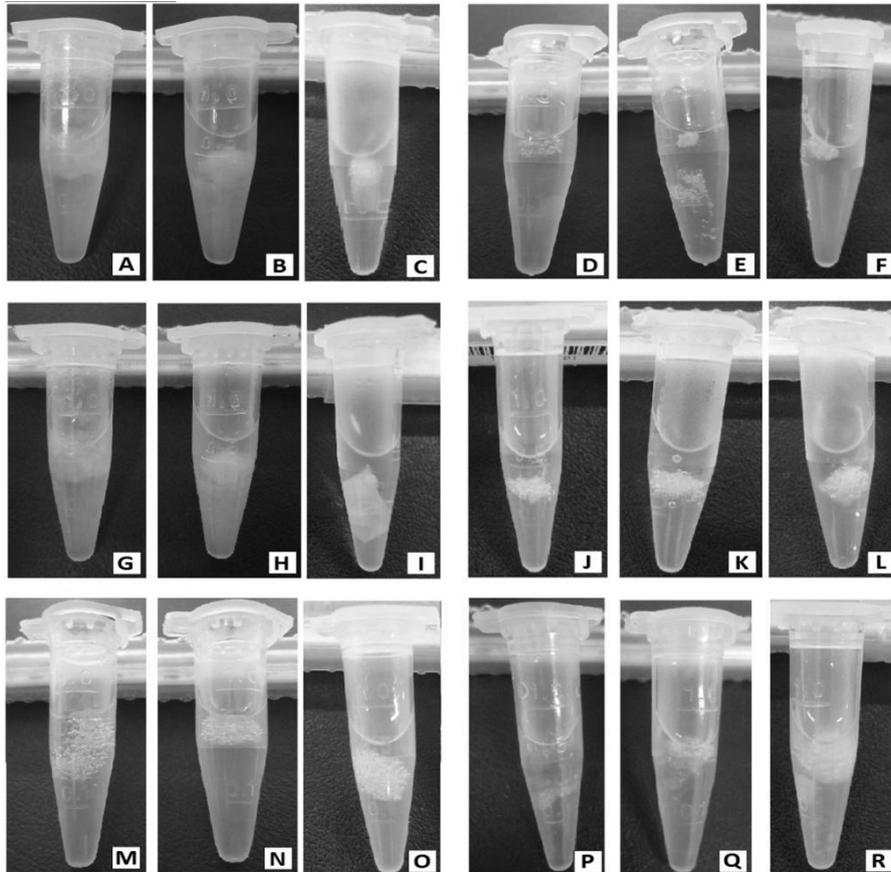


Figura 1. Perfil qualitativo das amostras de abacate (A, B, C), ameixa japonesa (D, E, F), banana (G, H, I), goiaba (J, K, L), mamão (M, N, O), manga (P, Q, R). Amostras de DNA submetidas aos tratamentos T1 (A, D, G, J, M, P), T2 (B, E, H, K, N, Q) e T3 (C, F, I, L, O, R). Sinop/MT, 2013.

No T2, todas as amostras de DNA precipitaram, contudo, o isopropanol rompeu as moléculas de DNA de ameixa japonesa, formando pequenos fragmentos. Em T3, apenas as amostras de DNA de banana não precipitaram, formando uma estrutura consistente, muito diferente do padrão de precipitação do seu DNA extraído via T1 e T2.

Os dados obtidos das amostras de ameixa japonesa, nesse experimento, permitiram verificar a sensibilidade do DNA da planta quando tratado com isopropanol. Contudo, o Mix 1:1 auxiliou para que a extração do DNA de ameixa japonesa fosse realizada em menor tempo e com a qualidade desejada.

Segundo Brown (2003) e Maranhão & Moraes (2003), o isolamento de DNA genômico é considerado um procedimento básico, porém fundamental para a realização de técnicas e aplicações subsequentes, como o sequenciamento e a clonagem gênicos. Existem muitas técnicas de purificação de DNA, pois há a necessidade de ajustamentos das concentrações e dos tipos de reagentes para algumas amostras. Determinadas substâncias podem danificar o DNA, promovendo a sua degradação ou oxidação.

Em experimentos com *Araucaria angustifolia*, Stefenon et al. (2004) utilizaram o isopropanol como substância precipitante e obtiveram DNA de boa qualidade, não interferindo em sua integridade. Danner et al. (2011) testaram em jabuticabeira, um protocolo de precipitação com etanol e o DNA obtido também se manteve íntegro. Esses estudos confirmam a informação de que

existe a necessidade de se adaptar o protocolo de extração de DNA à planta e não o sentido inverso. Refletindo sobre a proposta do mix 1:1, obteve-se precipitação rápida, íntegra e com solução límpida para 83,3% das plantas utilizadas, o que pode ser alcançado em outros experimentos vegetais.

A partir dos dados de tempo de precipitação, observou-se que a suspensão de DNA em T1 foi superior em todas as plantas, se comparado aos tratamentos T2 e T3 (tabela 1). Ou seja, o uso de etanol prorrogou o tempo de precipitação do DNA das amostras de todas as plantas. Os tempos de precipitação do DNA em T2 reduziram-se, significativamente. Apenas o tempo de precipitação do mamão em T2 não diferiu, estatisticamente quando submetida ao T3. O uso do mix 1:1 (T3) demonstrou ser o melhor método de precipitação para essas plantas, embora o DNA de banana em T3 não tenha precipitado.

Tabela 1. Tempo de precipitação das amostras de DNA (em minutos). Sinop/MT, 2012.

Planta	T1	T2	T3
Abacate	> 15 min.a	3.21 b	2.83 c
Ameixa	16.05 a	3.37 b	1.61 c
Banana	13.50 a	3.87 b	-
Goiaba	14.22 a	3.52 b	1.72 c
Mamão	3.94 a	2.80 b	2.45 b
Manga	12.81 a	3.50 b	2.25 c

¹Dados transformados em $arc\ sen\sqrt{x/100}$. Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Para Antonini et al. (2004), o álcool adicionado à fase aquosa forma um precipitado de DNA que pode ser facilmente visualizado, removido ou “peletizado” por centrifugação. A precipitação realizada com etanol ou isopropanol estimula a mudança estrutural das moléculas de DNA, ocorrendo agregação e suspensão de suas moléculas (Oliveira et al., 2005).

De acordo com Trindade et al. (2013), os álcoois são solúveis em água, mas essa solubilidade diminui à medida que seu peso molecular aumenta. O isopropanol possui peso molecular de 60,10 g mol⁻¹ enquanto que o etanol apresenta 46,06 g mol⁻¹ de peso molecular. Sendo assim, o isopropanol apresenta menor afinidade por água, se comparado ao etanol, o que faz o DNA precipitar mais rapidamente. Contudo, o poder de desidratação do isopropanol é maior ao do etanol, podendo provocar ruptura das moléculas de DNA.

Conforme foi demonstrado nesse estudo, T3 pode ser considerado uma alternativa útil à extração de DNA. Diversos protocolos têm sido alterados e testados e alguns deles utilizam etanol e isopropanol (Doosty et al., 2012; Kamala Jayanthi et al., 2012; Mornkham et al., 2012). Mas não foi encontrada a proposta de utilização simultânea de isopropanol e etanol em nenhum dos protocolos avaliados. Os DNAs submetidos ao T3 precipitaram rapidamente e ficaram íntegros, demonstrando que tal tratamento, além de ter baixo custo, é bastante eficaz.

CONCLUSÃO:

O etanol e isopropanol são utilizados em protocolos de extração de DNA, como agentes precipitantes, mas adequações de protocolos devem ser realizadas em virtude das diferentes amostras vegetais. Neste experimento, quando se utilizou apenas o etanol (T1), as moléculas de DNA demonstraram estar íntegras, mas a substância prolongou o período de precipitação do DNA,



se comparado aos tratamentos T2 e T3. O uso de isopropanol (T2) favoreceu a diminuição do tempo de suspensão, embora tenha fragmentado o DNA de todas as amostras de ameixa japonesa, corroborando para que a substância, isoladamente, não seja eficiente para a extração de DNA desta planta. O mix 1:1 (T3) foi considerado o melhor tratamento, pois associou a integridade do DNA fornecida pelo etanol e os menores tempos de precipitação proporcionados pelo isopropanol. Pode-se dizer que o T3 tem alto grau de eficácia e baixo custo, sendo favorável em protocolos de extração de DNA.

REFERÊNCIAS

- Andrade, M.A.B.S. & Caldeira, A.M.A. (2009). O modelo de DNA e a Biologia Molecular: inserção histórica para o Ensino de Biologia. *Filosofia e História da Biologia*, 4: 139-165.
- Antonini, S.R.C.; Meneghin, S.P.; Urashima, A.S. *Técnicas básicas de biologia molecular*. Araras: UFSCar. 2004.
- Arbi, G.; Naceur, B.; Chokri, M.; Mohamed, B.; Mohamed, N. (2009) A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from *Allium roseum* L. (Alliaceae). *Afr. J. Biotechn.*, 8(17): 4020-4024.
- Baratto, C.M. & Megiolaro, F. (2012). Comparação de diferentes protocolos de extração de dna de bactérias para utilização em RAPD-PCR. *Unoesc & Ciência*, 3(1):121-130.
- Brown, T. A. *Clonagem gênica e análise de DNA*.(2003). 1 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Cansanção, I.F. & Coutinho, H.D.M. (2013). Estudo comparativo de dois métodos de extração de DNA genômico do pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.). *Rev. Biol. Farm.*, 9(1):13-17.
- Danner, M.A.; Sasso, S.A.Z.; Bittencourt, J.V.M.; Citadin, I.; Sachet, M.R. (2011). Proposta de protocolo para extração de DNA de Jabuticabeira. *Ciência Florestal*, 21(2):363-367.
- Doosty, B.; Drikvand, R.; Salahvarzi, E.; Amiri, H.; Hadian, J. (2012). Comparative Analysis and Optimization of Different DNA Extraction Protocols in *Satureja khuzistanica*. *Inter. J. Biology*, 4(4):111-116.
- Kamala Jayanthi, P.D.1; Rajinikanth, R.; Sangeetha, P.; Ravishankar, K.V.; Arthikirubha, A.; Devi Thangam, S.; Abraham, V. 2012. *Afr.J. Biotech.*, 11(90):15654-15657.
- Lewin, B. (2009). *Genes IX*. 9.ed. Porto Alegre: Artmed.
- Lima, M. (2008). *Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular*. Embrapa Algodão. Campina Grande.
- Maranhão, A.Q.; Moraes, L.M.P Extração e purificação de DNA. 2003. In: Azevedo, M.O.; Felipe, M.S.S; Brígido, M.M.; Maranhão, A.Q.; Souza, M.T. *Técnicas básicas em biologia molecular*. Brasília, DF: Universidade de Brasília.



Momeni, H.; Shiran, B.; Kohgard, M.; Khoddambashi, M. Development of a rapid and efficient method for DNA extraction from plants containing high amount of polyphenols and secondary methabolite. *Protocol online*. 2011.

Mornkham, T.; Wangsomnuk, P.P.; Wangsomnuk, P.; Jogloy, S., Pattanothai, A., Fu, Y.B. 2012. Comparison of five DNA extraction methods for molecular analysis of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Genet . Mol. Res.*11(1):572-581.

Oliveira, M.C.S.; Oliveira-Sequeira, T. C.; Araujo, J.R.; Amarante, A.F.T.; Oliveira, H. N. (2005). *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, *Vet. Parasitology*, 130: 61-67.

Rosa, D.D. (2008). Método rápido de extração de DNA de bactérias. *Summa phytopathol.* 34(3): 259-261.

Stefenon, V.M.; Nodari, R.O. Guerra, M.P. 2004. Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais. *Biotemas*, 17(1):47-63.

Trindade, D.F.; Oliveira F.P.; BANUTH, G.S.L. *Química básica*. 5. ed. São Paulo: Ícone. 2013.