

RESUMO - CIÊNCIAS AGRÁRIAS - MEDICINA VETERINÁRIA

**EFICIÊNCIA COMPARATIVA DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA
EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS: IMPLICAÇÕES
PARA ENSAIOS DE PCR**

Sophia Marques Potz De Oliveira Da Costa (sophiapotz@ufrj.br)

Luana De Oliveira Silva (luana.oliveira2001@outlook.com)

Rebeca Praxedes Nogueira Dantas (rebeca.praxedes@hotmail.com)

Manuela De Jesus Pitta (20230027011@ufrj.br)

Maria Rita Dager Costa Vieira (mariaritadager@ufrj.br)

?Mário Tatsuo Makita (tatsuomakita@gmail.com)

Dayanne Araújo De Melo (daymelo.com@gmail.com)

Theresse Camille Nascimento Holmström (theresseholmstrom@yahoo.com.br)

Miliane Moreira Soares De Souza (milianemss@gmail.com)

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta indispensável em pesquisas voltadas à identificação bacteriana e à detecção de genes de resistência. Entretanto, para que os resultados da PCR apresentem confiabilidade e reprodutibilidade, a qualidade do DNA extraído constitui um ponto crítico de controle. Dessa forma, a escolha de protocolos de extração adequados é essencial para assegurar o equilíbrio entre custo, praticidade e qualidade das extrações obtidas. O presente estudo teve como objetivo comparar e analisar cinco protocolos de extração de DNA bacteriano,

buscando determinar aquele que oferece melhor relação entre custo e qualidade, considerando isolados representativos de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. O grupo de bactérias Gram-negativas foi composto por 10 cepas de *Escherichia coli*, isoladas de amostras de urina de cães, enquanto o grupo de Gram-positivas incluiu 10 cepas de *Staphylococcus pseudintermedius*, obtidas a partir do conduto auditivo de cães. Todas as cepas foram previamente caracterizadas fenotipicamente e confirmadas por espectrometria de massas por dessorção/ionização a laser assistida por matriz, associada ao tempo de voo (MALDI-TOF MS). Os protocolos avaliados foram selecionados com base em critérios de custo, eficiência e aplicabilidade, sendo eles: 1) Extração de DNA de bactérias Gram-Positivas; 2) Extração de DNA de bactérias Gram-Negativas; 3) Extração de DNA de todas as bactérias; 4) Extração de DNA com Kit Extracta®Mdx para Gram-Positivas e 5) Extração de DNA com Kit Extracta®Mdx para Gram-Negativas. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop 2000. As razões de absorvância em 230, 260 e 280nm foram utilizadas para determinação de concentração e pureza dos DNA extraídos. Os ácidos nucleicos apresentam absorvância máxima em 260 nm, enquanto proteína absorvem majoritariamente em 280 nm. Utiliza-se a razão 260/280 como um indicador de pureza do DNA, sendo valores próximos a 1,8 considerados ideais em termos de presença de proteínas. A razão de 260/230 é utilizada como indicador de carboidratos, que podem prejudicar a reação de PCR. Ressalta-se ainda que concentrações excessivas de DNA podem prejudicar a reação, embora não exista uma padronização universal. No protocolo 1, as amostras de Gram-positivas apresentaram concentração média (CM) de 32,15 ng/μL, com alta dispersão dos valores (desvio padrão – DP = 522,63 ng/μL). Já as amostras de Gram-negativas apresentaram CM de 1900,35 ng/μL, com DP de 902,76. Na análise de qualidade, a razão 260/230 apresentou valores inferiores a 1,0. No protocolo 2, as amostras de Gram-positivas apresentaram CM de 615,45 ng/μL (DP = 201,67), enquanto as Gram-negativas obtiveram CM de 1051,87 ng/μL (DP = 286,59). As razões 260/280 foram satisfatórias, próximas ao esperado (2,23 e 1,62, respectivamente), embora os valores de 260/230 tenham permanecido abaixo do ideal. No protocolo 3, as bactérias Gram-negativas apresentaram CM de 241,84 ng/μL (DP = 128,5), e as Gram-positivas, CM de 145,98 ng/μL (DP = 56,2). As razões 260/280 foram de 2,0 e 2,4, e os valores de 260/230 de 1,16 e 1,52, respectivamente, o que indica melhor desempenho em termos de pureza quando comparado aos protocolos anteriores. No protocolo 4, as Gram-negativas apresentaram CM de 201,1 ng/μL (DP = 58,64), com valores de

260/280 de 1,92 e 260/230 de 1,43. Já no protocolo 5, a extração direta a partir de colônias de Gram-negativas resultou em CM de 215,5 ng/μL, razão 260/280 de 1,24 e razão 260/230 de 0,75, indicando maior presença de contaminantes. A análise dos resultados evidencia que a eficiência dos protocolos de extração de DNA é fortemente influenciada pela estrutura da parede celular bacteriana e pelos reagentes empregados. Entre os métodos avaliados, o kit Extracta®Mdx apresentou melhor desempenho em termos de pureza e praticidade, configurando-se como a alternativa mais recomendada para a extração de DNA em diferentes tipos de bactérias a serem submetidas a análises por PCR.

Palavras-chave: extração de dna; protocolos ; gram- positivas; gram-negativas; pcr.