

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS**

Cesar David Guerra Naranjo

**Desenvolvimento de um método
para extrair DNA total de amostras
biológicas empregando uma
substância caotrópica e vidro
reciclado como fonte de sílica**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2021**

Cesar David Guerra Naranjo

Desenvolvimento de um método para extrair DNA total de amostras biológicas empregando uma substância caotrópica e vidro reciclado como fonte de sílica

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientador(a): Dr(a). Ana Paula Guedes Frazzon
Coorientador(a): Dr(a). Tanira Alessandra Silveira Aguirre

**Porto Alegre
2021**

Catálogo na Publicação

Guerra Naranjo, Cesar David

Desenvolvimento de um método para extrair DNA total de amostras biológicas empregando uma substância caotrópica e vidro reciclado como fonte de sílica / Cesar David Guerra Naranjo. -- 2022.

65 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2022.

Orientador(a): Ana Paula Guedes Frazzon ;
coorientador(a): Tanira Alessandra Silveira Aguirre.

1. Extração de DNA. 2. Sal Caotrópica. 3. Sílica. 4. PCR. I. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), e também na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e contou com recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

AGRADECIMIENTOS

A la vida y a Dios por tener el privilegio cada día de disfrutar el placer de estar vivo, aprender de mí, superarme y conocerme a cada momento.

A mis padres Marlene y José, por su amor incondicional. Muchas veces cuando nadie creía en mí ustedes lo hicieron, limpiaron mis lágrimas y me abrazaron. No fue fácil para ustedes dejarme ir para buscar mis sueños, para mí también ni lo fue. Sus valores, educación y amor nunca me dejaron perdido por el camino de la vida, siempre encontraba el retorno.

A mis hermanos Israel y Josué, por apoyarme muchos años y conseguir alcanzar el lugar que me encuentro. Siempre fueron mi fortaleza, los amo, me han hecho mucha falta en estos años. Gracias por amarme y cuidarme siempre

A Bárbara y Andrea, aunque tuvieron muchas razones para dejarme ir, no lo hicieron y se quedaron conmigo. Cuando ya no tenía razones para continuar, ustedes me brindaron sus hombros para llorar como un niño. Gracias.

A Carlos mi amigo querido, eres y serás siempre esa persona que me saca una sonrisa y me levanta cuando ya no doy más. Con quien he vivido muchas locuras, risas, tristezas y siempre aprendemos juntos.

A Ana y Tanira, ustedes representan esa confianza que todo estudiante necesita: "Que su tutor crea en él", y ustedes creyeron en mí. Me acogieron, me brindaron amor y paz. Gracias por creer MI.

A quienes pasaron por mi vida en esta jornada y me enseñaron indirectamente lo mucho que aún no conocía de mi mismo.

Me agradezco a mi mismo, por haberme permitido salir de mi zona de confort para hallar mi propio camino y mi razón de ser en la vida. Logré crecer y liberarme de las creencias que me limitaban llegar a conquistar mi felicidad. Ahora sé quien soy.

“Amarse a sí mismo constituye el acto de amor más grande en la vida, en él nos aceptamos de tal forma que aprendemos que somos los únicos responsables de nuestra felicidad”

David Naranjo

SUMARIO

1	RESUMO	11
2	ABSTRACT	12
3	INTRODUÇÃO	13
3.1	Ácidos nucleicos.....	13
3.2	Ácido desoxirribonucleico (DNA).....	13
3.2.1	Estrutura do DNA	13
3.2.1.1	Estrutura primária	14
3.2.1.2	Estrutura secundária.....	14
3.2.1.3	Níveis de empacotamento de DNA	14
3.3	Extração e purificação de DNA	14
3.4	Métodos de extração e purificação de DNA.....	15
3.4.1	Métodos mecânicos	15
3.4.2	Métodos não mecânicos	15
3.4.2.1	Métodos enzimáticos	15
3.4.2.2	Métodos químicos.....	16
3.4.2.2.1	Surfactantes	16
3.4.2.2.2	Solventes orgânicos.....	16
3.4.2.2.3	Agentes caotrópicos.....	17
3.4.2.3	Extração de fase sólida	18
3.4.2.3.1	Troca iônica.....	18
3.4.2.3.2	Separação magnética	18
3.4.2.3.3	Adsorção seletiva.....	18
4	OBJETIVOS	20
4.1	Objetivo Geral	20
4.2	Objetivos específicos	20

5	ARTIGO.....	21
6	DISCUSSÃO GERAL.....	57
7	CONCLUSÕES	58
8	REFERENCIAS.....	59
9	CURRICULO LATTES	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

PCR:	Reação em cadeia da polimerase
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
RNA:	Ácido ribonucleico
rDNA:	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra acético
Nal:	Iodeto de sódio
Tris-HCl:	Tris-cloridrato
DTT:	Dithiothreitol
CTAB:	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
ECHA:	Agência europeia para substâncias e misturas químicas
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TBE	Tris borato etilenodiamino tetra acético
RNAses	Ribonucleases
DNAses	Desoxirribonucleases
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
GuCl	Cloreto de guanidina
GuSCN	Tiocianato de guanidina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais surfactantes empregados para lise celular	16
--	----

1 RESUMO

As relações funcionais e interacionais entre ácidos nucleicos e proteínas são o arcabouço estrutural para estudos de biologia molecular. Nesse contexto, a obtenção de um material genético de alta qualidade é uma etapa crítica para aplicações *downstream*. Diante disso, desenvolvemos um método de extração para obtenção de DNA de alta qualidade de forma segura, ecológica e aplicável para diversos tipos de amostras biológicas. Para isso, três tipos diferentes de vidro reciclado de laboratório à base de borosilicato foram usados como fonte de sílica e iodeto de sódio como sal caotrópico, que se tornou uma ferramenta poderosa para lise celular e extração de DNA. Este método foi usado para extrair o DNA de diferentes amostras biológicas, incluindo amostras fecais e culturas de bactérias e fungos. Todas as amostras também foram analisadas com um kit comercial para comparação dos resultados. O controle de qualidade dos DNAs extraídos baseou-se na quantificação da concentração e pureza por espectrofotometria, e a integridade foi determinada por eletroforese em gel de agarose. Adicionalmente, os DNAs extraídos foram submetidos à amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para verificação da viabilidade para processos *downstream*. Os resultados mostraram que nosso método apresentou maior pureza e integridade total dos DNAs extraídos em comparação ao kit comercial, e o rendimento não foi estatisticamente diferente. Finalmente, o novo método de extração de DNA pode ser reproduzível e aplicável em um processo posterior como PCR.

Palavras Chaves

Extração de DNA; Substância Caotrópica; Sílica; PCR

2 ABSTRACT

The functional and interactional relationships between nucleic acids and proteins are the structural scaffold for molecular biology studies. In this context, obtaining a high-quality genetic material is a critical step for downstream applications. Given that, we developed an extraction method to obtain high-quality DNA safely, environmentally friendly, and applicable to diverse types of biological samples. For that, three different types of borosilicate-based recycled laboratory glass were used as a source of silica and sodium iodide as a chaotropic salt, which became a powerful tool for cell lysis and DNA extraction. This novel method was used for DNA extraction from different biological samples, including fecal samples and bacterial and fungal cultures. All samples were also analyzed with a commercial kit for comparison of results. The quality control of the extracted DNAs was based on the concentration and purity by spectrophotometry, and the integrity was determined by agarose gel electrophoresis. Additionally, the extracted DNAs were submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification, for verifying the viability for downstream processes. The results showed that our method had a higher purity and full integrity of the extracted DNAs comparing to the commercial kit, and the yield was not statistically different. Finally, the novel DNA extraction method can be reproducible and applicable in a downstream process such as PCR.

Keywords

DNA extraction; Chaotropic Salt; Silica; PCR

3 INTRODUÇÃO

A biologia molecular é uma área dedicada ao estudo dos mecanismos moleculares que envolvem a expressão gênica e sua regulação (1). A expressão de um gene começa com o processo de transcrição controlado por proteínas chamadas fatores de transcrição, reguladas pelos sinais recebidos pelas células, e termina com a produção de um RNA funcional e, posteriormente, no caso dos mRNAs, com a tradução de uma proteína madura e ativa (2). Essas relações funcionais entre DNA, RNA e proteínas correspondem à base do dogma central da biologia molecular (3). Desde 1960, os biólogos moleculares desenvolveram métodos para identificar, isolar e manipular componentes moleculares nas células, incluindo DNA, RNA e proteínas (4). A obtenção de DNA é o ponto de partida para a maioria das análises genéticas, mesmo com pequenas quantidades de DNA e por meio de ferramentas de biotecnologia e biologia molecular, genes específicos podem ser amplificados *in vitro*, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) por exemplo (5,6).

3.1 Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos constituem o material genético dos organismos e são necessários para o armazenamento e a expressão da informação genética. Existem dois tipos de ácidos nucleicos química e estruturalmente diferentes: ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA); ambos são encontrados em todas as células procarióticas, eucariotos e vírus (2).

3.2 Ácido desoxirribonucleico (DNA)

O DNA, ou ácido desoxirribonucleico, é o sistema central de armazenamento de informações genéticas da maioria dos animais e plantas, e até mesmo de alguns vírus (7).

3.2.1 Estrutura do DNA

Essa molécula é composta por duas cadeias ligadas por ligações de hidrogênio, efeito causado pela interação de suas bases nitrogenadas. Cada cadeia é composta por um açúcar (desoxirribose), uma base nitrogenada (adenina, timina, citosina ou guanina) e um grupo fosfato. A sequência de cada base nitrogenada determina a codificação para formar proteínas e moléculas de RNA (8).

3.2.1.1 Estrutura primária

Corresponde à sequência de nucleotídeos do polinucleotídeo linearizado. A informação genética está contida na ordem exata das bases nitrogenadas que compõem os nucleotídeos, e se alguma dessas bases ou sua ordem for modificada, a informação será alterada (2).

3.2.1.2 Estrutura secundária

Em células eucarióticas, o DNA é encontrado como uma fita dupla de polidesoxirribonucleotídeos (DNA de fita dupla, dsDNA). As duas fitas de DNA giram em torno de um eixo imaginário de simetria e formam uma estrutura helicoidal. Na hélice de DNA, a coluna de desoxirribose-fosfato hidrofílica de cada cadeia está do lado de fora da molécula, enquanto as bases nitrogenadas hidrofóbicas são orientadas para dentro. A relação espacial gerada pela rotação entre as duas cadeias da hélice cria um sulco maior (largo) e um sulco menor (estreito) (2,3)

3.2.1.3 Níveis de empacotamento de DNA

Devido ao comprimento do DNA genômico nas células eucarióticas (cerca de 2 metros / célula) é necessário compactá-lo, para que ocupe menos espaço e se encaixe no núcleo da célula. O DNA se associa a nucleoproteínas (histonas e não histonas) para formar a cromatina e dar origem aos cromossomos (2).

3.3 Extração e purificação de DNA

A qualidade do DNA extraído é muito importante para futuras aplicações no campo da biologia molecular (9). Assim, nos processos de extração de DNA, há duas categorias envolvidas em sua purificação, que incluem: a extração de construções de DNA recombinante, como plasmídeos ou bacteriófagos e a extração de cromossomos ou DNA genômico de organismos procarióticos e eucarióticos (10).

Para uma extração correta de DNA de alta pureza é necessário atender aos requisitos como: uma adequada lise de celular ou tecidos, desnaturação de complexos de nucleoproteínas, remoção de contaminantes e a inativação da atividade de nucleases (RNases e DNases) (11). No entanto, o tempo e a complexidade do método desempenham um papel muito importante na extração

do DNA (12). Para isso, é importante saber que os processos eficientes para extrair DNA devem ser métodos sensíveis, reprodutíveis e, sobretudo, não requerer uma infraestrutura altamente especializada para serem executados (13). Ressalta-se que dependendo do foco de estudo, é imprescindível saber o tipo de fonte de extração, mais frequentemente são empregadas amostras biológicas como: isolados de culturas puras, tecidos, fezes ou amostras ambientais como água e/ou solo (14).

3.4 Métodos de extração e purificação de DNA

Diversos métodos para extrair DNA têm sido publicados na literatura. No entanto, a lise celular é uma etapa crucial para garantir a recuperação estável e bem-sucedida do DNA (15,16). A ruptura celular é acompanhada pela liberação de diferentes componentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas e outras macromoléculas (17). De acordo com seu processo de rompimento ou lise celular, podemos classificar os métodos de extração de DNA em: métodos mecânicos e não mecânicos, e que além disso podem atuar combinados (18–20).

3.4.1 Métodos mecânicos

Nos métodos de lise mecânica a membrana e a parede celular são decompostas fisicamente por meio do uso de força de cisalhamento (21). Essa força pode ser gerada através dos seguintes processos que são os mais utilizados: contas de vidro, fervura, trituradores e sonicação (22).

3.4.2 Métodos não mecânicos

Esses processos, pela sua natureza, podem ser enzimáticos ou químicos, ou seja, não utilizam forças de cisalhamento e a influência de fatores físicos para gerar a lise celular (23).

3.4.2.1 Métodos enzimáticos

A lise enzimática é um processo de lise celular biológica em que são utilizadas enzimas como lisozima, lisostafina, zimolase, celulose, protease ou glicanase (24). Uma vantagem da lise enzimática é a sua especificidade, que se deve à composição estrutural celular de procariotos e eucariotos. Como exemplo podem-se citar: as lisozimas são usadas para a lise de células bacterianas, a

quitinase pode ser usada para a lise de células de levedura e as pectinases são utilizadas para a lise de células vegetais (25).

3.4.2.2 Métodos químicos

Esses métodos são baseados no uso de tampões de lise para quebrar a membrana celular. Os tampões ou buffers de lise rompem a membrana celular alterando seu pH, permeabilidade celular e osmose (26). Detergentes também podem ser adicionados aos tampões de lise celular para solubilizar proteínas de membrana, transmembrana e romper a membrana celular para liberar seu conteúdo (27). As principais substâncias utilizadas para gerar lise celular são: surfactantes, solventes orgânicos, agentes caotrópicos, agentes quelantes, sais e bases como cloreto de sódio (NaCl) e hidróxido de sódio (NaOH) respectivamente (28,29).

3.4.2.2.1 Surfactantes

São moléculas utilizadas para gerar rompimento celular, diminuir a tensão superficial de um líquido e liberar o conteúdo intracelular (28,30). Por outro lado, são moléculas anfifílicas, o que lhes confere a capacidade de apresentar regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. Esta propriedade anfifílica permite que os detergentes quebrem as associações proteína-proteína, proteína-lipídio e lipídio-lipídio, desnaturem proteínas e outras macromoléculas e evitem ligações inespecíficas em ensaios imunoquímicos e cristalização de proteínas (31). Esses surfactantes são classificados de acordo com sua natureza eletroquímica (Tabela 1).

Tabela 1 Principais surfactantes empregados para lise celular

Tipo	Exemplos
Iônico	Dodecilsulfato de sódio (SDS), desoxicolato de sódio colato de sódio, lauroil sarcosinato de sódio (sarcosil).
Não iônico	Família Triton, NP40, Família Tween, Pluronic F-68
Zwitterioônico	3-Colamidopropil dimetilamonio 1-1propanosulfonato (CHAPS)

Adaptado de (Johnson, 2013) (29)

3.4.2.2.2 Solventes orgânicos

Esses compostos permitem a geração de lise celular pelo aumento da permeabilidade celular e de membrana, os mais utilizados são: álcoois, fenol e

clorofórmio (32). A extração por solvente orgânico geralmente usa fenol e clorofórmio. Por sua vez, envolve a adição em série de vários outros produtos químicos, como dodecilsulfato de sódio (SDS) e proteinase K para quebrar as membranas celulares e quebrar as proteínas que protegem as moléculas de DNA enquanto estão nos cromossomos (33). Este tipo de extração continua sendo um dos mais confiáveis e eficientes, embora demore muito para ser executado (34).

Solventes orgânicos como fenol e clorofórmio, de acordo com a Agência Europeia de Química (ECHA, *European Chemicals Agency*) são considerados nocivos, tóxicos e corrosivos. Portanto, sua utilização pode representar uma fonte de riscos de exposição tanto para as operadoras quanto para o meio ambiente (33).

3.4.2.2.3 Agentes caotrópicos

Agentes caotrópicos são compostos que podem interromper a rede de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e reduzir a estabilidade do estado nativo das proteínas ao enfraquecer o efeito hidrofóbico (36). Em geral, eles afetam as interações não covalentes entre macromoléculas na água, esta capacidade permite que as moléculas de água penetrem nas proteínas e alterem as ligações bissulfeto e de hidrogênio de suas conformações estruturais, tais como: secundária, terciária e quaternária, mas não a primária (37). Além disso, apresentam capacidade inibitória de nucleases (RNAses e DNAses), o que torna o processo de extração de DNA de alto rendimento (38). As principais substâncias caotrópicas utilizadas no isolamento do DNA são: tiocianato de guanidina (GuSCN), cloreto de guanidina (GuCl) e iodeto de sódio (NaI).

Um estudo focado na investigação da biodiversidade de bactérias comensais em fezes humanas, utilizou uma substância caotrópica como o GuSCN para a desnaturação de macromoléculas como proteínas e devido à propriedade altamente inibitória das nucleases, que lhes permitiu obter um excelente rendimento de extração de DNA e com alta pureza (39).

3.4.2.3 Extração de fase sólida

3.4.2.3.1 Troca iônica

Baseia-se na interação específica entre fosfatos de ácido nucleico carregados negativamente e moléculas de superfície carregadas positivamente no substrato. O DNA se liga especificamente ao substrato na presença de um sal de baixa concentração, os contaminantes são removidos por etapas de lavagem usando um tampão de baixo ou médio sal e o DNA purificado é eluído usando um tampão de alto teor de sal (40). Esta interação eletrostática da molécula alvo com um grupo funcional da matriz colunar (41).

3.4.2.3.2 Separação magnética

A separação magnética é baseada na ligação reversível de DNA a uma superfície sólida magnética, grânulos e partículas que foram revestidas com um anticorpo de ligação a DNA ou um grupo funcional que interage especificamente com DNA (42). Após a ligação ao DNA, as contas são separadas de outros componentes celulares contaminantes, lavadas e o DNA purificado é eluído por extração com etanol. Este método é rápido, fácil de executar e pode ser automatizado (43).

3.4.2.3.3 Adsorção seletiva

Na cromatografia de adsorção, os ácidos nucleicos são seletivamente fixados em sílica ou vidro, na presença de certos sais (por exemplo, sais caotrópicos). O DNA é adsorvido especificamente em membranas, grânulos ou partículas de sílica na presença de certos sais e em um pH definido. Os contaminantes celulares são removidos por etapas de lavagem. O DNA é recuperado em uma eluição ou tampão de baixo teor de sal (41)

Com base no que foi anunciado anteriormente, um estudo realizado por Dederich *et al.*, 2002 (44), por meio do uso de pérolas de vidro para a purificação do DNA de plasmídeo e posterior uso desse material genético para sequenciamento de alto rendimento em genomas de mamíferos, demonstrou que, o uso de contas de vidro teve grande sucesso em termos de eficiência e desempenho, bem como uma redução econômica nos custos normalmente envolvidos na utilização de kits comerciais.

Da mesma forma, outro estudo por Ren *et al.*, 2007 (45) cujo foco era desenvolver um método para extrair DNA de forma rápida, barata e eficaz para amostras ambientais, foi realizado utilizando pó de vidro e carvão ativado como descontaminante de substâncias húmicas. Como resultado, DNA de alta qualidade foi obtido com base na concentração, pureza e integridade das amostras extraídas, demonstrando assim a viabilidade da adsorção seletiva pela sílica como uma alternativa para extrair DNA.

Portanto, este projeto de pesquisa visa desenvolver um método de extração de DNA genômico utilizando vidro reciclado de laboratório de três tipos (transparente, âmbar e verde) e em combinação com um agente caotrópico, iodeto de sódio (NaI) para gerar um bioproduto de baixo custo, ecológico e reproduzível que, acima de tudo, seja capaz de fornecer DNA de alta qualidade para ser utilizado em qualquer processo de estudo. A partir de amostras biológicas, como isolados puros de bactérias, leveduras, fungos, e assim como amostras de fezes de animais, o material genético (DNA) foi extraído e, avaliado baseando-se nos parâmetros de eficiência (concentração), rendimento (pureza) e pela integridade do DNA como controle de qualidade, e comparado com um método de extração comercial como controle.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método para extrair DNA total de amostras biológicas empregando uma substância caotrópica e vidro reciclado de laboratório como fonte de sílica.

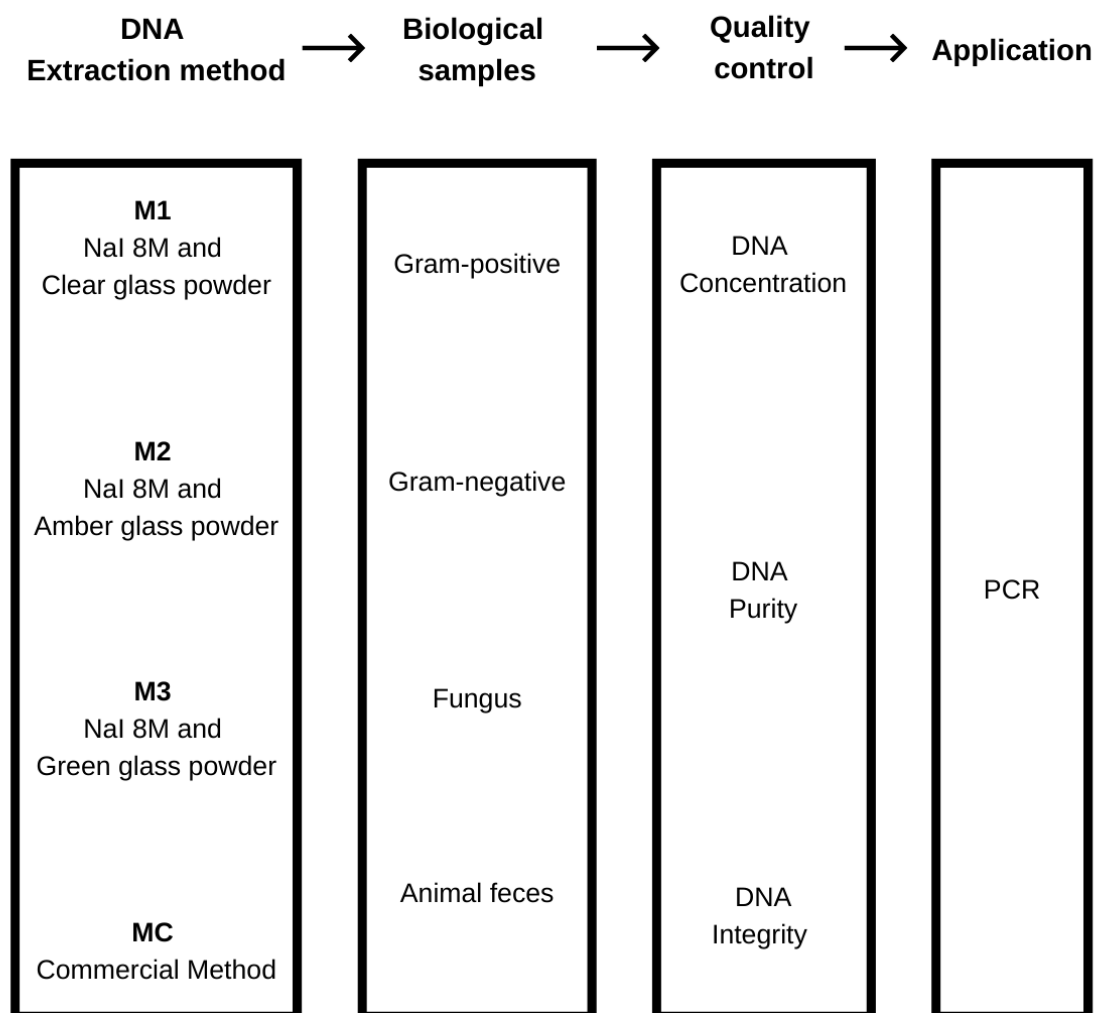
4.2 Objetivos específicos

- Projetar um protocolo de trabalho para o método de extração proposto
- Determinar o potencial sinérgico de ação entre o iodeto de sódio e o pó de vidro
- Avaliar o método em diferentes condições de pH e temperatura
- Comparar a eficiência, rendimento, e integridade do método proposto em paralelo com um método comercial
- Submeter a processos *downstream* por PCR das regiões *16S rRNA* de procariotos e *ITS* de fungos

5 ARTIGO**DNARS: A Safe, Ecological and, High-Quality DNA extraction method
suitable for diverse biological samples**

Artigo submetido para: JMB – Journal of Microbiology and Biotechnology

Endereço eletrônico da revista: <http://www.jmb.or.kr>

Graphical abstract

DNARS: A Safe, Ecological and, High-Quality DNA extraction method suitable for diverse biological samples

Cesar David Guerra Naranjo¹, Tanira Alessandra Silveira Aguirre¹, Ana Paula Guedes Frazzon^{1,2*}

¹Postgraduate Program in Biosciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Brazil; Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Porto Alegre, RS, Brazil. University of Health Sciences of Porto Alegre, R. Sarmiento Leite 245, Porto Alegre - RS, Brazil. 90050-170.

Federal University of Rio Grande do Sul, R. Sarmiento Leite 352, Porto Alegre – RS, Brazil. 90050-170.

Correspondence author

Ana Paula Guedes Frazzon, 90050-170, ana.frazzon@ufrgs.br, +18578697765

Running title: **DNARS: A High-Quality DNA extraction method**

Abstract

The functional and interactional relationships between nucleic acids and proteins are the structural scaffold for molecular biology studies. In this context, obtaining a high-quality genetic material is a critical step for downstream applications. Given that, we developed an extraction method to obtain high-quality DNA. For that, 3 different types of borosilicate-based recycled laboratory glass were used as a source of silica and sodium iodide as a chaotropic salt, which became a powerful tool for cell lysis and DNA extraction. This novel method was used for DNA extraction from different biological samples, including bacterial and fungal cultures, and fecal samples, and it was also compared with a commercial kit. The quality control of the extracted DNAs was based on the concentration and purity by spectrophotometry, and the

integrity was determined by agarose gel electrophoresis. Additionally, the extracted DNAs were submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification, for verifying the viability for downstream processes. The results showed that our method had a higher purity and full integrity of the extracted DNAs compared to the commercial kit, and the yield was not statistically different. Finally, the novel DNA extraction method can be reproducible and applicable in any downstream process as PCR.

Keywords

DNA extraction; Chaotropic salt; Silica; PCR

Introduction

Several methods for DNA extraction have already been reported [1, 2]. However, only few methods not rely on a highly specialized infrastructure for sample processing, have adequate cost-accessibility, and reduce the risk of exposure caused by the manipulation of the chemical agents employed [3, 4]. Furthermore, an efficient method for DNA extraction need to devise effective cell disruption processes cell, inactivate nucleoprotein complexes and nucleases, remove of inhibitors, and have increased DNA recovery [5–7].

Nowadays, various cell disruption techniques have been tested and these are classified into mechanical and nonmechanical techniques [8, 9]. These approaches have been used alone or in mixed-methods [10, 11]. The mechanical disruption, involves a process of contact breaking that uses shear force, both solid, (such as bead beating), and liquid (as high-pressure homogenizer or microfluidizer) forces [11, 12]. On the other hand, the non-mechanical disruption involves a non-shear force process, in which the integrity and structural composition of cell wall and the cell membrane are sensitized due to physicochemical and biological factors [13]. Under this focus, chemical agents like organic solvents, surfactants, chelating agents, and chaotropic salts are commonly used; in addition, physical agents such as heat shock and osmotic shock processes and biological agents as enzymes are also employed [14, 15].

It's important to highlight that some usual DNA extraction methods employ chemicals with known health risks, for example, phenol-chloroform (PCL) or cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), and others. According to the notifications provided by European Chemicals Agency (ECHA), these chemicals present risks to human health and environmental pollution, because of their high toxicity and corrosivity [16-18]. An alternative approach to circumvent these problems is to use chaotropic salts [19-20]. In aqueous solutions, chaotropic salts successfully destabilize non-covalent interactions, such as hydrogen bonds and Van der Waals forces, that can disrupt biological assemblies such as cellular membranes. Here, proteins are

denatured by stability reduction of their native state, which awakens a hydrophobic effect [21]. It is necessary for the inactivation of nucleases and thus allowing their solubilization by surfactants [22, 23].

Once the cellular content has been released, it is necessary to extract and purify the genetic material. The most common extraction methods have been classified based on separation in density gradient centrifugation, ion-exchange chromatography, reverse-phase chromatography, salting-out, adsorption, and precipitation membranes [24, 25]. Among these, silica-based columns have proven to be an effective, fast, inexpensive, and safe adsorption technique to extract DNA with high efficiency, and unlike other alternative techniques, such as PCL and CTAB, it is not laborious and does not represent a health risk [26–28]. This selective adsorption phenomenon can be enhanced with chaotropic salts, which under specific conditions of pH and ionic strength, interrupt the associations between nucleic acids and water, promoting the binding of DNA to the silica [29]. Then, the denatured macromolecules are solubilized and discarded. Previous reports that used glass matrices as a source of silica have revealed successful yields, obtaining high-quality DNA [30–32].

Prompted by the above facts and findings, our research focused on the development and validation of a methodology to obtain nucleic acids of sufficient quantity and quality, under the implementation of an ecological technology through the reuse of recycled materials based on laboratory glass borosilicate as a source of silica, and a low-demand of a chaotropic salts, using sodium iodide (NaI). Thus, this technology aims to be an alternative for obtaining DNA in an easy, fast, environmentally friendly way, and above all safe for operators by its low risk of exposure.

Materials and Methods

Samples

A total of 14 samples were tested. Four Gram-positive (*Bacillus cereus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus epidermidis*) and four Gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*) bacterial strains were cultured in Tryptic Soy Broth (TSB) (Liofilchem®, Italy) for 24 hours at 37°C. Four fungi (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Penicillium citrinum*, *Exophiala phaeomuriformis* *Saccharomyces cerevisiae*) strains were cultured in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) for 48 hours at 30°C. Two fecal samples from canines and felines were collected in 50 mL sterile conical tubes and stored at 4°C until processing.

Preparation of the Glass powder solution

Three different types of borosilicate-based laboratory recycled glass (clear, green, and amber) were individually collected from the Institute of Basic Health Sciences of the Federal University of Rio Grande do Sul, and pulverized with mortar and pestle until obtaining a fine powder. Then, the *Glass powder solution* was composed of 2 g of each glass powder, resuspended in 10 mL of ultrapure water, and sterilized by autoclaving.

Standardization and DNA extraction method design

For our study, we developed a 4 steps workflow protocol to extract DNA, divided into Cell lysis, DNA extraction, DNA purification, and DNA elution. For the whole standardization process, a TSB culture of *E. coli* was used, and also only the clear glass powder solution.

Cell lysis process

Due that our DNA extraction model is mainly composed of a chaotropic salt and a glass powder solution, it was necessary to know the ideal working concentrations between these two salts. So, the cell lysis is performed with 1mL of the *StartUp Buffer* (X M NaI, 20 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 5% Triton X-100, pH 8.0). The X represents the 5 different NaI molarities

employed (6 M, 7 M, 8 M, 9 M, and 10 M). Here, when the sensitized cell wall and cell membranes released the intracellular content, mainly actioned by the sodium iodide and Triton-X100, the glass powder solution was added to achieve a quantity of 20 mg, 40 mg, 60 mg, and 80 mg of the clear glass powder respectively, and mixed by vortexing to improve the cell disruption.

DNA Extraction

The DNA bonded to the silica was collected by centrifugation at 10.000 x g for 1 min and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended with 1 mL of the *Next buffer* (4 M NaI, 10 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, 5% Tween 20, 0.5% Triton X-100; pH 8.0); and mixed by vortexing. Here, denatured and inactivated proteins are removed by solubilization with surfactants, including the cell debris [33].

DNA Purification

The DNA purification process consisted of the removal of any residual cell detritus or reagent; achieved by a double wash with the *OH buffer* (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, 70% ethanol; pH 8.0). The higher concentrations of alcohol allowed generating a dehydrated solution, the DNA remained bonded to the silica, acquiring a more folded structure. Then, the DNA was removed from silica with 1 mL of absolute ethanol [34]. A fully dehydrated solution based on ethanol stops the DNA electrostatic charge, allowing its release from silica. The DNA then precipitates by its structural supercoiling [35]. Finally, the residual ethanol was removed by dry heat at 56°C for 15 min.

DNA Elution

The dried silica was resuspended in 100 uL of the *Recovery Buffer* (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8.0) and eluted by incubating at 56°C for 5 minutes. Once the elution time has elapsed, the glass particles are removed by centrifugation at 13.000 x g for 5 min. The supernatant

containing DNA was collected and transferred into a new 1.5 mL sterile microtube. Finally, all extracted DNAs were stored at -20°C.

Optimization of working conditions

As part of the standardization process, was important to evaluate whether variations in pH and temperature conditions could improve our working conditions. From here, the clear, green, and amber glass powder solutions were employed for the method optimization individually.

Thus, as cell lysis corresponds to an essential step for the release of intracellular content, it was important to evaluate if the cell lysis and DNA extraction solutions could work at different pH conditions of 8, 9, and 10. Studies have reported that DNA remains more stable in alkaline conditions [36], which facilitates its extraction and purification. In the same way, temperature is an important physical factor that increases the capacity of cell sensitization [13]. In that way, different temperature ranges were also employed such as 56°C, 61°C, 66°C, and 68°C respectively.

DNA extraction from diverse samples

DNA from diverse samples such as Gram-positives, Gram-negatives, fungal cultures, and animal feces were extracted using the protocol as represented in **Figure 1**. All extraction procedures were carried out in duplicate and also using each type of glass powder solution respectively.

In the case of extracting DNA from liquid bacterial and fungal cultures, 1 mL of each culture was placed into a 1.5 mL sterile microtube individually. The cells were collected by centrifugation at 6000 x g for 5 minutes using a High-Speed Micro-Centrifuge D3024R (DLAB Scientific Inc. Rivera St, Riverside, CA 92501, USA), the supernatant was discarded. An amount of animal fecal matter between 100 to 125 mg, deposited individually into a 1.5 mL sterile microtube, resuspended, and well-homogenized by vortexing in 300 uL of the *Recovery buffer* until processing.

The genetic material of the described samples was also extracted parallelly using the NewGene PREP and NewGene PREAmp, a commercial DNA extraction method as control and following the guidelines of the manufacture.

Spectrophotometry assay: Purity and Yield of the extracted DNA

The DNA yield and purity of the samples were determined by spectrophotometry measuring the absorbance at A_{260} and the ratio $A_{260/280}$, respectively, using NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc.).

DNA Integrity

From the extracted DNA, 3 μ L of each sample was used to electrophoresis in 1% (w/v) agarose gel stained with 1X Gel Red loading buffer (QuatroG, Pesquisa e Desenvolvimento Ltda.), with 1X TAE (Tris Acetate-EDTA). The gel was visualized in a Gel documentation system L-PIX TOUCH (Loccus do Brasil LTDA, Santa Mônica, SP, Brazil).

Downstream process: PCR amplification

Extracted DNA from bacterial samples was submitted to PCR targeting a region of *16S rRNA* gene with the primers FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and R530 (5'-CCGCGGCTGCTGGCACGTA-3'), using the PCR conditions from Gontang *et al.* (2011) [36].

For fungal DNA samples, the universal fungal barcode sequence *ITS* (Interspaced Transcribed Spacer) was used as a target with the following primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), using the PCR condition from Menezes *et al.* (2010) [37]. For fecal samples, both PCRs were performed in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

For fecal samples the *16S rRNA* and *ITS* regions were amplified using the same PCR conditions previously described.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Two-Way ANOVA for analyzing the main effect and interaction of each independent variable and a post hoc Tukey's test for multiple comparisons analysis in order to find a significant difference, by the program RStudio Team. A value ($p < 0.05$) was regarded as a significant difference.

Results

Standardization of the DNA extraction method

DNA extracted from an *E. coli* strain was used to standardize the novel DNA extraction method by determining the best condition between the molar variations of NaI and glass powder concentration, both employed to achieve the cell lysis and DNA extraction process. The results in **Table 1** were analyzed through Two-way ANOVA whereby, the interaction between the glass powder concentration and the NaI molar concentration employed had a significant difference according to the concentration of the DNA obtained ($p < 0.05$). Therefore, post hoc Tukey's test revealed that only amounts of glass powder of 20 mg and 40 mg influenced significantly the DNA concentration obtained ($p < 0.05$). In turn, through the same post hoc Tukey's test allowed to know that DNA concentration was statistically different between the NaI molar concentrations of 6, 7, 8, 9 and, 10 ($p < 0.05$). However, the purity of the DNA ($A_{260/280}$) was not statistically significant different based on the NaI molar concentrations and glass powder amounts employed respectively, which means that both variables did not influence the DNA purification process ($p > 0.05$). So, we established to work with conditions of 8 M NaI and 20 mg of glass powder in order to look for further improvements from this point.

pH and temperature influence on DNA quality

As described in the previous section, the extracted DNA did not achieve the desired purity range, $A_{260/280}$ (1.8 ~ 2.0), therefore was necessary to assess if factors such as pH and temperature may improve the DNA extraction process. Principally, after evaluating the variable pH within the effect of the cell lysis and DNA extraction process, as shown in **Table 2**, through Two-way Anova was determined a significant difference for both the DNA concentration and purity with this variable ($p < 0.05$). A post hoc Tukey's test showed that pH conditions of 8, 9

and 10 differed statistically, consequently, as more alkaline the pH became, the DNA purity values increased by reaching the ranges at pH of 10.

The temperature was another important variable for standardizing the novel DNA extraction method, as shown in **Table 3**, the results were determined also through a Two-way Anova that, temperature influenced significantly both the DNA concentration and DNA purity ($p < 0.05$). Through post hoc Tukey's test, the interactions between temperatures revealed that this significant difference was exerted by the temperatures of 56°C, 61°C, 66°C and 68°C, showing that as higher the temperature became, the quality of the DNA increased.

In terms of standardization, the best DNA concentration and purity performance were achieved using working conditions for both the cell lysis and DNA extraction process at pH of 10 and temperature of reaction at 68°C.

Quality control of extracted DNAs: Concentration, purity, and integrity

All DNA extracted from different biological samples described in materials and methods were quantified the concentration and purity and also processed for revealing the integrity of the extracted. The values obtained in **Table 4**, demonstrated through Two-way ANOVA that, the interaction between the extraction methods employed and the biological samples employed did not have a significant difference with the DNA concentration, ($p > 0.05$). However, the main effect of DNA concentration was measured with Tukey's test among the different types of biological samples used which was statistically different, ($p < 0.05$) (**Figure 2**). Therefore, the methods used for extraction such as M1, M2, M3, and MC did not influence significantly the DNA concentration.

In turn, the effect of the different DNA extraction methods employed according to the variable purity $A_{260/280}$ was also measured, which through Two-way Anova, showed a significant difference between the methods, ($p < 0.05$). Therefore, through a post hoc Tukey analysis, it

was shown that the M1, M2, and M3 methods are significantly different from MC ($p < 0.05$) (**Figure 3**), whereby the values are within the reference range of purity for DNA (1.8 ~ 2.0).

The integrity of the DNA, as another essential parameter to corroborate the quality of the process, through an electrophoresis agarose gel run was possible to visualize that the methods M1, M2, and M3 presented full integrity of the extracted DNA, respectively (**Figure 4**). However, as the figure shows the DNA extracted by the MC as a control method, the integrity was not visually clear in any of the 8 extracted DNA samples, instead the presence of fragmented DNA is observed.

***16S rRNA* and *ITS* regions PCR gene amplification**

As a Downstream process application, the DNA samples extracted from Gram-positive and Gram-negative microorganisms were submitted to PCR to amplify the *16S rRNA* region, which is a taxonomic gene for prokaryotic organisms, due that encodes the *16S* ribosomal gene, present in the DNA. Therefore, as reported in **Table 5**, all extracted DNA with the methods M1, M2, and M3 amplified the *16S* gene, which PCR product had a size of approximately 530 bp in an agarose electrophoresis gel.

In turn, for fungal samples including filamentous fungus and yeast, the *ITS* region was employed for its identification, by PCR amplification. In the same way, through an agarose electrophoresis gel was possible to evidence a PCR product of about 560 bp between the methods M1, M2, and M3, respectively.

Due to the diversity of microorganisms present in feces, total DNA extracted from fecal samples was submitted to amplify the *16S rRNA* and the *ITS* gene region. Thus, the stool samples of both feline and canine animals obtained a positive reaction against these genes, thus demonstrating the presence of the biodiversity of prokaryotic and fungal species.

Discussions

The development of the proposed method to extract DNA involved the use of important parameters to standardize it. Thus, during the standardization process it was shown that the NaI concentration significantly influenced the DNA concentration, but not its purity, so its values obtained by absorbance $A_{260/280}$ suggested the presence of RNA. This fact was confirmed through an agarose gel, which made it possible to observe the total or residual presence of RNA and also to demonstrate the integrity of the extracted DNAs as observed in **Appendix 1** [39]. It is possible to mention that, as the molarity of NaI increased, the presence of RNA decreased. This characteristic is related to the hydrolysis of RNA by factors such as pH, temperature and ionic strength, which are conditions that directly influence the molecular stability of RNA [40], which suggests that the use of NaI as a chaotropic salt for the DNA extraction processes can be an optimal alternative since, generally, conventional extraction methods involve highly toxic chemical agents such as PCL and CTAB [41].

Based on this fact, as mentioned the DNA purity did not achieve the ideal ranges, $A_{260/280}$ (1.8 ~ 2.0), this was caused by the residual presence of RNA in the samples during their quantification, and which was also corroborated by observation on an agarose gel. Researches have already been reported that physical-chemical factors such as pH and temperature can directly influence the stability and quality of DNA [42]. So, for the optimization of the method, it was necessary to evaluate whether different pH and temperature conditions could influence the purity of the DNA without resorting to the use of enzymes such as RNases, since these enzymes represent a resource with high operational cost [43]. The results showed that as more pH turns alkaline, the purity values reach their ideal range and, on the other hand, the presence of RNA decreases the values substantially, **Appendix 1**. This is due that RNA exhibits low stability under alkaline pH conditions and high ionic strength from NaI, which makes it a highly reactive molecule and, therefore, generates structural cleavage of its phosphodiester bonds, and

finally, the presence of the hydroxyl group at the 2' position of the sugar allows the RNA to be highly reactive at alkaline pH [44]. Consequently, the formation of these alkoxide ions allowed the structural destabilization of RNA by hydrolysis, thus facilitating removal by solubilization and increasing the purity of DNA [45].

Additionally, the method was evaluated at different temperature conditions, thus verifying that this variable had a significant influence on the concentration and purity of the DNA. This phenomenon is caused by the fact that, during the cell lysis process, where the cell content is released, factors such as temperature and chemical agents influence the sensitization of the cell structure and membrane, thus increasing its permeability, which produces a high cellular disruption [46]. Then, by optimizing these two variables together, pH and temperature, the hydrolysis kinetics of RNA was increased, the sensitivity and cell disruption allowed the elimination of denatured proteins, among other cellular components by solubilization, providing a high-quality DNA [47–49].

Finally, the DNA extracted from diverse biological sources allowed us to know that the yield of the DNA was not statistically different between the proposed extraction method and the commercial method employed. However, an internal analysis of the DNA concentration obtained, allowed to know that, among the different types of samples used, there was a significant difference. Gram-negative samples were those that achieved the highest DNA concentration values. This is due that, during the cell lysis process, the reduced glycan peptide content of the Gram-negative cell wall makes it a more permeable cell type and susceptible to osmotic and mechanical stress factors, such as ionic strength, pH and temperature [50]. Additionally, the cell lysis process seems to increase using glass powder particles, probably due to the fact that irregular edges allow to sensitize the cells by using shear forces mechanically, which further facilitates the release of the cellular content. On the other hand, the concentration of DNA from fungal microorganisms was significantly lower than from the other samples

(**Figure 2**), this phenomenon is due to its structural composition. Fungal cell wall is composed by glycan, chitin, chitosan and glycosylated proteins, which contributes to its cellular rigidity and generally hinders the DNA extraction processes, which needs more rigorous treatments for achieving the cell wall disruption, such as the common use of liquid nitrogen and grinding with mortar and pestil [51, 52].

In addition, the purity of the DNA was an important preamble because comparing with the control method, it was demonstrated that the proposed method obtained high-quality DNA, independently of the glass powder employed (**Figure 3**). Within this panorama, it is important to highlight that the integrity of the DNA constitutes a quality standard since, when comparing all extracted DNA with the control through an agarose gel, revealed that the extracted DNA by the control was all fragmented (**Figure 4**), which makes hard to use for subsequent applications such as PCR. It should be noted that DNA quantification methods are not ideal for corroborating the integrity of the extracted DNA molecules [53]

Finally, it was possible to reuse recycled materials such as glass as a source of silica, and sodium iodide as a chaotropic salt, allowing the development of a bioproduct with optimal quality conditions to extract DNA, suggesting it to be an economical and safe alternative to extract DNA. Furthermore, it is important to highlight that the use of enzymes or specialized equipment was not necessary for its execution. Additionally, its performance in processes such as PCR was very significant for its validation, which demonstrated excellent results, guaranteeing its applicability for subsequent processes such as the PCR tested here.

Acknowledgments

David Naranjo is grateful to the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for providing laboratory facilities and economic support.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare

References

- [1] Stein N, Herren G, Keller B. 2001. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding*. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00615.x>
- [2] Mäki A, Salmi P, Mikkonen A, Kremp A, Tirola M. 2017. Sample Preservation, DNA or RNA extraction and data analysis for high-throughput phytoplankton community sequencing. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01848>
- [3] Chapela M, *et al.* 2007. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.016>
- [4] Boom R, Sol C, Salimans M, Jansen C, Wertheim-van Dillen P, Van der Noordaa J. 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J Clin Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
- [5] Jacobsen N, *et al.* 2009. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the presente. *Nucleic acids research*. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- [6] Sajali N, Wong S, Hanapi U, Abu Bakar S, Tasrip N, Mohd Desa M. 2018. The Challenges of DNA Extraction in Different Assorted Food Matrices: A Review. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14338>
- [7] Verma S, Singh H, Sharma P. 2017. An improved method suitable for isolation of high-quality metagenomic DNA from diverse soils. *3 Biotech*. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0847-x>
- [8] Jahanshahi M, Najafpour G. 2007. Advanced Downstream Processing in Biotechnology, pp. 390-415. In Science Direct. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-044452845-2/50017-3>

- [9] Kumar J, *et al.* 2016. An Improved Methodology to Overcome Key Issues in Human Fecal Metagenomic DNA Extraction. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.06.002>
- [10] Reinkemeier M, Röcken W, Leitzmann C. 1996. A rapid mechanical lysing procedure for routine analysis of plasmids from lactobacilli, isolated from sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00168-5](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00168-5)
- [11] Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy P. 2017. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
- [12] Harrison S. 2011. Cell Disruption, pp. 619–640. In Science Direct. *Comprehensive Biotechnology*, 2nd Ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00127-6>
- [13] Dowd C, Kelley B. 2011. Purification Process Design and the Influence of Product and Technology Platforms, pp. 799–810. In Science Direct. *Comprehensive Biotechnology*, 2nd Ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00137-9>
- [14] Günerken E, D'Hondt E, Eppink M, Garcia-Gonzalez L, Elst K, Wijffels R. 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- [15] Gupta N. 2019. DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology*. http://dx.doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18
- [16] Shetty P, Dairawan M. 2020. The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical Science & Research*. <http://dx.doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>
- [17] Singh U, Kumari M, Iyengar S. 2018. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biological Procedures Online*. <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0077-6>

- [18] Goud T, *et al.* 2018. Novel extraction of high quality genomic DNA from frozen bovine blood samples by using detergent method. *Open Veterinary Journal*. <https://dx.doi.org/10.4314%2Fovj.v8i4.11>
- [19] Hosomi K, *et al.* 2017. Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04511-0>
- [20] Zainabadi K, Dhayabaran V, Moideen K, Krishnaswamy P. 2019. An efficient and cost-effective method for purification of small sized DNAs and RNAs from human urine. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210813>
- [21] Sawyer W, Puckridge J. 1973. The dissociation of proteins by chaotropic salts. *Journal of Biological Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43151-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43151-7)
- [22] Salvi G, De Los Rios P, Vendruscolo M. 2005. Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. <https://doi.org/10.1002/prot.20626>
- [23] Jariwalla R, Grossberg S, Sedmak J. 1977. Effect of chaotropic salts and protein denaturants on the thermal stability of mouse fibroblast interferon. *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-35-1-45>
- [24] Wohlgemuth R. 2019. Product recovery, pp. 681–691. In Science Direct. *Comprehensive Biotechnology*, 3rd Ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00096-3>
- [25] Pouseele H, Supply P. 2015. Accurate whole-genome sequencing-based epidemiological surveillance of mycobacterium tuberculosis, pp. 359-394. In Science Direct. *Methods in Microbiology*, 1st Ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2015.04.001>
- [26] Becker L, Steglich M, Fuchs S, Werner G, Nübel U. 2016. Comparison of six commercial kits to extract bacterial chromosome and plasmid DNA for MiSeq sequencing. *Scientific Reports*. <http://dx.doi.org/10.1038/srep28063>

- [27] Nouws S, *et al.* 2020. Impact of DNA extraction on whole genome sequencing analysis for characterization and relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71207-3>
- [28] Husakova M, Kralik P, Babak V, Slana I. 2020. Efficiency of DNA isolation methods based on silica columns and magnetic separation tested for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in milk and faeces. *Materials*. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fma13225112>
- [29] Alonso A. 2013. DNA Extraction and Quantification, pp. 214-218. In *Science Direct. Encyclopedia of Forensic Science*, 2nd Ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00039-8>
- [30] Verma P, *et al.* 2018. Direct Lysis Glass Milk Method of Genomic Dna Extraction Reveals Greater Archaeal Diversity in Anaerobic Biodigester Slurry As Assessed Through Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. [http://dx.doi.org/10.18006/2018.6\(2\).315.323](http://dx.doi.org/10.18006/2018.6(2).315.323)
- [31] Hoyos M, Tusso S, Bedoya T, Manrique Gaviria A, Bloor P. 2017. A simple and cost-effective method for obtaining DNA from a wide range of animal wildlife samples. *Conservation Genetics Resources*. <https://doi.org/10.1007/s12686-017-0735-z>
- [32] Katevatis C, Fan A, Klapperich C. 2017. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176848>
- [33] Wang W, Wang Y, Wang D. 2008. Dual effects of Tween 80 on protein stability. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.06.042>
- [34] Green M, Sambrook J. 2017. Precipitation of DNA with isopropanol. *Cold Spring Harbor Protocols*. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093385>

- [35] Oda Y, *et al.* 2016. Highly Concentrated Ethanol Solutions: Good Solvents for DNA as Revealed by Single-Molecule Observation. *ChemPhysChem*. <https://doi.org/10.1002/cphc.201500988>
- [36] Dinis T, Sousa F, Freire M. 2020. Insights on the DNA Stability in Aqueous Solutions of Ionic Liquids. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.547857>
- [37] Gontang E, Fenical W, Jensen P. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02811-06>
- [38] Menezes J, Lupatini M, Antonioli Z, Blume E, Junges E, Manzoni C. 2010. Variabilidade genética na região its do rDNA de isolados de trichoderma spp. (Biocontrolador) e Fusarium oxysporum f. sp. Chrysanthemi. *Ciência e Agrotecnologia*. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000100017>
- [39] Shamsi M, Imam S, Dada R. 2011. Sperm DNA integrity assays: Diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9631-8>
- [40] Kawamura K. 1999. Measurement of the rate of RNA hydrolysis in aqueous solution at elevated temperatures using a new monitoring method for hydrothermal reactions. *Nucleic acids symposium series*. <https://doi.org/10.1093/nass/42.1.289>
- [41] Loparev V, Cartas M, Monken C, Velpandi A, Srinivasan A. 1991. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agentes. *J Virol Methods*. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(91\)90126-k](https://doi.org/10.1016/0166-0934(91)90126-k)

- [42] Scorsato A, Telles J. 2011. Factors that affect the quality of DNA extracted from biological samples stored in paraffin blocks. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000500008>
- [43] Earl C, Smith M, Lease R, Bundy B. 2018. Polyvinylsulfonic acid: A low-cost rnase inhibitor for enhanced RNA preservation and cell-free protein translation. *Bioengineered*. <https://dx.doi.org/10.1080%2F21655979.2017.1313648>
- [44] Lemire K, Rodriguez Y, McIntosh M. 2016. Alkaline hydrolysis to remove potentially infectious viral RNA contaminants from DNA. *Virology Journal*. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0552-0>
- [45] Bernhardt H, Tate W. 2012. Primordial soup or vinaigrette: Did the RNA world evolve at acidic pH?. *Biology Direct*. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-4>
- [46] Ren X, Yu D, Yu L, Gao G, Han S, Feng Y. 2007. A new study of cell disruption to release recombinant thermostable enzyme from Escherichia coli by thermolysis. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.038>
- [47] Peach M, Marsh N, Miskiewicz E, MacPhee D. 2015. Solubilization of proteins: The importance of lysis buffer choice. *Western Blotting: Methods and Protocols*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_8
- [48] Ma J, *et al.* 2020. The Effect of Residual Triton X-100 on Structural Stability and Infection Activity of Adenovirus Particles. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.08.013>
- [49] Ma F, Liu F, Xu W, Li L. 2018. Surfactant and Chaotropic Agent Assisted Sequential Extraction/On-Pellet Digestion (SCAD) for Enhanced Proteomics. *Journal of Proteome Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00197>

- [50] Dik D, *et al.* 2021. A synthetic 5,3-cross-link in the cell wall of rod-shaped Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2100137118>
- [51] Garcia-Rubio R, Oliveira H, Rivera J, Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>
- [52] Kumar M, Mugunthan M. 2018. Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. *Medical Journal Armed Forces India*. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.mjafi.2017.07.009>
- [53] Sedlackova T, Repiska G, Celec P, Szemes T, Minarik G. 2013. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biological Procedures Online*. <https://dx.doi.org/10.1186%2F1480-9222-15-5>

Figures and Supplemental material

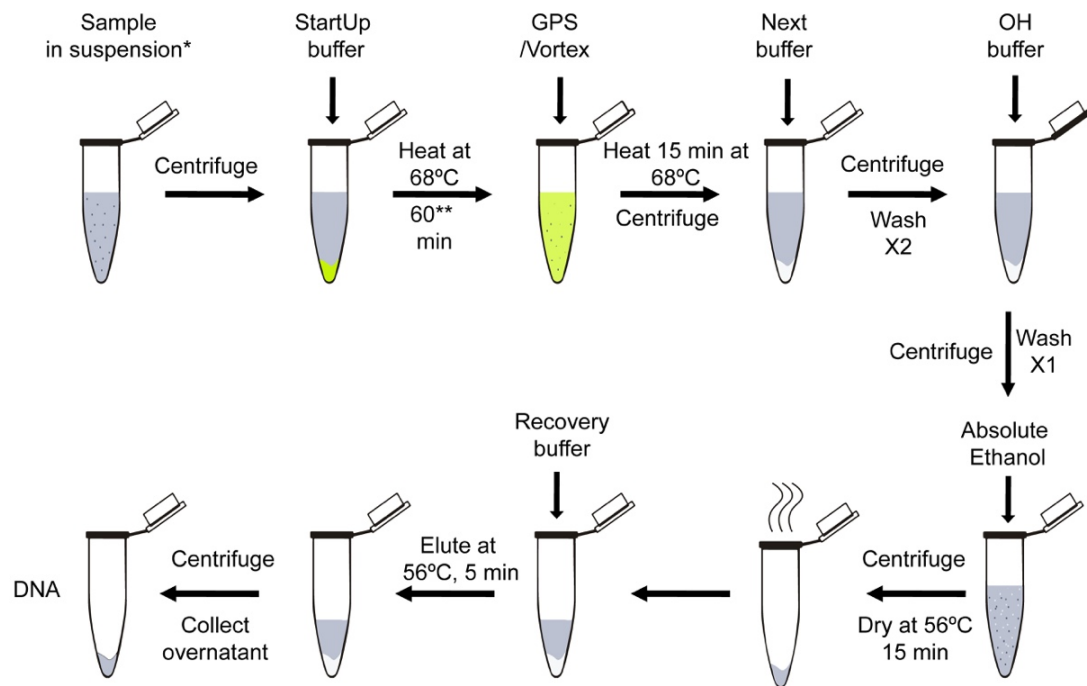


Figure 1. Diagram of the DNA extraction process. The figure represents our DNA extraction method design. It involves cell lysis, DNA extraction and purification, and DNA elution. High-quality DNA is a final product.

GPS: Glass powder solution

** Solid samples must be homogenized previously in 300μL of the Recovery buffer*

*** For bacterial samples, cell lysis between 30-60 min is recommended. In the case of fungal and fecal samples, 60-min is recommended*

Table 1. DNA extraction method standardization process: DNA yield and purity

NaI Molarity	Glass powder mg	DNA Yield ng/uL	Purity $A_{260/280}$
6 M ^{b,d,e}	20	84.65 ± 2.61	2.61 ± 0.01
	40	133.25 ± 2.53	2.53 ± 0.07
	60	165.35 ± 2.47	2.47 ± 0.07
	80	225.00 ± 2.33	2.33 ± 0.04
7 M ^{a,c}	20	68.70 ± 2.80	2.80 ± 0.15
	40	63.50 ± 2.81	2.81 ± 0.15
	60	68.25 ± 2.77	2.77 ± 0.11
	80	78.20 ± 2.88	2.88 ± 0.17
8 M ^{b,e}	20	124.75 ± 2.55	2.55 ± 0.37
	40	197.40 ± 2.55	2.55 ± 0.28
	60	90.10 ± 2.87	2.87 ± 0.16
	80	70.35 ± 2.54	2.54 ± 0.54
9 M ^{a,e}	20	70.20 ± 2.80	2.80 ± 0.25
	40	159.30 ± 2.53	2.53 ± 0.14
	60	113.70 ± 2.65	2.65 ± 0.45
	80	92.20 ± 2.72	2.72 ± 0.03
10 M ^{a,c,d}	20	58.80 ± 2.60	2.60 ± 0.49
	40	58.45 ± 2.36	2.36 ± 0.01
	60	68.70 ± 2.35	2.35 ± 0.01
	80	82.45 ± 2.66	2.66 ± 0.23

Lowercase letters indicate a significant difference between the different NaI Molar concentrations according to the DNA concentration obtained, Tukey test analysis for multiple comparisons, ($p < 0.05$).

Table 2. *Escherichia coli* DNA extracted at different pH conditions

Method	pH	DNA Yield	Purity
		ng/uL	A _{260/280}
M1 ^{b,c,B,C}	8.00 ^{b,c,B,C}	163.10 ± 0.42	2.21 ± 0.01
	9.00 ^{a,c,A,C}	137.65 ± 0.07	2.02 ± 0.01
	10.00 ^{a,b,A,B}	107.15 ± 1.48	1.97 ± 0.01
M2 ^{a,c,A,C}	8.00 ^{b,c,B,C}	166.90 ± 0.57	2.19 ± 0.01
	9.00 ^{a,c,A,C}	98.95 ± 2.33	2.08 ± 0.01
	10.00 ^{a,b,A,B}	131.25 ± 2.90	2.03 ± 0.01
M3 ^{a,b,A,B}	8.00 ^{b,c,B,C}	139.60 ± 0.71	2.00 ± 0.01
	9.00 ^{a,c,A,C}	148.45 ± 4.17	1.92 ± 0.01
	10.00 ^{a,b,A,B}	180.80 ± 0.57	1.96 ± 0.01

Lowercase letters indicate significant difference between the methods and pH employed respectively, according to the DNA concentration obtained, ($p < 0.05$). Capital letters indicate significant difference between the methods and pH employed respectively, according to the DNA purity, ($p < 0.05$). Tukey's test for multiple comparisons. M1: Novel method + Clear glass, M2: Novel method + Green glass, M3: Novel method + Amber glass.

Table 3. *Escherichia coli* DNA extracted at different temperature conditions

Method	Temperature °C	DNA Yield ng/uL	Purity A _{260/280}
M1 _{b,c,C}	56 _{b,c,d,B,C,D}	103.80 ± 0.28	2.21 ± 0.01
	61 _{a,dA,C,D}	140.40 ± 0.42	2.18 ± 0.01
	66 _{a,A,B,D}	161.00 ± 0.42	2.07 ± 0.03
	68 _{a,b,A,B,C}	163.70 ± 5.52	1.88 ± 0.03
M2 _{a,c,C}	56 _{b,c,d,B,C,D}	108.75 ± 0.64	2.08 ± 0.01
	61 _{a,dA,C,D}	179.20 ± 0.99	2.51 ± 0.01
	66 _{a,A,B,D}	159.80 ± 1.27	2.00 ± 0.01
	68 _{a,b,A,B,C}	164.90 ± 5.23	1.90 ± 0.02
M3 _{a,b,A,B}	56 _{b,c,d,B,C,D}	106.10 ± 2.83	2.90 ± 0.06
	61 _{a,dA,C,D}	156.40 ± 1.27	2.78 ± 0.02
	66 _{a,A,B,D}	164.90 ± 0.99	2.14 ± 0.01
	68 _{a,b,A,B,C}	167.80 ± 6.33	1.85 ± 0.05

Lowercase letters indicate a significant difference between the methods and temperature values employed respectively, according to the DNA concentration effect, ($p < 0.05$). Capital letters indicate a significant difference between the methods and temperature values employed respectively, according to the DNA purity, ($p < 0.05$). Tukey's test for multiple comparisons. M1: Novel method + Clear glass, M2: Novel method + Green glass, M3: Novel method + Amber glass.

Table 4. Yield and purity of the extracted DNA from diverse biological samples

Sample	M1		M2		M3		MC	
	DNA Yield	DNA purity	DNA Yield	DNA purity	DNA Yield	DNA purity	DNA Yield	DNA purity
	ng/uL	A _{260/280}	ng/uL	A _{260/280}	ng/uL	A _{260/280}	ng/uL	A _{260/280}
<i>B. cereus</i>	52.20 ± 0.85	2.02 ± 0.01	43.70 ± 0.28	2.01 ± 0.04	64.00 ± 0.28	1.90 ± 0.01	22.20 ± 0.14	4.52 ± 0.54
<i>E. casseliflavus</i>	57.90 ± 0.28	1.83 ± 0.01	30.40 ± 0.28	1.93 ± 0.04	55.60 ± 0.71	2.07 ± 0.02	15.30 ± 0.42	5.18 ± 0.51
<i>E. faecalis</i>	64.55 ± 0.07	2.03 ± 0.07	46.65 ± 0.35	1.90 ± 0.01	82.85 ± 0.07	2.02 ± 0.01	29.35 ± 0.21	5.83 ± 0.78
<i>S. epidermidis</i>	56.25 ± 0.35	2.09 ± 0.01	43.25 ± 2.05	1.94 ± 0.03	80.30 ± 0.14	1.88 ± 0.11	22.80 ± 6.36	3.78 ± 0.07
<i>E. coli</i>	101.10 ± 0.14	1.94 ± 0.06	55.00 ± 0.42	2.03 ± 0.02	67.75 ± 0.21	1.88 ± 0.06	59.85 ± 28.21	4.05 ± 0.88
<i>K. oxytoca</i>	187.40 ± 0.28	1.97 ± 0.02	126.60 ± 0.42	1.78 ± 0.04	143.05 ± 0.21	1.95 ± 0.08	89.00 ± 5.52	3.20 ± 0.05
<i>C. freundii</i>	245.00 ± 0.14	1.98 ± 0.04	224.45 ± 0.49	1.90 ± 0.02	140.05 ± 0.21	2.05 ± 0.02	99.85 ± 12.80	3.35 ± 0.27
<i>S. marcescens</i>	148.25 ± 0.21	2.05 ± 0.05	133.60 ± 0.42	1.79 ± 0.04	120.45 ± 0.49	1.85 ± 0.02	100.80 ± 6.36	3.23 ± 0.33
<i>P. citrinum</i>	8.40 ± 0.28	1.95 ± 0.05	9.50 ± 0.42	1.86 ± 0.06	10.15 ± 0.07	1.73 ± 0.02	19.40 ± 0.14	3.55 ± 0.07
<i>R. mucilaginosa</i>	7.80 ± 0.14	2.05 ± 0.06	9.05 ± 0.21	1.88 ± 0.04	9.95 ± 0.49	2.17 ± 0.02	27.80 ± 0.28	5.18 ± 0.03
<i>S. cerevisiae</i>	12.70 ± 2.40	1.65 ± 0.01	16.15 ± 3.04	1.85 ± 0.14	11.20 ± 0.14	2.08 ± 0.01	30.85 ± 5.30	2.36 ± 0.08
<i>E. phaeomuriformis</i>	12.90 ± 0.42	1.74 ± 0.02	13.10 ± 0.42	1.72 ± 0.00	15.35 ± 0.07	1.76 ± 0.03	27.00 ± 3.11	3.16 ± 0.21
Fecal male canine	100.90 ± 1.84	1.96 ± 0.02	242.60 ± 3.68	1.87 ± 0.03	329.55 ± 3.75	1.85 ± 0.01	61.40 ± 2.40	2.32 ± 0.01
Fecal female canine	76.85 ± 0.64	1.72 ± 0.00	52.80 ± 3.82	1.76 ± 0.01	58.40 ± 0.00	1.80 ± 0.01	72.50 ± 1.70	2.45 ± 0.01
Fecal male feline	40.25 ± 0.64	1.81 ± 0.05	67.85 ± 0.35	1.75 ± 0.01	45.00 ± 0.57	1.79 ± 0.01	58.90 ± 0.14	2.45 ± 0.01
Fecal female feline	72.85 ± 0.78	1.69 ± 0.02	40.75 ± 0.21	2.01 ± 0.01	45.70 ± 0.57	1.71 ± 0.01	44.85 ± 0.21	2.87 ± 0.06

The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation. M1: Novel method + Clear glass, M2: Novel method + Green glass, M3: Novel Method + Amber glass, MC: Commercial method

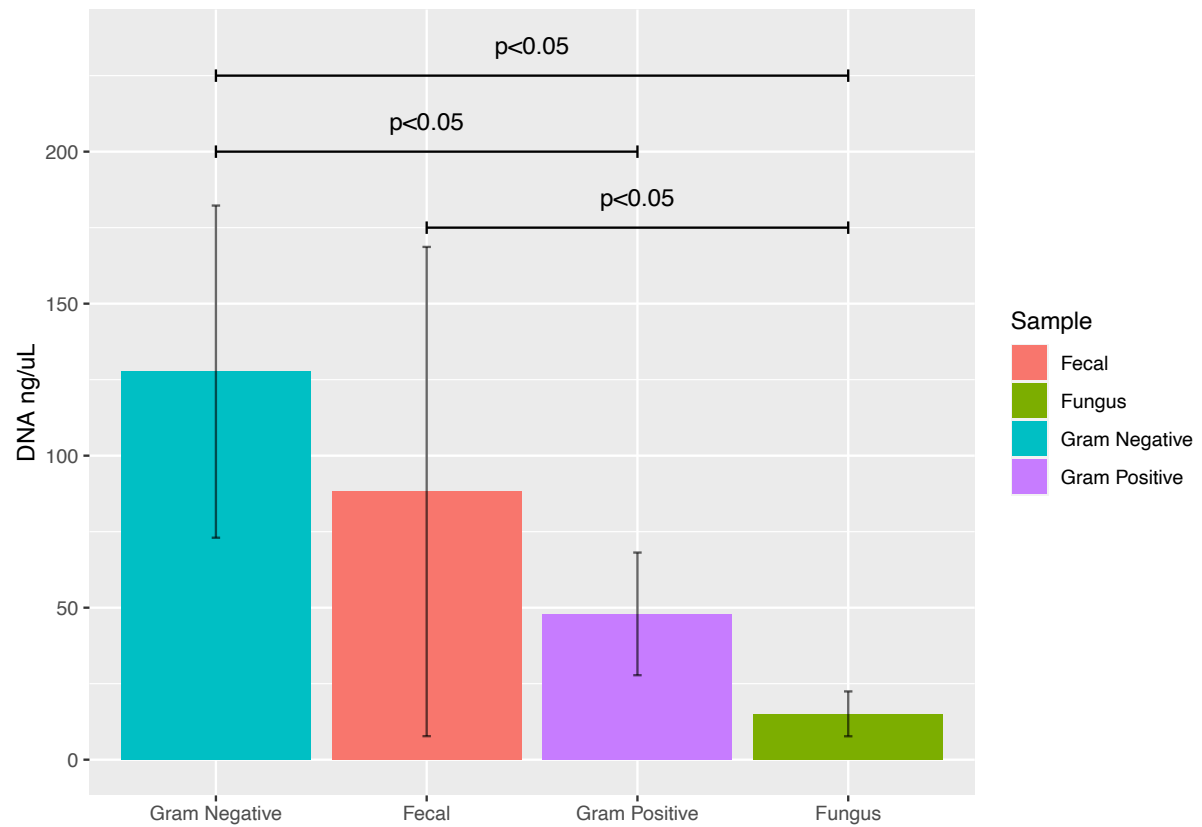


Figure 2. Variation of DNA concentration by each type of sample. Each bar represents the mean with the standard deviation of the DNA concentration obtained based on the biological source employed, and the lines exposed above represent a significant difference between the biological samples employed ($p < 0.05$). Tukey's test for multiple comparisons.

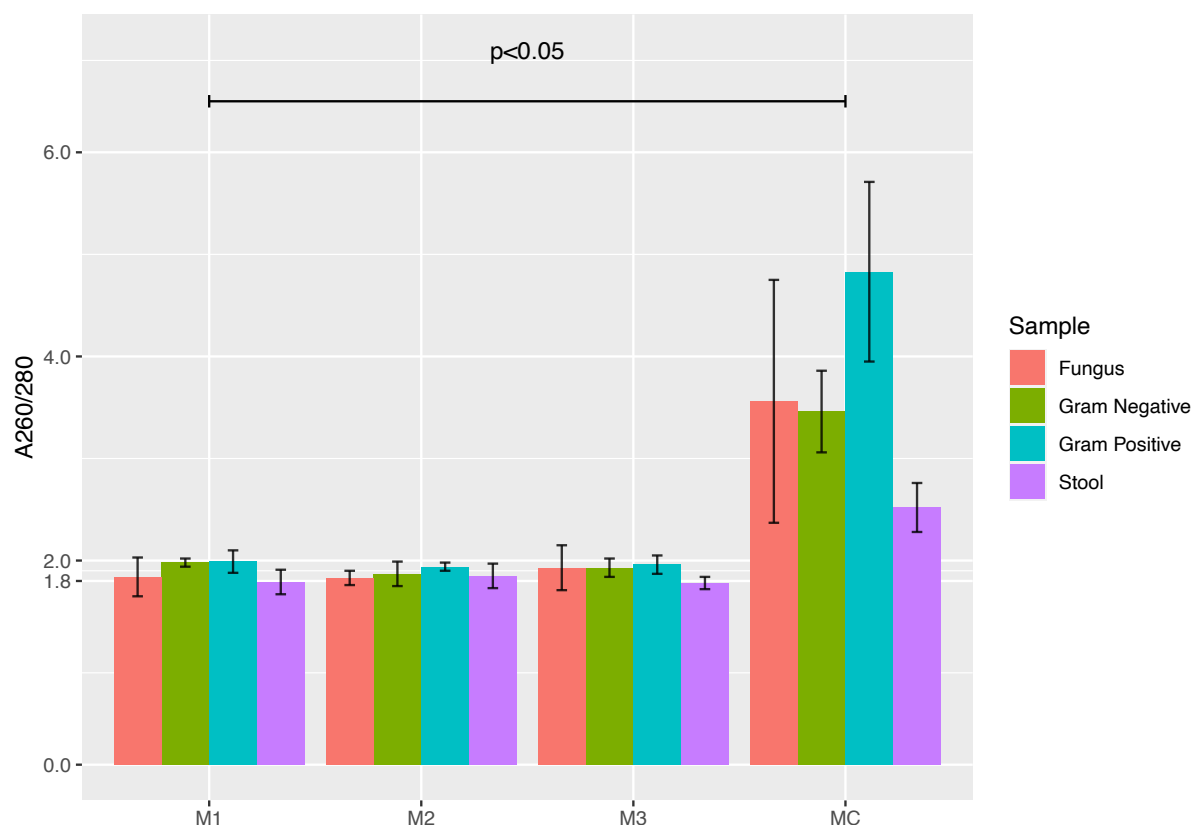


Figure 3. DNA purity comparison through the different DNA extraction methods. Each bar shows the mean with the standard deviation values of A260/280 achieved by each method through the different biological samples employed. ($p < 0.05$) significant difference. Tukey's test for multiple comparisons. M1: Novel method + Clear glass, M2: Novel method + Green glass, M3: Novel Method + Amber glass, MC: Commercial metho

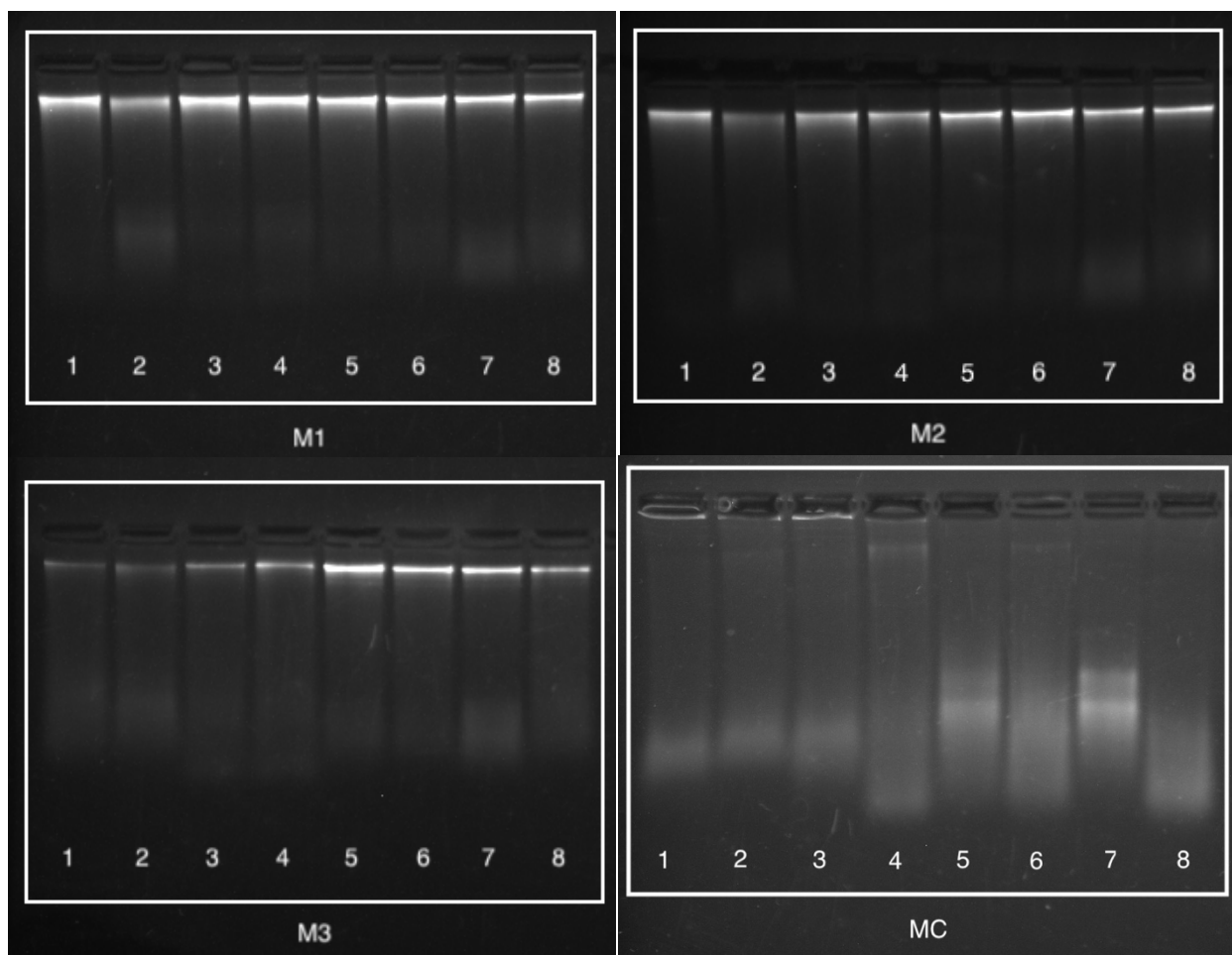
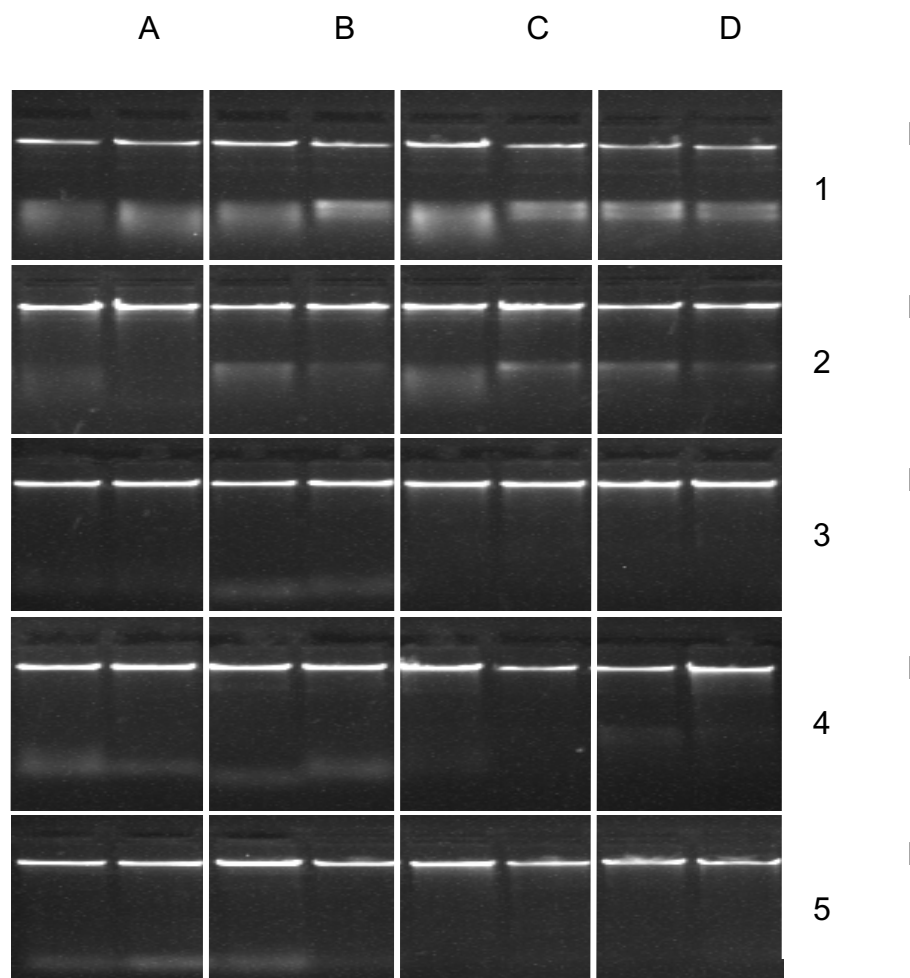


Figure 4. The integrity of the extracted DNA samples. The figure represents all methods employed for extracting DNA from bacterial liquid samples, it is visible that M1, M2, and M3 maintain the DNA integrity without fragmentation instead of the MC used as a control method in which DNA is fully degraded. M1: Novel method + Clear glass, M2: Novel method + Green glass, M3: Novel Method + Amber glass, MC: Commercial method. Lanes 1-4 represent Gram-positive extracted DNA: *B. cereus*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, and *S. epidermidis*, and lanes 5-8 represent Gram-negative extracted DNA: *E. coli*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, and *S. marcescens*.

Table 5. Downstream process: PCR amplification

Sample	M1		M2		M3	
	<i>16S</i>	<i>ITS</i>	<i>16S</i>	<i>ITS</i>	<i>16S</i>	<i>ITS</i>
Gram-positive	+	NA	+	NA	+	NA
Gram-negative	+	NA	+	NA	+	NA
Filamentous fungus	NA	+	NA	+	NA	+
Yeast	NA	+	NA	+	NA	+
Fecal	+	+	+	+	+	+

NA: Not apply, **+**: Positive.



Appendix 1. Assessment of the *E. coli* genomic DNA extracted in an agarose electrophoresis gel. The running performance was in 1% agarose gel in 1X TAE. Notice that as the concentration of NaI increases, the presence of RNA decreases. Columns A-D represent glass powder concentrations; A: 20 mg/100 μ L, B: 40 mg/100 μ L, C: 60 mg/100 μ L, D: 80 mg/100 μ L. Rows M1-M6 represent different Molarities of NaI; M1: 6M, M2: 7M, M3: 8M, M4: 9M, M5: 10M.

6 DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento de um método para extrair DNA de forma ecológica, segura e, acima de tudo, de alta qualidade foi um processo que envolveu muitos aspectos a serem considerados como força iônica, pH, temperatura e tipo de amostra biológica a ser utilizada. Diante deste fato e na comparação com diferentes condições de trabalho foi possível observar que as concentrações de DNA obtidas tiveram um rendimento de processo maior ou igual a um método comercial, garantindo assim sua viabilidade em futuras extrações. Por sua vez, a variável pureza do DNA foi significativamente maior em comparação ao método comercial, cuja avaliação foi por espectrofotometria. Uma terceira variável utilizada como controle de qualidade do DNA foi sua integridade por eletroforese em gel de agarose, o qual os DNAs extraídos pelo método proposto apresentou integridade completa e sem fragmentação, ao contrário do método comercial utilizado, pois sua integridade era altamente questionável, isso é devido a que os DNA extraídos estavam totalmente degradados no gel de agarose. Por fim, as amostras de DNA submetidas a processos de PCR conferiram-lhe uma importante aplicação, permitindo assim que o método proposto e suas futuras aplicações subsequentes tivessem viabilidade e fidelidade na sua execução.

Adicionalmente, certas modificações na composição das soluções utilizadas abrem a oportunidade de obter e extrair outras moléculas, como RNA e proteínas, respectivamente. Assim, a perspectiva desse método sugere que ele é uma alternativa promissora para extrair material genético e proteínas de alta qualidade. Além disso, deve-se mencionar que independente do tipo de vidro utilizado durante o estudo para gerar a lise e extração do DNA, seus resultados não foram significativamente diferentes provavelmente devido às composições químicas semelhantes desses materiais, o que sugere que o uso de qualquer um desses resultados será altamente confiável dentro das condições analisadas nesse trabalho.

Este método de extração de DNA foi desenvolvido sob a iniciativa da implantação da Química Verde, atendendo assim a requisitos como: *i*) a redução do consumo de energia por ter utilizado menos equipamentos para toda a execução; *ii*) redução de desperdícios, tanto em termos de geração de resíduos

como reaproveitamento de materiais; *iii*) redução da toxicidade visto que, o principal reagente do método foi baseado na utilização de uma alta concentração molar de iodeto de sódio, que segundo a ECHA não corresponde a um agente químico tóxico para saúde; *iv*) redução de riscos de contaminação ao meio ambiente; e *v*) redução de matéria-prima com a reutilização do vidro reciclado, que servia como fonte de sílica. Esses princípios garantem que a composição das soluções utilizadas para a extração de DNA proporcionem segurança na execução tanto para os operadores quanto para o meio ambiente em caso de possível exposição não intencional.

Por fim, os resultados obtidos no trabalho motivam pesquisas futuras para dar continuidade a essa linha de pesquisa e desenvolvimento

7 CONCLUSÕES

Concluimos com sucesso com o desenvolvimento de um método para extrair DNA usando uma substância caotrópica que empregou iodeto de sódio, e vidro reciclado de laboratório como fonte de sílica.

O método apresentou grande viabilidade de trabalho por ser adaptável a diversas amostras biológicas como: Gram positivas, Gram negativas, fungos filamentosos, fungos não filamentosos e fezes de animais.

A eficiência e integridade do método proposto apresentou resultados significativamente superiores comparado com o controle, porém o rendimento do método não foi estatisticamente diferente.

Os DNAs extraídos mostraram viabilidade de uso para processos subsequentes como PCR amplificando as regiões *16S rRNA* para Procariotos e *ITS* para Fungos.

Por fim, podemos concluir que o método proposto apresenta viabilidade econômica e técnica, confiabilidade e aplicabilidade de execução para extração de DNA de diferentes fontes biológicas de forma segura, ecológica e proporcionando extratos de alta qualidade.

8 REFERENCIAS

1. Barton PJR, Boheler KR, Brand NJ, Thomas PS. Basic Concepts in Molecular Biology. In Springer, Berlin, Heidelberg; 1995. p. 1–24.
2. Pane DN, Fikri M el, Ritonga HM. Biología molecular fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2018. 1689–1699.
3. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Michael L, Losick R. Biología Molecular do Gene James D. Watson (7ª ed).pdf. 2015. p. 916.
4. Chen XG, Fang YL, Godbey WT. Molecular biology techniques. Tissue Engineering: Principles and Practices. 2012;13-1-13–26.
5. Gonzales C, Luis J. Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético , a partir de uñas recortadas . 2003;0(4):230–3.
6. Lázaro-Silva DN, De Mattos JCP, Castro HC, Alves GG, Amorim LMF. The Use of DNA Extraction for Molecular Biology and Biotechnology Training: A Practical and Alternative Approach. Creative Education. 2015;06(08):762–72.
7. Guevara G. ADN: historia de un éxito científico. Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia. 2004;3(11):9–40.
8. CLARK J. DNA - structure [Internet]. 2007 [cited 2020 Oct 6]. Available from: <https://www.chemguide.co.uk/organicprops/aminoacids/dna1.html>
9. Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. Biopreservation and Biobanking. 2016;14(4):264–70.
10. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2009;2009.

11. Jacobsen N, Nielsen PS, Jeffares DC, Eriksen J, Ohlsson H, Arctander P, et al. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Nucleic acids research*. 2009;4(2):2440–3.
12. Chi, Myoung-Hwan; Park, Sook-Young; Lee Y-H. Salting.pdf. *The Plant Pathology Journal*. 2009.
13. Salimans M, Sol CJA. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. 1990;495–503.
14. Zulkharnain A, Sidek N, Husaini AAS. Evaluation of different methods for total {DNA} extraction from sago pith residue. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*. 2014;2(2):67–9.
15. Pinto A Di, Forte VT, Guastadisegni MC, Martino C, Schena FP, Tantillo G. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*. 2007;18(1):76–80.
16. Topçu AA, Arif Topçu A, Aşır S, Türkmen D. DNA Purification by Solid Phase Extraction (SPE) Methods Katı Faz Ayırma Yöntemiyle DNA Saflaştırılması Review Article. / *Hacettepe J Biol & Chem*. 2016;44(3):259–66.
17. Danilevich VN, Petrovskaya LE, Grishin E V. A highly efficient procedure for the extraction of soluble proteins from bacterial cells with mild chaotropic solutions. *Chemical Engineering and Technology*. 2008;31(6):904–10.
18. Fujimoto S, Nakagami Y, Kojima F. Optimal Bacterial DNA Isolation Method Using Bead-Beating Technique. *Of Medical Sch*. 2004;3(March):33–8.
19. Safi C, Ursu AV, Laroche C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY, et al. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*. 2014;3(1):61–5.
20. Barbosa C, Nogueira S, Gadanho M, Chaves S. DNA extraction: Finding the most suitable method. *Molecular Microbial Diagnostic Methods: Pathways to Implementation for the Food and Water Industries*. Elsevier Inc.; 2016. 135–154.

21. Capocelli M, Prisciandaro M, Lancia A, Musmarra D. Comparison between hydrodynamic and acoustic cavitation in microbial cell disruption. *Chemical Engineering Transactions*. 2014;38:13–8.
22. Taskova RM, Zorn H, Krings U, Bouws H, Berger RG. A comparison of cell wall disruption techniques for the isolation of intracellular metabolites from *Pleurotus* and *Lepista* sp. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. 2006;61(5–6):347–50.
23. Dowd CJ, Kelley B. Purification Process Design and the Influence of Product and Technology Platforms. In: *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition. Elsevier Inc.; 2011. p. 799–810.
24. Harrison STL. Cell Disruption. Second Edi. Vol. 2, *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition. Elsevier B.V.; 2011. 619–640.
25. Islam MS, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*. 2017;8(3).
26. Anand H, Balasundaram B, Pandit AB, Harrison STL. The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from *E. coli*. *Biochemical Engineering Journal*. 2007 Jul 15;35(2):166–73.
27. Mülhardt C, Beese EW. Fundamental Methods. In: *Molecular Biology and Genomics*. Elsevier; 2007. p. 11–36.
28. Chae PS, Rasmussen SGF, Rana RR, Gotfryd K, Chandra R, Goren MA, et al. Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nature Methods*. 2010 Dec;7(12):1003–8.
29. Johnson M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. *Materials and Methods*. 2013 Jan 18;3.
30. Parsi K. Interaction of detergent sclerosants with cell membranes. *Phlebology*. 2015;30(5):306–15.

31. Johnson M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. *Materials and Methods*. 2013 Jan 18;3.
32. Schechter D. Chemical Methods of Cell Disruption [Internet]. 2016 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <https://www.beei.com/blog/chemical-methods-of-cell-disruption>
33. Butler JM. DNA Extraction Methods. In: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*. Elsevier; 2012. p. 29–47.
34. McKiernan HE, Danielson PB. Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. In: *Molecular Diagnostics: Third Edition*. Elsevier Inc.; 2017. p. 371–94.
35. Mega NO, Revers LF. Developing a rapid, efficient and low cost method for rapid DNA extraction from arthropods. *Ciência Rural*. 2011;41(9):1563–70.
36. Salvi G, De Los Rios P, Vendruscolo M. Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 2005;61(3):492–9.
37. Casanova-Morales N, Alavi Z, Wilson CAM, Zocchi G. Identifying Chaotropic and Kosmotropic Agents by Nanorheology. *Journal of Physical Chemistry B*. 2018;122(14):3754–9.
38. Tapia ÓC. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. 2006;undefined-undefined.
39. Hosomi K, Ohno H, Murakami H, Natsume-Kitatani Y, Tanisawa K, Hirata S, et al. Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1–10.
40. Dhaliwal A. DNA Extraction and Purification. *Materials and Methods*. 2013 May 26;3.
41. Budelier K, Schorr J. Purification of DNA by Anion-Exchange Chromatography . *Current Protocols in Molecular Biology*. 1998 Apr;42(1).

42. Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: Preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*. 2012;7.
43. Yoshikawa H, Dogruman-AI F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human Blastocystis subtypes from fecal samples. *Parasitology Research*. 2011;109(4):1045–50.
44. Dederich DA, Okwuonu G, Garner T, Denn A, Sutton A, Escotto M, et al. Glass bead purification of plasmid template DNA for high throughput sequencing of mammalian genomes. *Nucleic acids research*. 2002;30(7):e32.
45. Issn S, Tammelleo AD, Walboomers JMM, Schegget J Ter, Grube M, Depriest PT, et al. Glass bead purification of plasmid template DNA for high throughput sequencing of mammalian genomes. *PLoS ONE*. 2015 Jan;10(2):1–10.

9 CURRÍCULO LATTES



Cesar David Guerra Naranjo

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4090263747683146>

ID Lattes: **4090263747683146**

Última atualização do currículo em 16/12/2021

Possui graduação em Bioquímica clínica pela Universidade Central do Equador (2017). Mestre em Biociências pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre no Brasil (2021). Área de atuação nas Biociências, focado na linha de pesquisa dos estudos funcionais e estruturais de moléculas com potencial biotecnológico. Tem experiência na área de Biotecnologia, com ênfase em Biologia molecular, Microbiologia e Controle de Qualidade de Bioprocessos. Pesquisador associado ao Instituto Nacional de Biodiversidade do Equador. Atualmente, é o CEO fundador da Empresa Clonallyx Corporation, uma StartUp equatoriana que se dedica tanto na fabricação de reagentes para o uso em técnicas de Biologia molecular quanto à formação de profissionais que trabalham nesta área. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Cesar David Guerra Naranjo 

Nome em citações bibliográficas

NARANJO, C. D. G.

Lattes ID

 <http://lattes.cnpq.br/4090263747683146>

Orcid ID

 <https://orcid.org/0000-0001-6651-9591>

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2019 - 2021

Mestrado em BIOCÊNCIAS (Conceito CAPES 4).

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Título: Desenvolvimento de um método para extrair DNA total de amostras biológicas empregando uma substância caotrópica e vidro reciclado como fonte de sílica, Ano de Obtenção: 2022.

Orientador:  Ana Paula Guedes Frazzon.

Coorientador: Tanira Alessandra Silveira Aguirre.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Palavras-chave: Extração de DNA; Substância Caotrópica; Análises genético; Sílica.

Grande área: Ciências Biológicas

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Biotecnologia.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.

Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico.

2012 - 2017

Graduação em BIOQUÍMICA CLÍNICA.

UNIVERSIDADE CENTRAL DO EQUADOR, UCE, Equador.

Título: Caracterización de la respuesta inmunológica in vivo e in vitro de pacientes con tuberculosis pulmonar activa y latente.

Orientador: Lourdes Alicia Pazmiño Ayala.

Formação Complementar

Atuação Profissional

Hospital Vozandes Quito, HVQ, Equador.

**Vínculo institucional
2018 - 2019**

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista de laboratório clínico, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Desempenhei funções nas área de: Amostragem, Bioquímica, Imunologia, Enzimologia, Sorologia, Coagulação, Hematologia, Microbiologia, Parasitologia, Uroanálise, e Controle de qualidade.

Instituto de Biomedicina Jacinto Convid, **IBJC, Venezuela.**

**Vínculo institucional
2017 - 2017**

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Pesquisador na área de Tuberculosis, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Desempenhei funções baseadas no diagnóstico clínico da tuberculose pulmonar e extrapulmonar por microbiologia, imunologia e biologia molecular

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biotecnologia.
3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.
4. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.
5. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Aplicada/Especialidade: Microbiologia Médica.
6. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biotecnologia / Subárea: Biotecnologia Industrial/Especialidade: Bioprocessos.

Idiomas

Espanhol	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Prêmios e títulos

2020	Destaque na categoria Mérito científico do Evento V Biosciences Meeting ? Crossing Borders, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
2016	Vencedor do III Concurso de Pôster Científicos, Universidade Central do Equador.
2016	Representante dos alunos para a Área da Vida perante o Honorável Conselho Universitário, Universidade Central do Equador.
2016	Presidente dos Alunos da Faculdade de Ciências Químicas, Universidade Central do Equador.

Produções
Produção bibliográfica
Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ Valencia Israel ; **NARANJO, C. D. G.** ; Echeverria Gustavo ; Rodriguez Richar ; Teran Rommy ; de Waard Jacobus . Elaboración y control de tiras de esporas (Spore Strips) caseras para monitorear procesos de esterilización. In: COLMIC 2016 (Latin American Congress of Microbiology and Food Hygiene, 2016, Medellín. XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos (COLMIC). Medellín: Journal Vitae, 2016. v. 23. p. 106-107.
2. ★ **NARANJO, C. D. G.**; Valencia Israel ; Echeverria Gustavo ; Rodriguez Richar ; Teran Rommy ; de Waard Jacobus . La elaboración de reactivos para la Biología Molecular; El aislamiento de Taq Polimerasa y la Leche de vidrio para purificación de ADN. In: COLMIC 2016 (Latin American Congress of Microbiology and Food Hygiene), 2016, Medellín. XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos (COLMIC). Medellín: Journal Vitae, 2016. v. 23. p. 156-157.

Produção técnica
Redes sociais, websites e blogs

1.

★ **NARANJO, C. D. G.**, Clonallyx Corporation. 2021; Tema: StartUp produtora de reagente para o uso em Biología Molecular. (Site).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. V Biosciences Meeting ? Crossing Borders.Desenvolvimento de um método de extração de DNA empregando vidro reciclado de laboratório e substâncias caotrópicas. 2020. (Encontro).
2. 2do Congreso Ecuatoriano de Farmacología de estudiantes universitarios. 2017. (Congreso).
3. Actualización en el diagnóstico de Tuberculosis Bovina y Paratuberculosis. 2016. (Outra).
4. Autoevaluación Institucional de la Universidad Central del Ecuador.Evaluador. 2016. (Outra).
5. III Concurso de Póster Científicos.La elaboración de reactivos para la Biología Molecular; el aislamiento de Taq polimerasa y la leche de vidrio para la purificación de ADN. 2016. (Outra).
6. XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. Elaboración y control de calidad de tiras de esporas (Spore strips) para el monitorear procesos de esterilización. 2016. (Congreso).
7. XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. La elaboración de reactivos para la Biología Molecular; el aislamiento de Taq polimerasa y la leche de vidrio para la purificación de ADN. 2016. (Congreso).
8. Seminario de Microbiología. 2015. (Seminário).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **NARANJO, C. D. G.**, II Encuentro Científico CIZ 2016. 2016. (Congreso).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 24/12/2021 às 10:41:21

Imprimir currículo