



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA



**JORGE LUCAS SILVA TAVARES**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO: ROTINAS E  
PRÁTICAS LABORATORIAIS, MICROBIOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR**

ARAGUAÍNA  
2014

**JORGE LUCAS SILVA TAVARES**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO: ROTINAS E PRÁTICAS LABORATORIAIS, MICROBIOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Relatório apresentado à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientadora/Supervisora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Minharro Barbosa

Araguaína  
2014

**JORGE LUCAS SILVA TAVARES**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO: ROTINAS E PRÁTICAS LABORATORIAIS, MICROBIOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Relatório apresentado à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientadora/Supervisora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sílvia Minharro Barbosa

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sílvia Minharro Barbosa  
(Doutora em Ciência Animal)  
Orientadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Francisca Elda Ferreira Dias  
(Doutora em Medicina Veterinária)

---

Raquel Martins de Oliveira  
(Mestranda em Ciência Animal Tropical)

"...Quero, arrancado das prisões carnisais,  
Viver na luz dos astros imortais,  
Abraçado com as estrelas..."

**Augusto dos Anjos**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em especial à minha companheira Karynne Pimenta, sem você nada disso teria sido possível.

A todos os professores e funcionários da Universidade Federal do Tocantins que foram parte do caminho trilhado, em especial à professora Sílvia Minharro Barbosa, que estendeu sua mão e me ajudou em tempos difíceis, a você, meus mais sinceros agradecimentos. A Cristiane Alves e Karina Almeida por me aturarem todos os dias no laboratório.

Aos amigos encontrados nesse caminho com quem compartilhei os percalços e as alegrias, vocês são parte importante do que me tornei.

## RESUMO

O estágio curricular supervisionado foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins (UFT), campus de Araguaína, durante o período de 21 de outubro de 2013 a 14 de fevereiro de 2014, sob orientação e supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Minharro Barbosa, perfazendo um total de 402 horas. Os trabalhos realizados durante o estágio foram desenvolvidos na área de Tecnologia de Produtos de Origem Animal, Microbiologia de Alimentos e em Biologia Molecular com ênfase em eletroforese em gel de agarose.

**Palavras chave:** DNA, eletroforese, microbiologia, biologia molecular.

## ABSTRACT

The supervised internship was performed at the Microbiology Food Laboratory from the Universidade Federal do Tocantins (UFT), Araguaína, during the period of 21 October 2013 to 14 February 2014, under the supervision and orientation of Prof.<sup>a</sup> Sílvia Minharro Barbosa, totaling of 402 hours. The undertaken activities performed in the internship were developed in Technology Products of Animal Origin, on Food Microbiology area and Molecular Biology, with emphasis in agarose gel electrophoresis.

**Keywords:** DNA, electrophoresis, microbiology, molecular biology.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>%</b>	Porcentagem
<b>®</b>	Marca registrada
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>µL</b>	Microlitro
<b>Cm</b>	Centímetros
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EPI</b>	Equipamentos de Proteção Individual
<b>EtBr</b>	Brometo de Etídio
<b>G</b>	Gramas
<b>H</b>	Horas
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>Km</b>	Quilômetros
<b>L</b>	Litros
<b>Min</b>	Minutos
<b>mA</b>	Micro Ampêres
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Pb</b>	Pares de Bases
<b>PCA</b>	Plate Count Agar
<b>PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>Prof<sup>a</sup></b>	Professora
<b>TAE</b>	Tris, Acetato, EDTA
<b>TBE</b>	Tris, Borato, EDTA
<b>TPOA</b>	Tecnologia de Produtos de Origem Animal
<b>UFT</b>	Universidade Federal do Tocantins
<b>UV</b>	Ultra Violeta
<b>V</b>	Volts

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Prédio das Secretárias Acadêmicas e Coordenação da EMVZ - Campus Araguaína, UFT, Araguaína, Tocantins, 2013.....	13
<b>Figura 2.</b>	Vista Parcial do Laboratório de Microbiologia de alimentos, Araguaína, Tocantins, 2013.....	13
<b>Figura 3.</b>	Cuba eletroforética para realização de eletroforese em gel de agarose (A), Solução de Brometo de Etídio usado para corar fragmentos de DNA em eletroforese de gel de agarose (B).....	16
<b>Figura 4.</b>	Gel de Agarose liquefeito em processo de solidificação com pentes inseridos (A), <i>Loading Buffer</i> utilizado para coloração dos fragmentos de DNA para acompanhamento da corrida no gel de agarose (B).....	17
<b>Figura 5.</b>	Adição de produto final da PCR.....	18
<b>Figura 6.</b>	Aplicação do produto da PCR nos poços de gel de agarose 1%.....	18
<b>Figura 7.</b>	Gel no início da corrida (A), Gel ao término da corrida (B). Observar migração da amostra através do gel (setas).....	19
<b>Figura 8.</b>	Amostra 1-4 contendo marcador genético da calpaína (CADN1316) associado à maciez da carne, 5 controle negativo	20
<b>Figura 9.</b>	M - marcador BioLabs®, 1 a 13 são amostras testadas, sendo 4, 8 e 12 positivas para DNA de <i>Leishmania</i> , 14 é o controle positivo, e 15 o controle negativo. .....	20

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Concentração de agarose sugerida para separação de diferentes tamanhos de moléculas de DNA lineares (LEWIS, 2011).....	23
---	----

**LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo 1.</b>	Protocolo utilizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos para preparo de <i>Loading Dye</i> .....	29
<b>Anexo 2.</b>	Protocolo utilizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos para preparo de marcador <i>ladder</i> (BioLabs®).....	30
<b>Anexo 3.</b>	Protocolo utilizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos para preparo de TBE (Tris/Borato/EDTA) <i>Buffer 10x</i> .....	31

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1.CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	12
<b>2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....</b>	<b>14</b>
2.1. ORGANIZAÇÃO DO LABORATÓRIO.....	14
2.2. ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS POR MEIO DE AUTOCLAVE.....	14
2.3. PREPARO DE MEIOS DE CULTURA.....	15
2.4. AUXÍLIO NA DISCIPLINA DE PRÁTICAS LABORATORIAIS.....	15
2.5. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	16
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA: ELETROFORESE EM GEL DE     AGAROSE.....</b>	<b>21</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>26</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>27</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A Medicina Veterinária se caracteriza pelo amplo leque com opções de formação do profissional, levando-o a se perguntar qual área realmente seguir. É neste momento de dúvida que o acadêmico deve procurar explorar as várias áreas existentes, tornando o estágio a ferramenta de maior ajuda ao futuro profissional.

As rotinas e práticas laboratoriais se apresentam geralmente como uma opção para quem quer seguir carreira na docência, ou como pesquisador, mas acima de tudo, o laboratório representa o espírito de inovação existente na graduação, a janela pela qual se vislumbra o futuro, imbuindo o acadêmico de um espírito inovador, além de mesclar varias áreas da veterinária, ajudando a sanar as dúvidas sobre qual caminho seguir.

### 1.1. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio curricular supervisionado foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, localizado na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus de Araguaína, localizado na Rodovia BR 153, KM 112, Caixa Postal 112 s/n, Zona Rural, no município de Araguaína, estado do Tocantins (Figura 1). O presente relatório descreve as atividades realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Figura 2), no período de 21/10/2013 a 14/02/2014.

O laboratório conta com uma técnica em laboratório, estagiários, além dos alunos da disciplina optativa de Práticas Laboratoriais, ministrada pela professora Sílvia Minharro Barbosa, responsável pelo laboratório que ajudam com na rotina diária.

Dentre as tarefas executadas no laboratório se encontram a extração de DNA (ácido desoxirribonucléico), PCR (*polimerase chain reaction*), eletroforese, preparo de meios de culturas, análises microbiológicas, aulas práticas destinadas aos alunos que cursam as disciplinas de Tecnologia em Produtos de Origem Animal, Inspeção de Carnes e Práticas Laboratoriais, além de servir aos professores com projetos em andamento na universidade.



**Figura 1: Prédio das secretárias Acadêmicas e Coordenação da EMVZ - Campus Araguaína, UFT Araguaína, Tocantins, 2013.**  
**Fonte: Arquivo do autor.**



**Figura 2: Parte do laboratório de Microbiologia de Alimentos da EMVZ, Araguaína, Tocantins, 2013.**  
**Fonte: Arquivo do autor.**

## 2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

A rotina do estagiário com duração de seis horas corridas iniciava-se às 8:00 h (horas) da manhã, e terminava às 14:00 h da tarde, apesar de a rotina do laboratório se estender até as 18:00 h da tarde. Durante o estágio a rotina do estagiário era cuidar da organização e limpeza do laboratório, preparo de meios de cultura, esterilização de materiais por meio da autoclave, realizar eletroforese, bem como orientar os alunos da cadeira de Práticas Laboratoriais na realização das tarefas referentes à disciplina, e auxiliar a mestranda Raquel Martins de Oliveira nas atividades relacionadas ao seu mestrado. O uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI) é obrigatório, além da correta aplicação das normas de biossegurança para proteção do estagiário e de todo o ambiente de estudo e pesquisa.

### 2.1. ORGANIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

Ao iniciar a rotina, o estagiário tinha como deveres a limpeza de todas as bancadas com álcool 70%, verificar o perfeito funcionamento de todos os equipamentos do laboratório, conferir a geladeira contendo os meios de culturas estéreis, verificar o "freezer" de amostras, ligar a balança de precisão, proceder com a higienização de qualquer material que estivesse sujo na pia, lavando-os com detergente neutro e água sanitária, enxaguá-los, embalá-los com papel madeira, fechar os tubos com suas tampas, algodão, ou bonecas, colocar na autoclave, e depois de autoclavados, guardar em local apropriado.

### 2.2. ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS POR MEIO DE AUTOCLAVE

O procedimento para a esterilização do material consistia em conferir o nível da água e observar se a resistência estava imersa, colocar o material a ser autoclavado, ligar a autoclave na temperatura máxima, abrir a válvula de escape de vapor e esperar pingar água da válvula. Após a água começar a pingar, deve-se fechar a válvula, esperar atingir a temperatura de 121°C (Celsius), diminuir a temperatura para o nível médio e esperar 15 minutos (Min) para material limpo, e 30 Min para material sujo. Desligar a autoclave, esperar

o nível de pressão baixar e promover com segurança a retirada do material autoclavado de dentro da autoclave.

### 2.3. PREPARO DE MEIOS DE CULTURAS

O preparo de meio de cultura para uso em projetos e aulas práticas era tarefa recorrente na rotina do laboratório, e cada meio de cultura era preparado de acordo com suas particularidades, e sempre seguindo as instruções do fabricante.

Primeiro o reagente era pesado utilizando uma balança de precisão seguindo as instruções da embalagem, ou adaptado de acordo as necessidades do laboratório. Procedia-se a mistura do reagente à água destilada em vasilhame apropriado (balão volumétrico, erlenmeyer, béquer), e dependendo da forma de uso era colocado na autoclave para esterilização em tubos pequenos ou grandes, por exemplo, o *Plate Count Agar* (PCA, HiMedia, China), ou eram mantidos no vasilhame para serem distribuídos posteriormente em placas de Petri, como exemplo, o ágar McConkey (HiMedia, China).

### 2.4. AUXÍLIO NA DISCIPLINA DE PRÁTICAS LABORATORIAIS

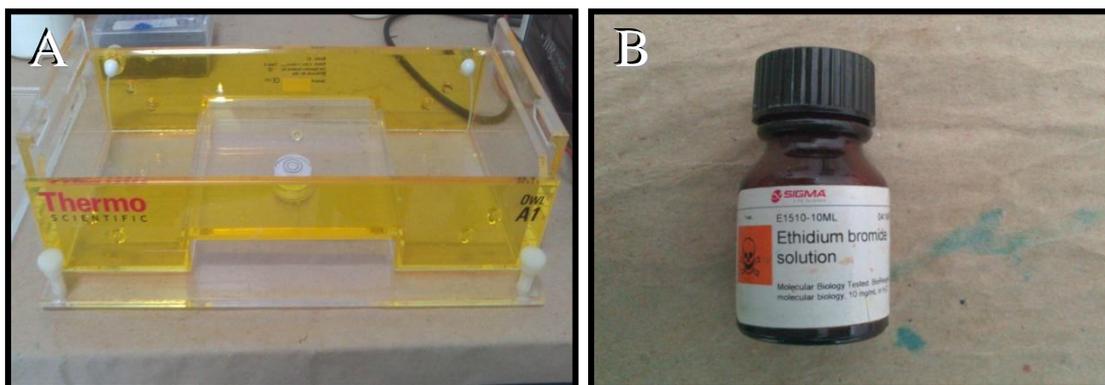
Com o intuito de aproximar mais os alunos do curso de Medicina Veterinária da rotina laboratorial, foi ofertada pela Prof<sup>a</sup>. Sílvia Minharro Barbosa a disciplina Práticas Laboratoriais, os alunos eram designados para permanecerem nas dependências do laboratório por um período predeterminado, e auxiliar nas atividades diárias, levando-os a conhecer melhor o dia a dia de um laboratório, e talvez despertar o interesse para a área.

Era tarefa dos estagiários do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e da técnica responsável, junto a Prof<sup>a</sup>. Sílvia Minharro, orientar os alunos, ensinando-os o preparo de meios de cultura, organização e limpeza do laboratório, acompanhamento das pesquisas desenvolvidas no laboratório na área de biologia molecular por meio do acompanhamento da extração de DNA, PCR, e eletroforese, além de auxiliarem outros departamentos, como o Laboratório de TPOA e Laboratório de Nutrição.

## 2.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

No estágio curricular realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, o protocolo utilizado para realização de eletroforese em gel de agarose ocorria da seguinte maneira: em uma balança de precisão pesava-se o gel de agarose ultra puro Agargen®. Pesava-se 1 grama (g) de gel preparado com 100 mL de *buffer* (concentração de 1%), para um pente de amostras correr, e 2 g para um gel preparado com 200 mL de *buffer* (concentração de 1%), que suporta até três pentes para amostras.

Esses valores levam em consideração o uso de uma cuba de eletroforese Thermo Scientific, modelo OWL A1®, com volume para *buffer* de 1,6 L (litros), e capacidade de correr de 8 a 96 amostras no gel (Figura 3-A). Em seguida o reagente pesado é misturado ao *buffer* de uso próprio para preparo de gel de agarose.

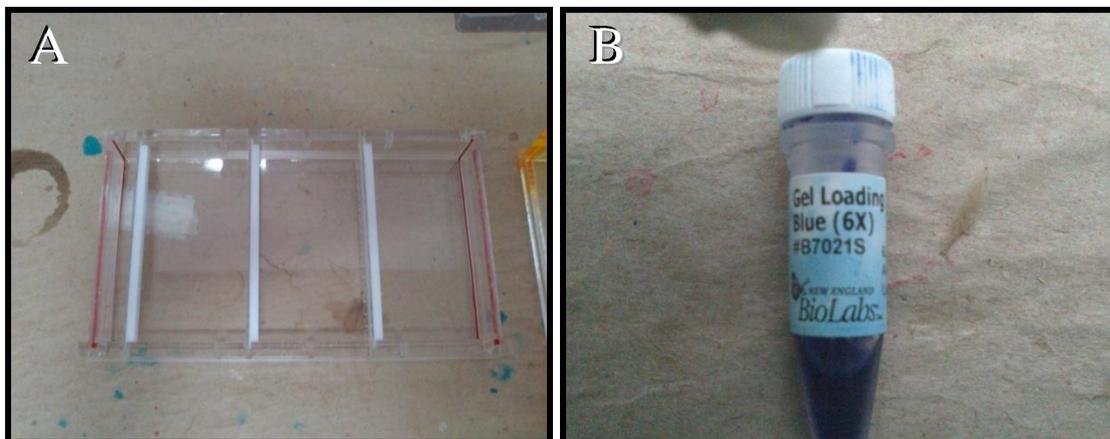


**Figura 3: Cuba eletroforética para realização de eletroforese em gel de agarose (A), Solução de Brometo de Etídio usado para corar fragmentos de DNA em eletroforese de gel de agarose (B).**

**Fonte: Arquivo do Autor.**

Após a pesagem, o gel era misturado ao TBE 1x em um béquer ou erlenmeyer e levado ao aparelho microondas por um período de tempo de 2 Min para um gel de 100 mL, e 4 m para um gel de 200 mL. Após total dissolução do reagente de agarose, procedia-se com o esfriamento da solução preparada até uma temperatura suportável em contato com a pele nua, para em seguida pipetar 2,5 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de EtBr Sigma® (Figura 3-B), para um gel de 100 mL, e 5  $\mu\text{L}$  de EtBr para um gel de 200 mL. Com a solução a uma temperatura menor que 60 °C para evitar danos à bandeja despeja-se o volume

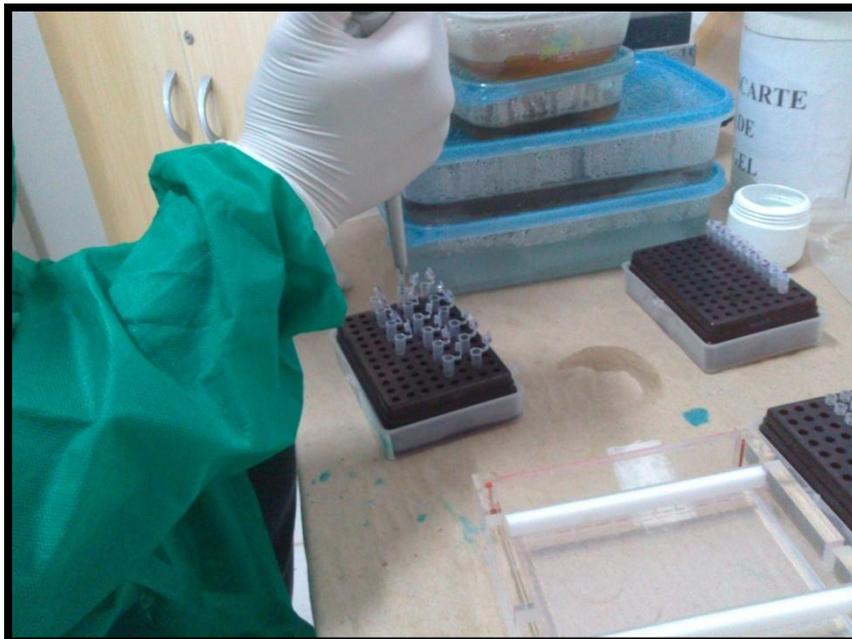
na mesma, tomando cuidado para não formar bolhas. Depois os pentes formadores dos “poços” são acoplados na solução ainda liquefeita (Figura 4-A). Após o acoplamento dos pentes, o gel irá se solidificar em um intervalo de tempo de 10 a 15 minutos.



**Figura 4:** Gel de Agarose liquefeito em processo de solidificação com pentes inseridos (A), *Loading Buffer* utilizado para coloração dos fragmentos de DNA para acompanhamento da corrida no gel de agarose (B).  
Fonte: Arquivo do Autor.

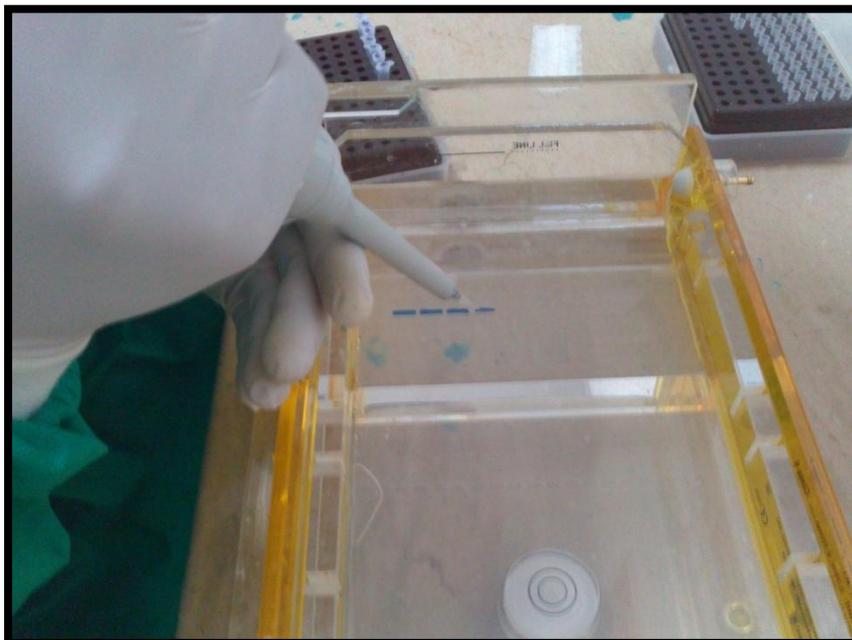
Enquanto o gel solidificava, o tampão da amostra (*loading buffer*), (Figura 4-B) era adicionado à amostra (Figura 5). O volume de *loading buffer* adicionado era correspondente a 1/5 do volume final resultante do processo de PCR.

Após o gel solidificar, a bandeja era colocada na cuba de eletroforese, que é então preenchida com o TBE 1x de corrida em volume suficiente para submergir o gel. Os pentes eram então retirados, e com uma micropipeta eram adicionados de 10 a 15  $\mu\text{L}$  de amostra em cada poço (Figura 6), com cuidado para não furar o gel com a ponteira, e não deixar ocorrer regurgitação de conteúdo. É recomendada a adição da amostra em volume igual 75% da capacidade do pente utilizado (SMITH, 1993).



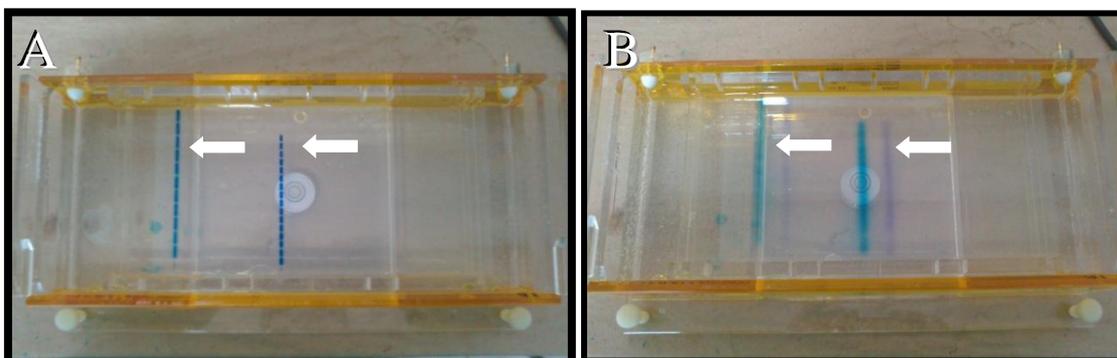
**Figura 5: Adição de produto final da PCR.**  
Fonte: Arquivo do autor

Finalizado o procedimento de pipetar as amostras no gel, a cuba era fechada, de forma que os eletrodos ficassem bem conectados, e a cuba era ligada a uma fonte de energia. A voltagem utilizada era de 130 V (volts). A corrente era de 700 micro âmpères (mA), e o tempo de corrida de 90 minutos.



**Figura 6: Aplicação do produto da PCR nos poços de gel de agarose 1%.**  
Fonte: Arquivo do Autor

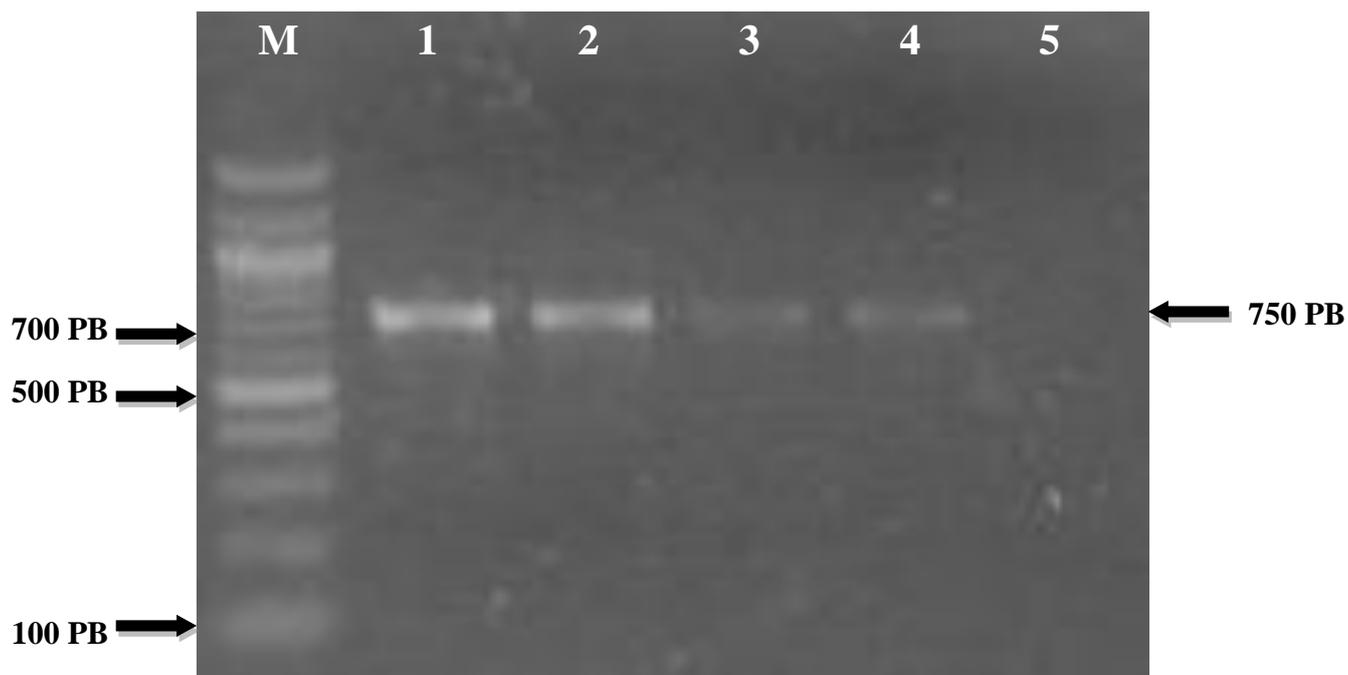
Após o término da corrida (Figura 7), o gel era retirado da cuba e colocado no transluminador para visualização e interpretação do resultado. O resultado é obtido pela distância de migração que a amostra percorreu no gel, utilizando-se os marcadores *ladders*, e as amostras controle como comparação. Como os *ladders* são aglomerados de DNA de variados tamanhos, que sofrem o mesmo efeito de separação devido à presença dos grupos de fosfato com carga negativa presentes em todas as moléculas de DNA, eles também irão correr no gel e corar em presença de luz UV devido a presença do BrEt. O marcador padrão 1 kb é o mais utilizado, evidenciando bandas de 100 a 12.000 pb.



**Figura 7:** Gel no início da corrida (A), Gel ao término da corrida (B). Observar migração da amostra através do gel (setas).

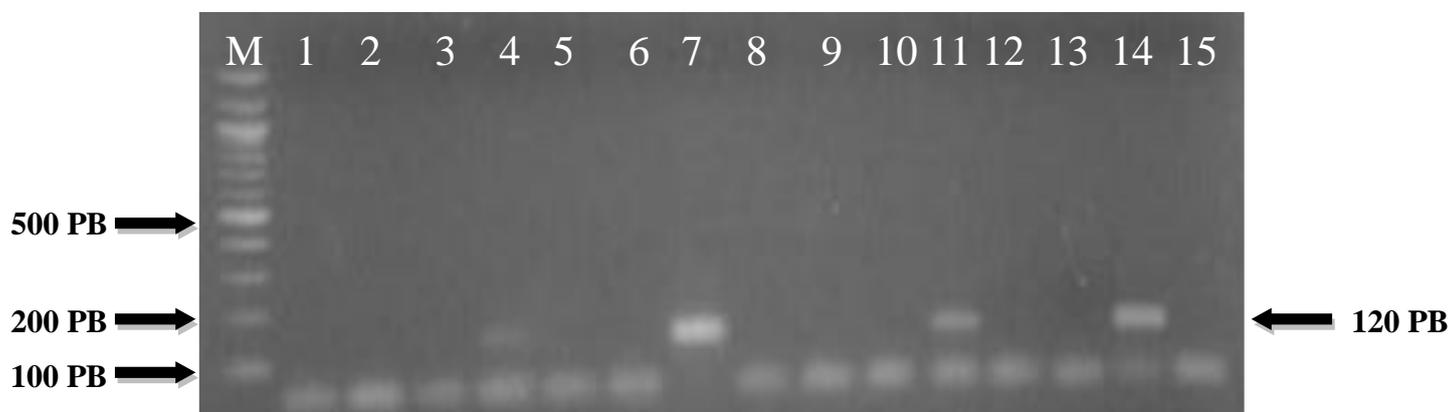
Fonte: Arquivo do Autor.

No gel, o DNA corado pelo EtBr apresentava fluorescência à luz UV. Comparando a localização da banda da amostra que correu o gel, com o marcador, é possível determinar o tamanho da molécula de DNA que migrou, assim obtendo o resultado desejado. Como no Laboratório de Microbiologia de Alimentos a eletroforese é utilizada principalmente para fins de diagnóstico, um controle positivo e um negativo eram sempre colocados para correr junto às amostras, tornando mais fácil a interpretação do resultado. Assim, a banda de DNA analisada que ficasse na mesma altura que o controle positivo iria indicar a presença do DNA procurado (Figura 8).



**Figura 8:** Amostra 1-4 contendo marcador genético da calpaína (CADN1316) associado à maciez da carne, 5 controle negativo.

Fonte: Laboratório de Microbiologia de Alimentos



**Figura 9:** M - marcador BioLabs®, 1 a 13 são amostras testadas, sendo 4, 8 e 12 positivas para DNA de *Leishmania*, 14 é o controle positivo, e 15 o controle negativo.

Fonte: Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Eletroforese é definida como sendo a migração de espécies carregadas eletricamente, que ocorre quando as mesmas são dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através do qual uma corrente é aplicada (HEIGER, 1997).

Para realizar este método, uma amostra é aplicada em um recipiente ou suporte contendo um meio líquido transmissor e carreador de íons (*buffer*). Quando um campo elétrico é aplicado nesse sistema, os íons que estão no *buffer* de corrida irão fluir de um eletrodo para o outro e prover a corrente necessária para manter a voltagem aplicada (HEIGER, 1997). Ao mesmo tempo, íons positivamente carregados da amostra irão se mover em direção ao eletrodo negativo (cátodo), enquanto íons carregados negativamente irão se mover em direção ao eletrodo positivo (ânodo) (ANDERSON; TETRAULT, 1995). O resultado é a separação desses íons baseado na sua carga e tamanho. Visto que muitos compostos biológicos têm cargas ou grupos ionizáveis (DNA e proteínas), a eletroforese é frequentemente utilizada em pesquisas bioquímicas e médicas (ANDERSON; TETRAULT, 1995).

Existem muitas formas na qual a eletroforese pode ser usada para análises químicas, incluindo o sequenciamento de DNA, purificação de proteínas, peptídeos, e outras biomoléculas (MCPHERSON, 1999). Na patologia Clínica, eletroforese é uma importante ferramenta para examinar os padrões de aminoácidos, proteínas séricas, enzimas, e lipoproteínas do corpo (MCPHERSON, 1999).

A eletroforese também é utilizada na análise de comidas orgânicas e inorgânicas, produtos comerciais, e amostras ambientais (MCPHERSON, 1999). Em adição, a eletroforese é um componente essencial nas pesquisas farmacêuticas e médicas para a caracterização de proteínas em células normais e doentes, e para procurar novas substâncias (MCPHERSON, 1999).

Um dos métodos mais comuns de eletroforese é o método de eletroforese em gel. Esta técnica é um método eletroforético obtido pela aplicação de uma amostra em um gel de suporte que é colocado em um campo elétrico (GIDDINGS, 1991). O gel age como uma “peneira” molecular, ajudando na separação das moléculas baseados no seu tamanho (DOLNIK V, 1997). O tipo de gel utilizado depende do tipo de moléculas a serem separadas e da

base desejada para separação: carga, peso molecular ou ambos (DOLNIK V, 1997).

A eletroforese em gel é uma ferramenta útil para visualizar moléculas de DNA e determinar seu tamanho. As moléculas lineares de DNA são separadas de acordo com seu tamanho quando submetidas a um campo elétrico, através de uma matriz de gel, um material poroso e inerte, semelhante a uma gelatina (WATSON et al., 2006). As moléculas de DNA são carregadas negativamente (cada nucleotídeo tem um fosfato carregado negativamente atrelado a ele), o que acarretará o movimento do DNA em direção ao eletrodo positivo.

Grandes moléculas de DNA irão se mover mais lentamente através do gel, enquanto moléculas menores irão se mover mais rapidamente (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O movimento das moléculas de DNA cessa antes que elas saiam do gel. O resultado é uma série de bandas aonde a “distância de migração” caracteriza a extensão em que cada molécula de DNA interagiu com o campo elétrico.

O DNA primeiro deve ser isolado e amplificado para a realização da eletroforese. O isolamento é obtido a partir da extração do DNA presente em uma amostra. A extração consiste em basicamente quatro etapas: lise celular com a finalidade de expor o DNA, seguida da remoção dos lipídios da membrana celular com detergente, remoção das proteínas da membrana ao adicionar protease, e precipitação do DNA (CARVALHO et al., 2010).

A amplificação do DNA ocorre após seu isolamento utilizando-se uma técnica conhecida como PCR. A técnica de PCR é um método baseado na amplificação enzimática de um fragmento de DNA pela extensão de dois oligonucleotídeos (*primers* ou iniciadores), que hibridam com as fitas complementares de uma sequência-molde (alvo ou *template*) (CARVALHO et al., 2010). Através da adição do DNA alvo, dos iniciadores e da DNA-polimerase em diferentes ciclos de temperatura, ocorrerá amplificação exponencial dessa amostra, fornecendo volume de amostra suficiente para a realização da eletroforese em gel.

O gel de agarose é largamente empregado para estimar o tamanho de fragmentos de DNA. A agarose é um polímero de alto custo extraído de algas marinhas, composto de uma unidade repetida de dissacarídeo chamada agarabiose, que consiste de galactose e 3,6-anidrogactose (BRODY; KERNY,

2004). O gel de agarose é recomendado para amostras entre 200 pares de bases (pb), a 30 kilobases (kb), sendo 1 kb equivalente a mil pares de base.

No gel, a distância percorrida entre as bandas de DNA é determinada pela concentração da agarose (YILMAZ; OZIC; GOK, 2012). Quanto maior a concentração do gel, menor será a velocidade de migração, e quanto menor a concentração, maior a velocidade de migração. A maioria dos géis são preparados com uma concentração de agarose variando entre 0.7% (boa separação ou resolução de grandes fragmentos de DNA entre 5-10 kb), a 2% (boa resolução para pequenos fragmentos entre 0,2-1 kb).

Tabela 1: Concentração de agarose sugerida para separação de diferentes tamanhos de moléculas de DNA lineares (LEWIS, 2011).

Concentração de Agarose em gel (%)	Grau de Separação de Moléculas de DNA lineares (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Fonte: Lewis, 2011

Géis a 1% são uma concentração padrão. Para separar amostras de DNA com maior peso molecular deve-se diminuir a concentração, e para amostras de DNA com menor peso molecular, a concentração deve ser maior (STELLWAGEN, 1998).

Vários *buffers* de corrida são utilizados na eletroforese em gel de agarose. Os dois mais comuns usados na rotina para pesquisa de ácidos nucléicos são Tris/Acetato/EDTA (TAE) e Tris/Borato/EDTA (TBE). Os fragmentos de DNA migram em diferentes velocidades nestes dois *buffers* devido às diferenças na força iônica (YILMAZ; OZIC; GOK, 2012).

Estes dois *buffers* são utilizados porquê ambos tem um pH básico, o que dá ao grupo fosfato do DNA uma rede de carga negativa que permite a

migração do DNA em direção ao ânodo na câmara de eletroforese (BRODY; KERN, 2004).

Em geral, um bom buffer deve produzir pouco calor, ter uma longa vida, e uma boa condutividade (LODGE et al., 2007). Por exemplo, variações de uma concentração ótima do buffer (superconcentrado) podem produzir calor suficiente para derreter o gel (SHARP, et al., 1973; BOFFEY, 1984; HARRINGTON, 1993; LANE et al., 1992).

O TAE tem menor custo para se fazer, mas não é tão estável quanto o TBE, porém, em consideração, o TAE oferece melhor resolução de bandas de DNA em eletroforeses de separação curta em moléculas acima dos 2000 de peso molecular. O TBE é utilizado para gel de agarose em grandes moléculas de DNA, aonde a resolução não é tão importante (BARRIL; NATES, 2012).

A migração dos fragmentos no gel de agarose depende da diferença na corrente elétrica. Diferentes voltagens são requeridas para diferentes tamanhos de amostra. A melhor resolução para fragmentos maiores do que 2 kb podem ser obtidas aplicando não mais que 5 volts por cm do gel (SHARP et al., 1973; BOFFEY, 1984; HARRINGTON, 1993; LANE et al., 1992).

Para visualização do gel geralmente é utilizado o Brometo de Etídio (EtBr), uma solução intercalante de ácidos nucleicos (CARVALHO et al., 2010). A amostra corada com EtBr quando revelada a luz ultravioleta (UV) do transluminador, floresce, emitindo uma coloração vermelho-alaranjada. A exposição do DNA à luz UV deve ser feita rapidamente, porquê os ácidos nucleicos se degradam rapidamente a longas exposições, e a definição das bandas vai se deteriorando (SHARP et al., 1973).

Como o DNA é invisível, um loading *buffer* é adicionado em cada amostra, geralmente em uma proporção de 1/5 do volume final resultante da técnica do PCR. O loading *buffer* contém dois corantes: azul de bromofenol (uma pequena molécula corante que se comporta como um fragmento de DNA com mais ou menos 600 pb), e o xileno cianol (uma grande molécula corante que se comporta como um fragmento de DNA de mais ou menos 4 kb), e glicerol (CHAWLA, 2004).

Outras substâncias menos tóxicas podem ser utilizadas, com eficiente sensibilidade, porém mais caras. O loading *buffer* forma linhas enquanto o DNA se move, dando uma ideia da distância que o DNA percorreu. Também serve

para aumentar a densidade das moléculas, ajudando a descerem para o fundo do poço na hora da pipetagem, e as impedem de saírem dos poços (CHAWLA, 2004).

A distância que as amostras percorreram a partir do ponto de aplicação é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel. Esses fragmentos são os *ladders* (marcadores de peso molecular), misturas de segmentos de DNA de tamanhos variáveis que são aplicados em um poço no início do processo (BARRIL; NATES, 2012).

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estágio curricular supervisionado realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins adicionou excelente conhecimento teórico e prático à formação do acadêmico, pois oferece uma estrutura sólida de assimilação da prática laboratorial, aliada a uma excelente oferta de aprendizado teórico.

O estagiário teve a oportunidade de aprofundar os conhecimentos na esfera de biologia molecular, obtendo íntimo contato com uma área tão promissora e importante para esse novo tempo em que vivemos.

O conhecimento obtido é de grande importância, visto que não vai somente servir como base para os fundamentos de uma carreira, mas sim para guiar o futuro profissional em medicina veterinária nos caminhos que irá trilhar.

O estágio não adicionou somente conhecimento teórico e prático à formação do acadêmico. Contribuiu para o crescimento pessoal e profissional, fornecendo um excelente ambiente de aprendizado e experiências de vida.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON J. M. e TETRAULT G. A., “**Electrophoresis**”, In **Laboratory Instrumentation**, 4ª ed., Van Nostrand Reinhold, New York, Cap. 12, 1995

BARRIL P.; NATES S., **Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities, Gel Electrophoresis – Principles and Basics**, Editora Dr. Sameh Magdelin, 2012.

BOFFEY S. A., **Isolation of High Molecular Weight DNA**, in **Methods in Molecular Biology**, vol. 2: **Nucleic (Walker J M., ed.)**, Humana, Totowa, NJ, p. 333-341, 1984.

BRODY J. R. e KERN S. E., **History and Principles of Conductive Media for Standard DNA Electrophoresis**, *Analytical Biochemistry*, V. 333, N. 1, p. 1-13, 2004.

CARVALHO C. V.; RICCI G.; AFFONSO R., **Guia de Práticas em Biologia molecular**, São Caetano do sul, SP, Yendis Editora, p. 1, 35-42, 2010.

CHAWLA H S., **Basic Techniques. Introducing to Plant Biotechnology**, 2ª Edição, Science Publishers, Inc Enfield, NH, USA, 2004.

DOLNIK, V. Capillary Zone Electrophoresis, **Electrophoresis**, Vol. 18, Nº: 12-13, p. 2353-2361, 1997.

GIDDINGS, J. C. **Unified Separation Science**. Wiley. Cap. 8, 1991.

HARRINGTON R. E., Studies of DNA Bending and Flexibility using Gel-Electrophoresis, **Electrophoresis**. 14, p. 732-746, 1993.

HEIGER, D. N. **High Performance Capillary Electrophoresis**. Hewlett Packard Company. Publicação Número 12-5091-6199E, 1997.

LANE D., PRENTKI P., CHANDLER M., Use of Gel Retardation to Analyse Protein Nucleic Acid Interactions. **Microbiological Reviews**. 56, p. 509-528, 1992.

LEWIS M., **Agarose Gel Electrophoresis (basic method)**, Biological Protocols Retrieved, 2011.

LODGE J.; LUND P.; MINCHIN S., **Gene Cloning: Principles and applications**, 2007.

MCPHERSON R. A., **Proteínas Específicas**. In: **Henry J. B. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**, 18ª Ed., São Paulo: Manole, p 245-260, 1999.

SAMBROOK J. e RUSSEL D. W., **Molecular Cloning: A laboratory Manual**, 3ª Ed., Editora Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY, 2001.

SHARP P. A.; SUGDEN B.; SAMBROOK J., Detection of Two Restriction Endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis, **Biochemistry**, P. 3055-3063, 1973.

SMITH D. R., **Agarose Gel Electrophoresis. Methods in Molecular Biology: Transgenesis Techniques**, Editora D. Murphy e D. A. Carter, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1993.

STELLWAGEN N. C., **DNA Gel Electrophoresis. Nucleic Acid Electrophoresis Laboratory Manual**, Editora D Tietz, Spreinger Verlag, Berlin-Heidelber, New York, 1998.

WATSON J. D.; BAKER T. A.; BELL S. P.; GANN A.; LEVINE M.; LOSICK R., **Biologia Molecular do Gene**, Porto Alegre, RS, 5ª Edição, Artmed, p. 648, 2006.

YILMAZ M.; OZIC C.; GOK I., **Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis, Gel Electrophoresis – Principles and Basics**, Editora Dr. Sameh Magdelin, 2012.

## ANEXO 1

- Protocolo para preparo de *Loading Dye*:
  - 25 g de Azul de bromofenol.
  - 25 g de Xilenocianol.
  - 33 ml de Glicerol.
  - 67 ml de água destilada.
  
- Em um recipiente (béquer, erlenmeyer), adicionar os reagentes, depositando-os em eppendorf e armazenando em ambiente refrigerado.

Fonte: Caderno de protocolos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Universidade Federal do Tocantins.

## ANEXO 2

- Protocolo para preparo de marcador *ladder* (BioLabs®):
  - 4  $\mu\text{L}$  de água destilada----- x 10 ----- = 40  $\mu\text{L}$  de água.
  - 1  $\mu\text{L}$  de loading *buffer*----- x 10 ----- = 10  $\mu\text{L}$  de loading.
  - 1  $\mu\text{L}$  de DNA *ladder* ----- x 10 ----- = 10  $\mu\text{L}$  de DNA *ladder*.  
60  $\mu\text{L}$  de marcador.
  
- Em um recipiente (béquer, erlenmeyer), adicionar os reagentes, depositando-os em eppendorf e armazenando em ambiente refrigerado.

Fonte: Caderno de protocolos do Laboratório de Microbiologia da Universidade  
Universidade Federal do Tocantins.

### ANEXO 3

- Protocolo para preparo de TBE (Tris/Borato/EDTA) *Buffer* 10x :
  - Tris Base----- 108 g.
  - Ácido Bórico----- 55 g.
  - EDTA 0,5 pH 8,0----- 40 ml.
- Completar para 1000 ml com água destilada, e armazenar em temperatura ambiente em frasco âmbar.
- Para preparo de TBE 1x: adicionar 900 ml de água destilada em 100 ml de TBE 10 x. Guardar em geladeira.
- Para preparo de TBE 5x: diluir 100 ml de solução TBE 10x em 400 ml de água destilada. Guardar em geladeira.

Fonte: Caderno de protocolos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Universidade Federal do Tocantins.