



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

***UTILIZAÇÃO DE ONDAS SÔNICAS E ULTRA-  
SÔNICAS PARA OBTENÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS  
DE MÚSCULO HUMANO***

ANA CAROLINA BERNARDI DELLA GIUSTINA

Recife, PE  
2009

ANA CAROLINA BERNARDI DELLA GIUSTINA

***UTILIZAÇÃO DE ONDAS SÔNICAS E ULTRA-  
SÔNICAS NA OBTENÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS  
DE MÚSCULO HUMANO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

*Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, M.Sc, Ph.D. (Orientadora)*  
*Vanduir Soares de Araújo Filho, M.Sc, Ph.D. (Colaborador Científico)*

Recife, PE  
2009

Della Giustina, Ana Carolina Bernardi

Utilização de ondas sônicas e ultra-sônicas para obtenção de DNA em amostras de músculo humano / Ana Carolina Bernardi Della Giustina. – Recife: O Autor, 2009.

50 folhas: fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Ciências Biológicas, 2009.

Inclui bibliografia e anexo.

1. DNA 2. Ultra-som 3. Sonicação 4. Músculo humano I Título.

577.213.3  
572.86

CDU (2.ed.)  
CDD (22.ed.)

UFPE  
CCB – 2009 - 64

# Utilização de Ondas Sônicas e Ultra-Sônicas na Obtenção de DNA em Amostras de Músculo Humano

Ana Carolina B. D. Giustina

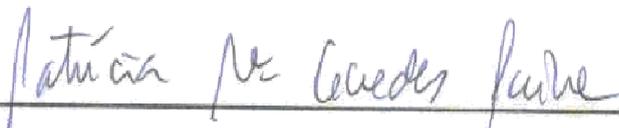
A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, considera a candidata  
**APROVADA COM DISTINÇÃO.**

## COMISSÃO EXAMINADORA



---

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia



---

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

---

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho  
(Orientadora)

*PARA VICENTE, LÊDA,  
SAMPSON E CAMILA.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Vanduir Soares de Araújo Filho, pela oportunidade e grande conhecimento transmitido;

À professora Doutora Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela confiança;

Ao Diretor Geral do Instituto de Polícia Científica da Paraíba, Antonio Albuquerque Toscano, pela cessão do espaço físico e equipamentos para a realização deste trabalho;

A grande amiga Hérika, pela grande ajuda e companhia durante o mestrado;

Aos colegas do Laboratório de DNA do IPC-PB: Germana, Gisleyde, Lêda, Maria do Carmo, Sarah, Sérgio, Silvana e Vanessa, pelos momentos de descontração e amizade.

Aos colegas da USF Poço, Alisson e Suely, pela preciosa cooperação na realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	9
1.1	Generalidades .....	9
1.2	Identificação Humana pelo DNA: uma abordagem forense .....	9
1.3	Extração de DNA .....	11
1.4	Estudo do Ultra-Som .....	13
1.5	A extração de DNA utilizando Ultra-Som .....	15
1.6	Quantificação de DNA .....	17
1.7	Marcadores Genéticos .....	18
1.7.1	<i>Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)</i> .....	19
1.7.2	<i>Short Tandem Repeat (STR)</i> .....	19
1.7.3	<i>Single Nucleotide Polymorphysm (SNPs)</i> .....	20
2	REFERÊNCIAS .....	21
3	OBJETIVOS .....	27
3.1	Geral .....	27
3.2	Específicos .....	27
4	MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO .....	28
5	CONCLUSÕES .....	43
6	ANEXOS .....	44

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Ondas mecânicas .....	13
Figura 2. Equipamentos sônicos e ultra-sônicos.....	14
Figura 3A. Formação e colapso de uma bolha de cavitação em um líquido irradiado com ultra-som; B. Bolha de cavitação de um líquido irradiado com ultra-som próximo a uma superfície sólida .....	15

### MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1. Determinação do melhor tampão de lise em instrumento sônico.....	34
Figura 2. Comparação entre energia sônica e ultra-sônica.....	35
Figura 3. Eletroferograma de amostra de músculo obtida pelo método orgânico tradicional (Minifiler®).....	36
Figura 4. Eletroferograma de amostra de músculo obtida com o uso de instrumento sônico (Minifiler®).....	36
Figura 5. Eletroferograma de amostra de músculo obtida com o uso de instrumento ultra-sônico (Minifiler®).....	37
Figura 6. Lise das amostras de músculo utilizando instrumento sônico.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

CTAB ~ Brometo de Cetiltrimetilamônio (do inglês, *Cetyltrimethylammonium Bromide*)

DNA ~ Ácido Desoxirribonucléico (do inglês, *Desoxiribonucleic Acid*).

DTT ~ Ditioneitol

PCR ~ Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*).

PK ~ Proteinase K

RFLP ~ Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphisms*).

SDS ~ Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, *Sodium Dodecil Sulfate*).

SNP ~ Polimorfismo de um Único Nucleotídeo (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*).

STR ~ Repetições Curtas em Tandem (do inglês, *Short Tandem Repeats*).

Tris-HCl ~ *Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride*.

VNTRs ~ Número Variável de Repetições em Tandem (do inglês, *Variable Number of Tandem Repeats*).

## **RESUMO**

A obtenção de DNA com finalidades forenses pode ser dividida em duas etapas, a digestão ou lise da amostra, liberando as moléculas de DNA na solução, e a purificação, que torna o DNA acessível às outras etapas do processo. Os métodos de lise celular em uso corrente na rotina laboratorial forense incluem variações de temperatura e uso de substâncias químicas como proteinase K, detergentes e agentes redutores em um processo bastante demorado e de alto custo. Neste trabalho, dois novos métodos de obtenção de DNA de músculo humano utilizando sondas sônicas (8 KHz) e ultra-sônicas (24 KHz) foram desenvolvidos. Empregando ondas sônicas é possível realizar a lise completa de amostras de músculo em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 contendo 2% de SDS em apenas dois minutos. Utilizando ondas ultra-sônicas é possível a obtenção de DNA em água Milli-Q em dois minutos e sem a necessidade de etapas posteriores de purificação. Ambos os métodos resultaram em quantidades suficientes de DNA para identificação humana em ciência forense, entretanto, as amostras sonicadas resultaram em quantidades de DNA significativamente maiores que as obtidas das amostras submetidas ao ultra-som.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ultra-som, sonicação, extração, DNA, músculo.

## **ABSTRACT**

DNA extraction for forensic issues can be divided into two stages, digestion or lysis of samples, releasing DNA molecules in solution, and purification, making the DNA accessible to other process steps. Methods of cell lysis in current use in forensic laboratories include temperature variations and use of chemicals like proteinase K, detergents and reducing agents in a very slow and high cost process. In this work, two new methods for obtaining DNA from human muscle by using sonic probe (8 kHz) and ultrasonic probes (24 KHz) were developed. By using sonic waves is possible to execute complete lysis of muscle samples in buffer 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, SDS 2% in only two minutes. Ultrasonic waves enable DNA extraction in Milli-Q water in two minutes without subsequent purification steps. Both methods resulted in sufficient quantities of DNA for human identification in forensic science, however, sonicated samples resulted DNA quantities significantly larger than samples subjected to ultrasound.

**KEY WORDS:** Ultra-sound, Sonication. DNA, extraction, muscle.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Generalidades

A análise do DNA (Ácido Desoxirribonucléico) foi revolucionária para as ciências forenses. A necessidade de apenas mínimas quantidades de tecido, a estabilidade do DNA e o seu alto grau de exatidão e precisão contribuíram para a evolução do uso dessa ferramenta para identificação individual. O estudo de perfis genéticos está alterando rapidamente a maneira pela qual é realizado o exame de DNA em casos de paternidade, crimes sexuais, homicídios, desastres em massa e estudos populacionais (Budowle, 2000).

A identificação humana através do perfil de DNA se tornou padrão em investigações criminais, sendo que a maioria dos sistemas de tipagem com finalidade forense é baseada em locos genéticos com seqüências repetidas em *tandem*, que apresentam variações na seqüência e no número de elementos repetitivos (Schneider 1997).

Para serem efetivas, as técnicas desenvolvidas para utilização nos laboratórios devem ser rápidas e de fácil uso para os pesquisadores. A quantidade limitada ou a reduzida qualidade das amostras para análise forense requerem que os métodos de análise do DNA sejam reprodutíveis. Etapas desnecessárias devem ser evitadas e as necessárias devem ser otimizadas, principalmente para redução de custos e de tempo. A confiança nos resultados e sensibilidade da técnica devem ser maximizados (Jobling, 2004).

Neste trabalho emprega-se pela primeira vez ondas sônicas e ultra-sônicas para lise celular e obtenção de DNA em amostras de músculo humano, sem a necessidade do uso de reagentes químicos, com significativa redução de tempo e custo de análise.

## 1.2 Identificação Humana pelo DNA: uma abordagem forense

Em um indivíduo adulto, com cerca de 100 trilhões de células, as moléculas de DNA que o identificam são as mesmas sejam na pele, nos ossos, no sangue ou em qualquer outro tecido do seu organismo. Sendo o DNA a única molécula capaz de produzir cópias de si mesma, cabe a ela a tarefa da hereditariedade, transmitindo caracteres por várias gerações.

O advento do DNA revolucionou as ciências forenses e possibilitou aos laboratórios criminais, testando uma variedade de amostras biológicas, a identificação humana. Esta identificação individual é desejável em inúmeras situações, tais como na determinação de autores de um crime violento, homicídios, estupros, na resolução de paternidades indeterminadas e identificando restos mortais de pessoas desaparecidas ou de desastres em

massa. A primeira amostra forense testada pelo DNA precisou de pelo menos 25 a 100 vezes mais DNA na amostra do que atualmente é necessário para um resultado (Gill, 1985). A incorporação de modernas tecnologias de biologia molecular em laboratórios criminais resultou, em uma taxa notavelmente crescente, na identificação de criminosos e na liberação de inocentes (Butler, 2005).

DNA *fingerprinting* ou tipagem de DNA como é mais conhecido, foi descrito primeiramente pelo geneticista inglês Alec Jeffreys em 1985. Ele descobriu que determinadas regiões do DNA continham seqüências que eram repetidas várias vezes próximas umas das outras. Essas regiões eram altamente polimórficas - o número de regiões repetidas presentes em uma amostra diferenciava-se entre indivíduos (Jeffreys *et al.*, 1985). Desenvolvendo uma técnica que examinava o comprimento da variação destas seqüências de repetições no DNA, Dr. Jeffreys criou a possibilidade de realizar testes de identificação humana.

Essas repetições do DNA ficaram conhecidas como VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) ou minissatélites. Compreendem seqüências que se repetem em blocos e geralmente apresentam o comprimento de 9 a 80 bases por unidade de repetição. A tecnologia de Alec Jeffreys para examinar as VNTRs foi chamada de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), porque envolvia o uso de uma enzima de restrição para cortar as regiões do DNA adjacentes às VNTRs. Esta técnica foi primeiramente usada para resolver um duplo homicídio na Inglaterra. Desde então, testes de identificação humana utilizando DNA foram difundidos. Os últimos 15 anos testemunharam um enorme crescimento no uso da evidência do DNA para investigação de cena de crimes (Butler, 2005).

Entretanto, esta tipagem molecular mostrava-se muito trabalhosa e requeria grandes quantidades de DNA intacto para ser utilizado de forma rotineira nas restritas amostras de local de crime. Uma estratégia alternativa para a técnica de RFLP na análise de amostras forenses é a utilização dos métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR: do inglês *polymerase chain reaction*). A principal característica que faz da PCR uma técnica especialmente útil é que ela oferece grande sensibilidade de detecção e boa especificidade, adicionada de uma velocidade de reação jamais usada anteriormente em procedimentos de biologia molecular (Budowle, 2000).

A PCR foi descrita por Kary Mullins no final da década de 1980 (Mullins *et al.*, 1986). Consiste em um processo enzimático *in vitro* que aumenta exponencialmente a quantidade de pequenas e específicas seqüências-alvo de DNA. Esta região específica é replicada continuamente até alcançar muitos milhares de cópias de uma seqüência particular. A característica que se destaca na PCR é a habilidade de obtenção de grandes quantidades em

regiões específicas de DNA a partir de pequenas quantidades (picogramas ou nanogramas) de DNA genômico. Isto corresponde a aproximadamente 300 mil cópias de uma única seqüência-alvo (Taberlet *et al.*, 1996). Além disso, a PCR pode ser automatizada e o resultado invariavelmente demora apenas algumas horas.

O surgimento da amplificação de DNA *in vitro* através da PCR foi particularmente útil no exame de amostras forenses, que possuem DNA degradado ou em pequena quantidade, seja pela idade da amostra, exposição ambiental ou tratamento químico. De fato, foi possível a obtenção de perfis genéticos de diversas amostras biológicas – como sangue, sêmen, suor e restos mortais - de forma rotineira com o uso desta nova tecnologia nos laboratórios (Butler, 2005).

Teoricamente, a PCR torna possível a amplificação de seqüências de DNA de qualquer amostra biológica. Na prática, entretanto, pela natureza das amostras forenses, compostos capazes de inibir a PCR podem ser co-purificados com o DNA molde, tornando a amplificação impossível. A PCR pode falhar tanto pela presença dos inibidores quanto pela ausência de quantidades adequadas de DNA molde. Podem-se distinguir duas categorias diferentes de inibição: os inibidores da Taq DNA polimerase que co-purificam com o DNA e as modificações do DNA molde tornando-o irreconhecível como substrato para PCR (Reiss e Rutz, 1999).

### **1.3 Extração de DNA**

Uma amostra biológica pode conter inúmeras substâncias. Por isso, as moléculas de DNA devem ser separadas de outro material celular para serem examinadas. O sucesso de um exame de DNA reside no isolamento do DNA em quantidade, pureza e qualidades suficientes (Butler, 2005).

A obtenção de DNA disponível para análise pode ser dividida em duas etapas: a digestão ou lise da amostra, liberando as moléculas de DNA na solução, e a purificação, que torna as amostras - ou o alvo analítico contido na amostra original - pronto para inserção no instrumento de medida (Priego-Capote e Castro, 2004).

Para maximizar o potencial de sucesso, os protocolos de extração de DNA devem ser capazes de purificar as pequenas quantidades de DNA de amostras forenses e ao mesmo tempo remover possíveis inibidores da PCR. Embora muitas técnicas sejam similares, existe um enorme número de variações que podem ser eficientes (Barbaro, Comarci e Barbaro, 2007).

Idealmente os protocolos de extração devem ser de baixo custo e de simples execução. Técnicas como a precipitação de DNA com emprego de etanol (Kalmar *et al.*, 2000) ou por *salting out* (Gomes *et al.*, 2007), os métodos baseados em solventes orgânicos (Ricaud *et al.*, 2005) ou no emprego de um tampão contendo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Ye *et al.*, 2004), bem como os *kits* comerciais baseados em resinas magnéticas com alta afinidade pelo DNA como o DNA iQ (*Promega*) (Rohland e Hofreiter, 2007) e ChargeSwitch (*Invitrogen*) (Barbaro *et al.*, 2008), são métodos atualmente empregados para extração de DNA de amostras forenses.

Quando a análise demanda a mais elevada qualidade do DNA, o método de escolha para a extração é orgânico (Dixon *et al.*, 2006). A pureza do DNA extraído por esta técnica geralmente é melhor do que quando utilizadas outras técnicas, porque maior quantidade de proteínas é removida. Entretanto, é uma técnica demorada e que envolve a adição seriada de muitos reagentes químicos. Primeiro a adição de sulfato sódico de dodecila (SDS) e proteinase K (PK) para quebrar e abrir as membranas celulares e para quebrar as proteínas que protegem o DNA. Fenol-clorofórmio é adicionado ao material lisado para separar o DNA do material protéico. O DNA é mais solúvel na porção aquosa desta mistura. Quando centrifugado, as proteínas e restos celulares podem ser separados. Para eliminar inibidores, o DNA pode ser precipitado com etanol ou ser associado à lavagem com filtros como o Microcon 100 (*Millipore*) (Butler, 2005).

Se o DNA extraído das amostras é de baixa qualidade, mesmo a melhor técnica de amplificação não resultará em sucesso. Os laboratórios forenses têm a necessidade de obter perfis genéticos de vários tipos de materiais biológicos, que podem estar depositados em variados tipos de suportes, como *swabs*, roupas ou objetos. Idealmente, a técnica para obtenção de DNA deve ser não-tóxica, de baixo custo, rápida e de alta sensibilidade para recuperar as pequenas quantidades de DNA presentes na amostra e eliminar possíveis inibidores. Infelizmente, não existe um protocolo universal para obtenção de DNA que preencha todos estes requisitos (Castella *et al.*, 2006). Alguns métodos, como os orgânicos, são eficientes na remoção dos inibidores da PCR (Bär *et al.*, 1988), mas podem reduzir o montante de DNA recuperado (Lahiri *et al.*, 1992; Kramvis, Bukofzer e Kew, 1996). Outros, como o Chelex-100 (Walsh *et al.*, 1991; Sweet *et al.*, 1996), são capazes de conseguir quantidades de DNA substanciais, mas são menos eficientes na remoção dos inibidores da PCR (Jung *et al.*, 1991; Greenspoon *et al.*, 1998).

## 1.4 Estudo do Ultra-Som

O som não é nada mais do que ondas de compressão e expansão passando por gases, líquidos ou sólidos. Podemos sentir estas ondas diretamente através de nossos ouvidos se tiverem frequências entre cerca de 16 Hertz a 16 kHz - a unidade Hertz são ciclos de compressão ou expansão por segundo (Suslick, 2004). Estas frequências são intrinsecamente diferentes das ondas eletromagnéticas. Estas últimas (ondas de rádio, infravermelho, luz visível, ultravioleta, raios-X e raios gama) podem passar pelo vácuo sem dificuldade; já as ondas sonoras envolvem ciclos expansão e compressão que se propagam em algum tipo de matéria (Priego-Capote e Castro, 2004).

Ultra-som (US) é simplesmente som com frequência superior à audível para o homem. A menor frequência de US é 20 kHz, enquanto a maior frequência é limitada apenas pela capacidade de gerar os sinais, de modo que frequências na casa de gigahertz têm sido utilizadas em algumas aplicações (Priego-Capote e Castro, 2004) (Figura 1).

A ciência do ultra-som é dividida em duas partes que são identificadas em termos de sua frequência e de suas aplicações: US de diagnóstico ou de alta frequência (2-10 MHz) e US de potência ou de baixa frequência (20-100 kHz). O US utilizado na química é o de baixa frequência, por ser capaz de causar mudanças físicas e químicas a sistemas. O efeito do estudo do US nestes sistemas é denominado sonoquímica (Barboza e Serra, 1992).

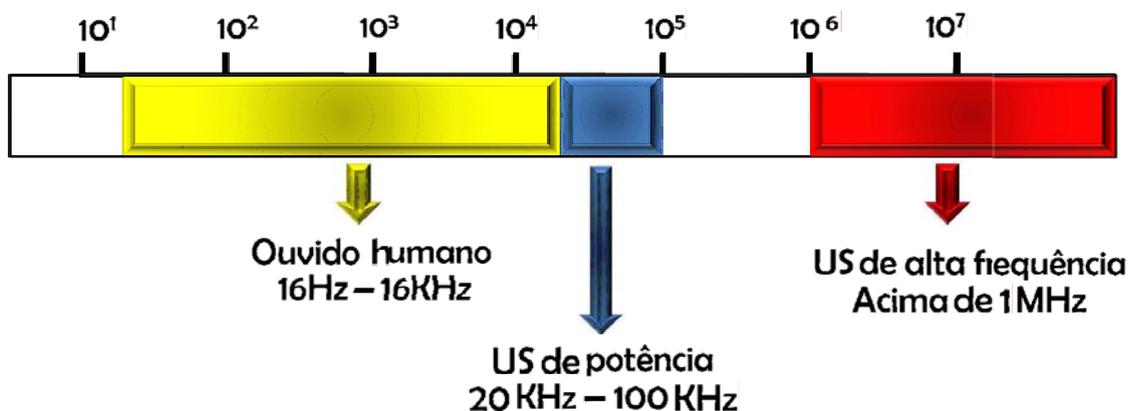


Figura 1. Ondas mecânicas.

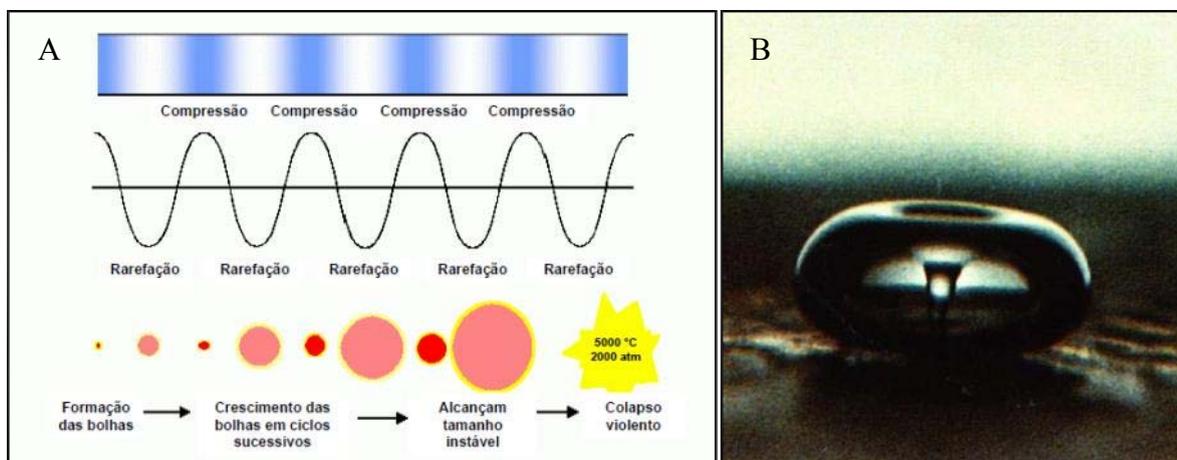
Existem no mercado diversos tipos de instrumentos sônicos e ultra-sônicos. A principal diferença entre estes sistemas está na frequência do movimento oscilatório. O primeiro sistema trabalha na faixa do som audível (20 a 20.000 Hertz), enquanto o segundo opera acima desta faixa (Figura 2). Historicamente, o sistema ultra-sônico surgiu antes dos sistemas sônicos. O desejo de renovação e a competição comercial entre as empresas levaram à criação de sistemas de instrumentação sônicos, que, ao contrário dos sistemas ultra-sônicos, utilizam ar comprimido na produção do movimento oscilatório (Pecora *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Equipamentos sônicos e ultra-sônicos. (A) sonda ultra-sônica; (B) banho ultra-sônico; (C) sonda sônica.

Os equipamentos mais comumente empregados para a produção de US e aplicáveis em estudos químicos são os banhos (constituído de uma bacia metálica, no fundo da qual estão fixados os transdutores piezoelétricos) e as sondas (que se encontra fixada na extremidade de um amplificador do transdutor) (Soudagar e Samant, 1995). O banho de US é a forma de irradiação ultra-sônica mais disponível, acessível e econômica. Infelizmente, não é uma fonte de força muito poderosa ( $15 \text{ W/cm}^2$ ) quando comparada com sondas ultra-sônicas ( $50\text{--}100 \text{ W/cm}^2$ ). Isto porque nos banhos ocorre muita dispersão da energia ultra-sônica devido às múltiplas reflexões nas paredes metálicas. A energia ultra-sônica é continuamente atenuada pelas moléculas presentes no líquido e somente uma pequena fração do líquido próxima à fonte geradora experimenta os efeitos da cavitação (Bermejo *et al.*, 2004).

A irradiação ultra-sônica de líquidos produz uma multiplicidade de reações químicas de alta energia. A mais importante delas é a cavitação: a formação, crescimento e o colapso de bolhas em um líquido (Figura 3A). Quando o ultra-som passa através de um líquido, o ciclo de expansão exerce pressão negativa sobre este, empurrando as moléculas, distanciando umas das outras. Se o ultra-som é suficientemente intenso, o ciclo de expansão pode criar cavidades no líquido (Suslick, 1994).



**Figura 3. A - Formação e colapso de uma bolha de cavitação em um líquido irradiado com ultra-som. B – Bolha de cavitação de um líquido irradiado com ultra-som próximo a uma superfície sólida.** <http://www.scs.uiuc.edu/~suslick/britannica.html>.

Quando cavitação ocorre em um líquido perto de uma superfície sólida, a dinâmica do colapso muda drasticamente. Perto de um sólido a cavitação é muito assimétrica e gera jatos de líquido de elevada velocidade (Figura 3B). Esses jatos atingem a superfície com uma força enorme, um processo que pode causar graves danos no ponto de impacto e produzir superfícies altamente reativas (Suslick, 1994). A cavitação também gera elevadas temperaturas locais e ação mecânica na interface sólido-líquido (Rotoarinoro *et al.*, 1995). Tem sido estimado que temperaturas de 5000 K e pressões na ordem de 1000 atm são geradas pelo colapso das micro bolhas de cavitação, produzidas pelo US de potência, em água a 25 °C (Mizukoshi *et al.*, 1999).

### 1.5 A extração de DNA utilizando Ultra-Som

Existe uma variedade de métodos de lise celular, como os físicos, térmicos, químicos, enzimáticos e mecânicos (Kuske *et al.*, 1998; Moré *et al.*, 1994). Estes processos podem ser demorados e muitas vezes é necessária a adição de reagentes com certo período de vida útil. Estes reagentes ainda podem complicar uma posterior PCR e sua detecção por alterar as condições químicas como o pH, ou por inibir as necessárias interações moleculares entre o primer e o DNA molde (Chandler *et al.*, 2001).

Para superar estas dificuldades, Marentis *et al.* (2005) centraram-se na investigação da sonicação ou no uso de ultra-som para perturbar membranas celulares de amostras biológicas forenses. A energia ultra-sônica pode ser usada para minimizar gastos com reagente e o tempo

de pré-tratamento dos mais variados tipos de amostras, tornando os procedimentos mais simples e rápidos.

Sondas ultra-sônicas operando em uma frequência de kHz consistem no tratamento primário em muitas aplicações microbiológicas, e estes dispositivos foram recentemente desenvolvidos para incorporação em instrumentos de detecção de ácidos nucléicos (Belgrader *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2001). Em seus estudos, Chandler *et al.* (2001) descrevem um rápido rompimento de esporos em banhos de ultra-som. Entretanto, a técnica necessitou de um pré-tratamento de 90 minutos com lisozima e a adição de partículas de vidro na câmara ultra-sônica para produzir seus efeitos.

Fikse *et al.* (2003) conduziram um tratamento ultra-sônico com uma sonda operando a 20kHz em 1ml de bactérias em suspensão ( $1 \cdot 10^7$  cels/ml). Após a sonicação, foi conduzida uma análise por PCR, sem nenhuma etapa anterior de purificação do DNA. As culturas bacterianas foram sonicadas em triplicatas por diferentes períodos de tempo; 10 s a 5 min para *Bacillus cereus* e 5 s a 3 min para *Escherichia coli*. Bactérias gram-positivas são muito mais resistentes à lise celular do que bactérias gram-negativas, devido à rígida estrutura de peptídeoglicano em suas paredes celulares (Gannon *et al.*, 1992). Ficou demonstrado por PCR em tempo real que o máximo alcance de DNA foi obtido após 3 a 5 min de sonicação para *B. cereus* e 20s para a cultura de bactérias gram-negativas *E. coli*. Entretanto, esta quantidade de DNA rapidamente decresce após 50s de sonicação, devido à degradação do DNA.

Instrumentos de lise ultra-sônica que operam a 20, 40 kHz e 1 MHz já foram descritos para obtenção de DNA em bactérias e análise em PCR (Fykse *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2001; Chandler *et al.*, 2001). Estes dispositivos efetivamente foram capazes de romper células bacterianas, mas produziram um significativo aumento na temperatura das amostras, entre 50 a 90K (Taylor *et al.*, 2001; Chandler *et al.*, 2001). Entretanto, este aumento na temperatura é tolerável quando a intenção é a liberação de DNA e conseguinte análise por PCR.

A utilização de enzimas (protease XIV) em conjunto com a energia ultra-sônica já foi reportada (Capelo *et al.*, 2004) e relatou-se o aumento da atividade da enzima. Estes achados mostraram-se interessantes por que as enzimas são conhecidas por suas condições críticas de aplicabilidade. Por trabalharem como catalisadores, muitos cuidados com temperatura e pH são necessários, caso contrário a atividade enzimática pode ser reduzida ou abolida. Entretanto, mesmo um período longo de sonicação (90s) não foi suficiente para impedir a atividade enzimática pelo aumento da temperatura a níveis elevados.

Um dos mecanismos propostos para este aumento na atividade da enzima seria o aumento na eficiência de mistura e difusão dos componentes da reação. Outra possibilidade seria que a capacidade de ruptura de paredes celulares pelas sondas ultra-sônicas aumentaria o contato entre a enzima e os componentes intracelulares, os quais, normalmente, não entram em contato com a enzima (Capelo *et al.*, 2004).

Hunter *et al.* (2008) desenvolveram um método não destrutivo, livre de reagentes químicos para extração de DNA de pequenos insetos. Moscas foram submergidas em água destilada e estéril e sonicadas por tempos variados, com a finalidade de fornecer DNA acessível à amplificação em termos de pureza e quantidade. O tempo de 60s de sonicação alcançou a maior qualidade e quantidade de DNA, embora a eficiência de amplificação tenha sido similar, indiferentemente ao tempo.

A ruptura física de células é preferível aos tratamentos químicos, particularmente no caso de detecção por PCR, onde agentes químicos podem inibir a reação da polimerase (Belgrader *et al.*, 1999). Um sistema de sonicação pode rapidamente romper membranas celulares sem a adição de reagentes químicos, enzimas ou partículas, substâncias que podem complicar a detecção de amostras. Além disso, a desnaturação do DNA alvo ou de proteínas é minimizado devido ao tolerável aumento de temperatura alcançada nesta técnica.

## 1.6 Quantificação de DNA

A quantificação de concentrações ínfimas de DNA humano, característica marcante das evidências criminais, é um passo crucial na análise do DNA em vestígios biológicos para obtenção de resultados precisos no menor prazo de tempo possível. Nesse sentido, inúmeras recomendações internacionais, dentre elas o *DNA Advisory Board* (2000), aconselha em suas diretrizes analíticas a quantificação de DNA humano presente na evidência a ser genotipada. Esta quantificação assegura que o DNA recuperado em uma extração é humano, e não de outra fonte, como bactérias.

Após o DNA de uma amostra ter sido isolado, sua quantidade e qualidade podem ser determinadas. A quantificação tem por finalidade verificar a real existência de DNA na amostra, e o seu ajuste de concentração para posterior utilização dos *kits* de STRs (*Short Tandem Repeats*), de acordo com a faixa de trabalho destes.

Os primeiros métodos de quantificação de DNA envolviam absorvância a 260nm ou fluorescência por brometo de etídio. Entretanto estas técnicas não eram muito sensíveis e consumiam grandes quantidades de DNA extraído. Além disso, as mensurações por

absorbância não são específicas para DNA, e por isso proteínas ou resíduos de fenol poderiam gerar sinais falso-positivos. Para superar estes entraves, diversas técnicas foram desenvolvidas com o propósito de quantificação de DNA. Dentre estas técnicas incluem-se a PCR em tempo real (Butler, 2005; Nicklas e Buel, 2003).

A reação em cadeia da polimerase em tempo real é uma variante da reação de PCR convencional empregada para quantificação ou análise do DNA de uma amostra. Este método se baseia na atividade 5'-3' exonuclease da enzima DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus* com o emprego de uma sonda, parcialmente homóloga à região amplificada, marcada na extremidade 5' com uma substância fluorescente e, na extremidade 3', com uma substância (*quencher*) que extingue a fluorescência do marcador da posição 5'. A cada ciclo da PCR é originado um sinal fluorescente de intensidade proporcional à quantidade de DNA presente na amostra (Green *et al.*, 2005; Sobrino *et al.*, 2005; Holland *et al.*, 1991).

## 1.7 Marcadores Genéticos

O seqüenciamento do genoma humano revelou que os 23 cromossomos do *Homo sapiens* são compostos aproximadamente por três bilhões de bases, dos quais 1,1% corresponde a éxons, 24% a introns e 75% são seqüências intergênicas (Venter *et al.*, 2001). Cerca de 50% do genoma humano é constituído por seqüências repetitivas que podem estar dispersas ou organizadas em *tandem*, uma ao lado da outra.

A variabilidade humana em termos de DNA é imensa. Estima-se que dois genomas humanos escolhidos ao acaso diferem aproximadamente uma em cada 500 bases do DNA (nucleotídeos). Tendo em vista que o genoma humano tem cerca de  $3 \times 10^9$  pares de nucleotídeos, isto significa que há 6 milhões de diferenças entre duas pessoas (Lee e Gaensslen, 1990). Essas regiões variáveis é que possibilitam o uso do DNA com propósitos de identificação.

Um perfil genético obtido pela combinação de vários microssatélites pode ser muito raro. A raridade de um perfil depende principalmente de dois fatores: o número de marcadores e a freqüência dos alelos variantes. Quanto maior o número de marcadores utilizados e quanto menor for a freqüência dos alelos, mais raro será o perfil.

### 1.7.1 *Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)*

Os minissatélites ou VNTRs são segmentos de DNA constituídos por unidades de cerca de 10-100 pares de base que estão conectadas, repetidas seqüencialmente em *loci* cromossômicos, adjacentes umas às outras (Butler, 2005).

A análise de *loci* VNTR requer uma grande quantidade de DNA de alto peso molecular. Esta condição dificultava a obtenção de perfis de amostras coletadas em local de crime, na maioria das vezes encontradas em quantidades ínfimas ou já com DNA degradado. Por esta razão as análises de DNA minissatélites, com sondas multilocais, não são mais de uso corrente nas aplicações forenses (Jobim *et al.*, 2006).

### 1.7.2 *Short Tandem Repeat (STR)*

Os microssatélites ou STRs são seqüências repetitivas que estão presentes nos genomas humanos, de animais, plantas e fungos. Nos humanos, estima-se que compreendam cerca de 20% do genoma e podem se localizar em regiões intergênicas, em íntrons ou em regiões flanqueadoras. São encontrados tanto nos cromossomos autossomos como nos sexuais (Arcot *et al.*, 1995; Schotterer, 1998). O polimorfismo dos microssatélites se deve tanto ao ganho como à perda de unidades sendo que os alelos são identificados pelo número de unidades (Schotterer, 1998).

Desde que foram descobertos, os microssatélites têm tido ampla aplicação em áreas como biologia molecular, genética funcional e qualitativa e biologia populacional. Isso se deve a sua hipervariabilidade, abundância e ampla distribuição por todo o genoma, por fornecerem informação genealógica e por poderem ser amplificados por PCR. A aplicabilidade dos microssatélites na identificação individual, em casos forenses e de paternidade, tornou os marcadores genéticos predominantes nessa área a partir da década de 1990 (Goldstein e Schoettere, 1999; Schoske, 2003).

O sistema escolhido para exames de amostras forenses possuem 4 ou 5 pares de bases (tetra ou penta nucleotídeos) que se repetem aproximadamente de 5 a 50 vezes, dependendo do *loci* (Primorac *et al.*, 2000). Como os STRs são pequenos em tamanho – uma região com 8 cópias de um tetranucleotídeo possui 32 pares de bases de comprimento – podem ser amplificados por PCR (Butler, 2005).

Os alelos amplificados, na prática, chegam a 500 pares de base de comprimento, porque a seqüência flanqueadora da região - local aonde os *primers* irão se anelar – acaba por aumentar a região amplificada. Ainda assim os STRs são muito pequenos em tamanho,

quando comparado com as bandas de RFLP que podem variar em tamanho de 500 a 12000 pares de bases.

Os novos sistemas de STRs têm suas vantagens. A primeira é a de que vários *loci* são amplificados simultaneamente (reações multiplex). A segunda é a de que estes sistemas podem ser detectados diretamente, sem o uso de sondas. Um conjunto de *primers* têm uma fluorescência ligado a eles, de tal forma que multiplexes de PCR podem ser detectados através de diferentes comprimentos de onda luz. Isto permite simultânea eletroforese e detecção de oito a dezesseis regiões em um único momento (Buel *et al.*, 1998). Além disso, a utilização de fluorescência torna os sistemas capazes à detecção automática. *Kits* comerciais estão disponíveis para diferentes sistemas de detecção automatizados (Primorac *et al.*, 2000 e Meissner *et al.*, 2007).

### **1.7.3 *Single Nucleotide Polymorphysm (SNPs)***

Recentemente os cientistas forenses têm focado suas atenções para os SNPs (*single nucleotide polymorphysm*), ou seja, polimorfismos de um único nucleotídeo, que surgem como método alternativo na análise de DNA. Os SNPs podem ser analisados em amplicons pequenos, portanto úteis em DNA muito degradado, quando as análises de STRs não são mais possíveis (Onori *et al.*, 2006). Milhões de SNPs estão dispersos no genoma humano sendo mais estáveis (menos sujeitos a mutação) que os mini e microssatélites (Jobim *et al.*, 2006).

## 2 REFERÊNCIAS

Arcot , S.S.; Wang, Z.; Weber J. L.; Deininger, P.L.; Batzer, M.A. Alu Repeats: A Source for the Genesis of Primate Microsatellites. **Genomics**, v. 29, n.1, p. 136-144, 1995.

Bär, W.; Kratzer, A.; Mächler, M.; Schmid, W. Postmortem stability of DNA. **Forensic Sci Intern**. n.39, p.59-70, 1988.

Barbaro, A.; Cormaci, P.; Barbaro A. Validation of DNA typing from skeletal remains using the Invitrogen Charge Switch Forensic DNA Purification Kit. **Forensic Sci Intern: Genetics Supplement Series**, 2008.

Barboza, J.C.S.; Serra, A.A. **Quim Nova**, n.15, p.302, 1992.

Belgrader, P.; Hansford, D.; Kovacs, G.; Venkateswaran, K.; Mariella, R.; Milanovich, F.; Nasarabadi, S.; Okuzumi, M.; Pourahmadi, F.; Northrup N. A Minisonicator To Rapidly Disrupt Bacterial Spores for DNA Analysis. **Anal Chem**, n.71, p. 4232-4236, 1999.

Bermejo, P.; Capelo, J.L.; Mota, A.; Madrid, Y.; Camara, C. Enzymatic digestion and ultrasonication: a powerful combination in analytical chemistry. **Trends Anal Chem**, v. 23, n. 9, 2004.

Budowle, B.; Smith, J.; Moretti, T.; Dizinno, J. **DNA typing protocols: molecular biology and forensic analysis**. Eaton Publishing, MA. 2000.

Buel, E.; Schwartz, M.B.; LaFountain, M.J. Capillary electrophoresis STR analysis: comparison to gel-based systems. **J Forensic Sci**, n.43, p.164-70, 1998.

Butler, J. M. **Forensic DNA Typing**. Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, Second Edition, New York: Academic Press, 2005.

Castella, V.; Dimo-Simonin, N.; Brandt-Casadevall, C.; Mangin, P. Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. **Forensic Sci Intern.** n.156, p.70–73, 2006.

Capelo, J.L. *et al.*. Enzymatic Probe Sonication: Enhancement of Protease-Catalyzed Hydrolysis of Selenium Bound to Proteins in Yeast. **Anal Chem**, n.76, p. 233-237, 2004.

Chandler, D.P. *et al.* Continuous Spore Disruption Using Radially Focused, High-Frequency Ultrasound. **Anal Chem**, n.73, p. 3784-3789, 2001.

DNA Advisory Board. Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories. **Forensic Sci Comm**, n.2, v.3 2000. Disponível em: <http://www.fbi.gov/programs/lab/fsc/backissu/july2000/codispre.htm>

Diacio, R. Practical considerations for the design of quantitative PCR assays. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. (Eds.), **PCR Strategies**. San Diego: Academic Press, 1995, p. 84–108.

Dixon, L.A.; Dobbins, A.E.; Pulker, H.K.; Butler, J.M.; Vallone, P.M.; Coble, M.D.; Parson, W.; Berger, B.; Grubwieser, P.; Mogensen, H.S.; Morling, N.; Nielsen, K.; Sanchez, J.J.; Petkovski, E.; Carracedo, A.; SANCHEZ-DIZ, P.; RAMOS-LUIS, E.; BRION, M.; IRWIN, J.A.; JUST, R.S.; LOREILLE, O.; Parsons, T.J.; Syndercombe-Court, D.; Schmitter, H.; Stradmann-Bellinghausen, B.; Bender, K.; Gill, P. Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs—results of a collaborative European (EDNAP) exercise. **Forensic Sci Intern**, v. 164, p. 33–44, 2006.

Fykse, E. M.; Olsen, J. S.; Skogan, G. Application of sonication to release DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR. **J Microbiol Metho**, n. 55, p.1 – 10, 2003.

Gannon, V.P.J.; King, P.K.; Kim, J.Y.; Thomas, E.J. Rapid and sensitive method for detection of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using polymerase chain reaction. **Appl Environ Microbiol**, n.58, p. 3809– 3815, 1992.

- Gill, P.; Jeffreys, A. J.; Werrett, D. J. Forensic application of DNA ‘fingerprints’. **Nature**, n. 318, p. 577–579, 1985.
- Goldstein, D.; Schlotterer, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, 1999.
- Gomes, A.V.; Mauricio-Da-Silva, L.; Raposo, G.; Vieira, J.R.C.; Silva, R. S.13 STR loci frequencies in the population from Paraíba, Northeast Brazil. **Forensic Sci Intern**, 2007. No prelo.
- Green, R.L.; Roinestad, I.C.; Boland, C.; Hennessy, L.K. Developmental Validation of the Quantifiler™ Real-Time PCR Kits for the Quantification of Human Nuclear DNA Samples. **J Forensic Sci**, v. 50, n 4, p. 1-17, 2005.
- Greenspoon, S.A.; Scarpetta, M.A.; Drayton, M.L.; Turek S.A. QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. **J Forensic Sci**, n.43, p. 1024–1030, 1998.
- Hoff-Olsen, P.; Jacobsen, S.; Mevag, B.; Olaisen, B. Microsatellite stability in human post-mortem tissues. **Forensic Sci Intern**, n.119, p. 273-278, 2001.
- Holland, P.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc National Acad Sci USA**, v. 88, p. 7276-7280, 1991.
- Hunter, S.J.; GOODALL, T.I.; WALSH, K.A.; OWEN, R.; Day, J.C. Nondestructive DNA extraction from blackflies (Diptera: Simuliidae): retaining voucher specimens for DNA barcoding projects. **Mol Ecology Res**, n.8, p.56–61, 2008.
- Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S. L. Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. **Nature**, n. 316, p.76–79, 1985.
- Jobling, M. A.; Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. **Nature Rev Gen**, v. 5, n. 10, p. 739-751, 2004.

Jung, J.M.; Comey, C.T.; Baer, D.B.; Budowle, B. Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQ-alpha-gene, **Int J Legal Med**, n.104 p.145–148, 1991.

Kalmár, T.; Bachrati, C. Z.; Marcsik, A.; Raskó, I. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. **Nucl Acids Res**, v. 28, n. 12, 2000.

Kramvis, S.; Bukofzer, M.C.; Kew, A. Comparison of Hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIAamp blood kit, Gene Releaser and the Phenol–Chloroform method. **J Clin Microbiol**, n. 34 p. 2731–2733, 1996.

Kuske, C. R.; Banton, K. L.; Adorada, D. L.; Stark, P. C.; Hill, K. K.; Jackson, P. **J Appl Environ Microbiol**, n. 64, p. 2463-2472, 1998.

Lahiri, D.K.; Bye, S.; Nurnberger, J.I.; Hodes, M.E.; Crisp, M. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. **J Biochem Bioph Methods**, n.25, p.193–205, 1992.

Lee, H.C.; Gaensslen, R.E. **DNA and polymorphisms in forensic Science**. St. Louis: Mosby Yearbook, 1990.

Marentis, T.C.; Kusler, B.; Yaralioglu, G.G.; Liu, S.; Hægström, E.O.; Khuri-Yakub, B.T.. Microfluidic sonicator for real-time disruption of eukaryotic cells and bacterial spores for dna analysis. **Ultrason Med Biol**, v. 31, n. 9, p. 1265–1277, 2005.

Meissner, C.; Bruse, P.; Mueller, E.; Oehmichen, M. A new sensitive short pentaplex (ShoP) PCR for typing of degraded DNA. **Forensic Sci Intern**, v. 166, p. 121–127, 2007.

Moré, M.I.; Herrick, J.B.; Silva, M.C.; Ghiorse, W.C.; Madsen, E.L. **Appl Environ Microbiol**, n.60, p.1572-1580, 1994.

Mizukoshi, Y.; Shuto, T; Nasahashi, N.; Tanabe, S. **Ultrason Sonochem** n.6, p. 203, 1999.

Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Erlich, H. **Cold Spring Harbor Symp Quantum Biol**, n.51, p. 263-273, 1986.

Onori, N.; Onofri, V.; Alessandrini, F.; Buscemi, L.; Pesaresi, M.; Turchi, C.; Tagliabracci, A. Post-mortem DNA damage: A comparative study of STRs and SNPs typing efficiency in simulated forensic samples. **Inst Legal Med**, n. 1288, p. 510-512, 2006.

Pecora, J.D.; Capelli, A.; Seixas, F.H.; Marchesan, M.A.; Guerisoli, D. M. Z. Biomecânica Rotatória: Realidade ou Futuro? **Rev Ass Paulista Cir Dent**, v. 56, n. supl, p. 04-06, 2002.

Priego-Capote, F.; Luque de Castro, M.D. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. **Trends Anal Chem**, v. 23, n. 9, 2004.

Primorac, D.; Schanfield, M.S.; Primorac, D. Application of Forensic DNA Testing in the Legal System. **Croatian Med J**, v. 1, n.41, p. 32-46. 2000.

Reiss, R.A.; Rutz, B. Quality Control PCR: A Method for Detecting Inhibitors of TaqDNA Polymerase. **BioTech**, n.27, p.920-926, 1999.

Ricaud, F. X.; Keyser-Tracqui, C.; Crubezy, E.; Ludes, B. STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. **Forensic Scie Intern**, v. 151, n. 1, p. 31-35, 2005.

Rotoarinoro, F.; Contamine, A.; Wilhelm, J.; Berland, H. Power measurement in sonochemistry. **Ultrason Sonochem**, n.2, p.43, 1995.

Schlotterer, C.; Ritter, R.; Harr, B.; Brem, G. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. **Mol Biol Evol**, v. 15, p.1269-1274, 1998.

Schoske, R.; Vallone, P.M.; Ruitberg, C.M.; Butler, J.M. Multiplex PCR desing strategy used for the simultaneous amplification of 10 Y cromossome short tandem repeat (STR) loci. **Anal Bioanal Chem**, n.375, p.333-343, 2003.

Sobrinho, B.; Brión, M.; Carracedo, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. **Forensic Sci Intern**, v. 154, p. 181–194, 2005.

Soudagar, S.R.; Samant S.D. Investigation of Ultrasound Catalyzed Oxidation of Arylalkanes using Aqueous Potassium Permanganate. **Ultrason Sonochem**, n.2, p.49, 1995.

Suslick, K.S. Acoustic cavitation and its chemical consequences. **Phil Trans Roy Soc London**, n.357, p. 335-353, 1999.

Sweet, D.; Lorente, M.; Valenzuela, A.; Lorente, J.A.; Alvarez, J.C. Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. **Forensic Sci Intern**. n.83, p.167–177, 1996.

Taberlet, P.; Griffin, S.; Goossen, B.; Questiau, S.; Manceau, V.; Escaravage, N.; Waits, L.P.; Bouvet, J.. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. **Nuclei Acids Res**, v. 24, n. 16, p.3189–3194, 1996.

Taylor, M.T.; Belgrader, P.; Furman, B.J.; Pourahmadi, F.; Kovacs, G.T.A.; Northrup, M.A. Lysing Bacterial Spores by Sonication through a Flexible Interface in a Microfluidic System. **Anal Chem**, n.73, p.492-496, 2001.

Venter *et al.* The Sequence of the Human Genome. **Science**, v.291, n.5507, p.1304 – 1351, 2001.

Ye, J.; Ji, A.; Parra, E. J.; Zheng, X.; Jiang, C.; Zhao, X.; Hu, L.; Tu, Z. A simple and efficient method for extracting DNA from old and burned bone. **J Forensic Sci**. v. 49, n. 4, p. 754-759, 2004.

Walsh, P.S.; Metzger, D.A.; Higuchi, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotech**, n.10 p.506–513, 1991.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar a utilização de ondas sônicas e ultra-sônicas na obtenção de DNA de amostras de músculo humano.

#### **3.2 Específicos**

Avaliar os efeitos de ondas sônicas e ultra-sônicas sobre o tempo de lise de amostras de músculo;

Determinar o melhor tampão de lise celular em amostras de tecido muscular;

Comparar o instrumento sônico com o instrumento ultra-sônico como ferramenta de lise de tecido muscular no processo de obtenção de DNA.

## 4 MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO

### UTILIZAÇÃO DE ONDAS SÔNICAS E ULTRA-SÔNICAS PARA OBTENÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS DE MÚSCULO HUMANO

Ana C. B. D. Giustina<sup>1,2</sup>, Vanduir S. A. Filho<sup>1,3</sup>, Hérika G. A. Carvalho<sup>1,2</sup>, Luana C. B. B. Coelho<sup>1</sup>

*1- Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Rua Nelson Chaves, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil – CEP: 50670-420.*

*2- Instituto de Polícia Científica, Av. Antônio Teotônio, s/n, Cristo Redentor, João Pessoa – PB, Brasil – CEP 58071-620.*

*3- Institutos Paraibanos de Educação – IPÊ, Campus Universitário, Br 230, Km 22, João Pessoa PB, Brasil - CEP: 58053-000.*

Manuscrito a ser encaminhado à revista

*Química Nova*

ISSN 0100 - 4042

## **DNA EXTRACTION OF HUMAN MUSCLE SAMPLES BY USING OF SONIC AND ULTRA-SONIC PROBES**

### **ABSTRACT**

DNA extraction for forensic issues can be divided into two stages, digestion or lysis of samples, releasing DNA molecules in solution, and purification, making the DNA accessible to other process steps. Methods of cell lysis in current use in forensic laboratories include temperature variations and use of chemicals like proteinase K, detergents and reducing agents in a very slow and high cost process. In this work, two new methods for obtaining DNA from human muscle by using sonic probe (8 kHz) and ultrasonic probes (24 KHz) were developed. By using sonic waves is possible to execute complete lysis of muscle samples in buffer 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, SDS 2% in only two minutes. Ultrasonic waves enable DNA extraction in Milli-Q water in two minutes without subsequent purification steps. Both methods resulted in sufficient quantities of DNA for human identification in forensic science, however, sonicated samples resulted DNA quantities significantly larger than samples subjected to ultrasound.

**KEY WORDS:** Sonication. DNA, extraction, muscle.

## Introdução

Os laboratórios forenses têm a necessidade de obter perfis genéticos de vários tipos de materiais biológicos, que podem estar depositados em variados tipos de suportes, como *swabs*, roupas ou objetos. Idealmente, uma técnica para extração de DNA deveria ser não-tóxica, de baixo custo, rápida e de alta sensibilidade para recuperar as pequenas quantidades de DNA presentes na amostra e eliminar possíveis inibidores. Infelizmente, não existe um protocolo universal para obtenção de DNA que preencha todos estes requisitos.<sup>1</sup>

Existe uma variedade de métodos de lise celular, como os físicos, térmicos, químicos, enzimáticos e mecânicos.<sup>2,3</sup> A ruptura física de células é preferível aos tratamentos químicos,<sup>4</sup> no entanto o método mais comumente utilizado envolve a adição de diversas substâncias, como enzimas, detergentes, ácidos e solventes orgânicos, reagentes químicos perigosos e que tornam a extração do DNA uma técnica com alta demanda de tempo e custo. Estes reagentes ainda podem complicar uma posterior PCR, devido a agentes químicos que podem inibir a reação da polimerase.<sup>5</sup> Para superar estas dificuldades, diversos autores centraram-se na investigação da sonicação ou no uso de ultra-som para perturbar membranas celulares de amostras biológicas e subsequente análise do DNA.<sup>5,6,7,8</sup>

Um sistema de sonicação pode rapidamente romper membranas celulares sem a adição de reagentes químicos, enzimas ou partículas, e assim minimizar gastos com reagentes e tempo com pré-tratamento dos mais variados tipos de amostras, tornando os procedimentos mais simples e rápidos.<sup>6</sup> Entretanto, não há na literatura trabalhos que envolvam a extração de DNA de tecidos humanos com a utilização de ondas sônicas ou ultra-sônicas com finalidade forense. No presente trabalho são descritos dois novos métodos de obtenção de DNA de músculo humano utilizando sondas sônicas (8 KHz) e ultra-sônicas (24 KHz), com o objetivo de identificação criminal, resultando em significativa redução de tempo e custos de análise.

## **Materiais e Métodos**

### **Seleção da Amostra**

Foram utilizadas amostras de músculo humano de 10 cadáveres não identificados do Laboratório de DNA Forense do Instituto de Polícia Científica do Estado da Paraíba. Para padronizar os resultados obtidos em cada alíquota, foi calculada a quantidade de DNA obtida por mg de músculo, multiplicando o valor quantificado de cada amostra com o volume final obtido após purificação e dividindo pelo peso da alíquota utilizada em mg.

### **Lise Celular**

Inicialmente 18 alíquotas de 7mg (em média) de uma das amostras de músculo acima citadas foram submetidas à lise em Sonicador *Air Scaler (Microdont)*, operando a uma frequência de 8kHz, em triplicata, durante 2 minutos, testando uma variedade de tampões: 120 µl de tampão Tris-HCl contendo 2% de SDS p/v, adicionado de 15 µl de PK a 18mg/mL e 15 µl DTT (Ditiotreitol) 1M; 135 µl de tampão Tris-HCl contendo 2% de SDS p/v, adicionado de 15 µl de PK a 18mg/mL; 135 µl de tampão Tris-HCl contendo 2% de SDS p/v, adicionado de 15 µl de DTT 1M; 150 µl de tampão Tris-HCl contendo 2% de SDS p/v; 135 µl de água Milli Q, adicionada de 15 µl de PK e 150 µl de água Milli Q.

Alíquotas da mesma amostra foram submetidas, em triplicata, à lise em 150 µL de água Milli Q em aparelho de ultra-som (Dabi Atlante), operando a uma frequência de 20 kHz, durante 2 min.

Controles positivos de extração foram produzidos com amostras do mesmo músculo, em triplicata, seguindo o método de lise celular tradicional - incubação por 2 horas a 56°C com 135 µL de tampão de incubação (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM NaCl, SDS a 2%), 15

$\mu\text{L}$  de proteinase K a 18 mg/mL e 15  $\mu\text{L}$  de DTT 1M e purificação utilizando fenol-clorofórmio.<sup>9</sup>

### **Purificação do DNA**

Foram utilizados dois sistemas de purificação:

- a) Fenol-clorofórmio para eliminação de proteínas e lavagem com filtros Microcon® (*Millipore*) seguindo protocolos padronizados de extração orgânica.<sup>9</sup>
- b) Precipitação com etanol-isopropanol. As amostras tiveram seu volume duplicado com isopropanol, foram incubadas por 20 min, centrifugadas a 8.600g por 30 min, o sobrenadante foi descartado, em seguida foram adicionados a cada precipitado 150  $\mu\text{L}$  de etanol, as amostras foram centrifugadas a 8.600g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em água Milli Q.<sup>10</sup>

### **Quantificação do DNA**

As amostras de DNA extraído foram quantificadas em duplicatas no PCR em tempo real *IQ5 Thermal Cycler (Biorad)*, com a utilização do sistema *Quantifiler® (Applied Biosystems)*, conforme manual do fabricante.

Durante os experimentos foram produzidos controles negativos de amplificação.

### **Análise Estatística**

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo método Anova - *One Way* ( $p > 0,05$ ). Os desvios padrões utilizados foram calculados no programa *Microcal Origin*.

## Teste de Reprodutibilidade

Para comprovar a reprodutibilidade dos resultados obtidos nas alíquotas do músculo testado, foram analisadas dez amostras submetidas à lise celular em instrumento sônico (*Air Scaler*) e ultra-sônico (Dabi Atlante), empregando apenas a técnica de obtenção de DNA que apresentou o melhor resultado nos testes iniciais. Para o instrumento sônico utilizou-se 150 µl de tampão Tris-HCl contendo 2% de SDS P/V e purificação com fenol-clorofórmio; para o ultra-som, 150 µl de água Milli Q sem etapa de purificação posterior.

Para testar se efetivamente as quantidades de DNA obtidas pela lise sônica foram capazes de fornecer um perfil genético, amostras de músculo de 10 cadáveres de identidade desconhecida foram extraídas e submetidas à PCR com o emprego do sistema *Identifiler® e minifiler®* (*Applied Biosystems*) e em seguida os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese capilar em seqüenciador genético ABI PRISM 3130.

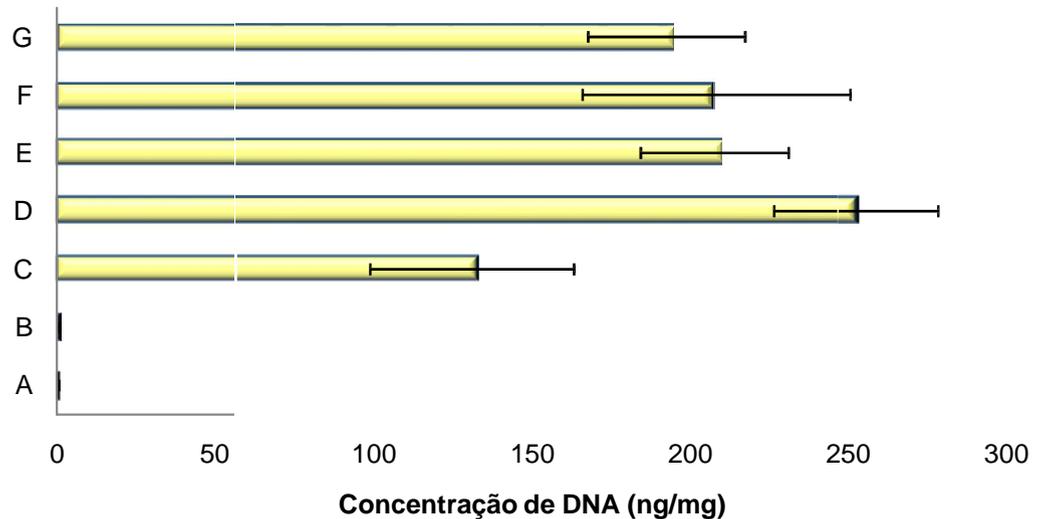
## RESULTADOS

### Determinação da Melhor Solução de Lise

Utilizando sonda sônica, as extrações apenas com água Milli Q e água Milli Q com PK não resultaram em uma quantidade de DNA compatível com o mínimo necessário para utilização em identificação criminal (1ng/µL), enquanto as quantidades de DNA obtido das amostras controle e das amostras sonicadas com tampão contendo 2% de SDS foram suficientes para obtenção de um perfil genético com amplificação simultânea de 16 regiões STR ( $\geq 1$  ng/µl) (Figura 1).

As amostras extraídas com tampão contendo apenas 2% de SDS tiveram menores quantidades de DNA quando comparado à amostra controle ( $p = 0,023$ ), entretanto as

quantidades de DNA obtido quando da adição de DTT ou PK e DTT ao tampão com SDS não foram diferentes do controle positivo para um nível de significância de 0,05. Amostras contendo tampão com SDS e PK resultaram em quantidades de DNA superiores ao controle ( $p = 0,015$ ) (Figura 1).



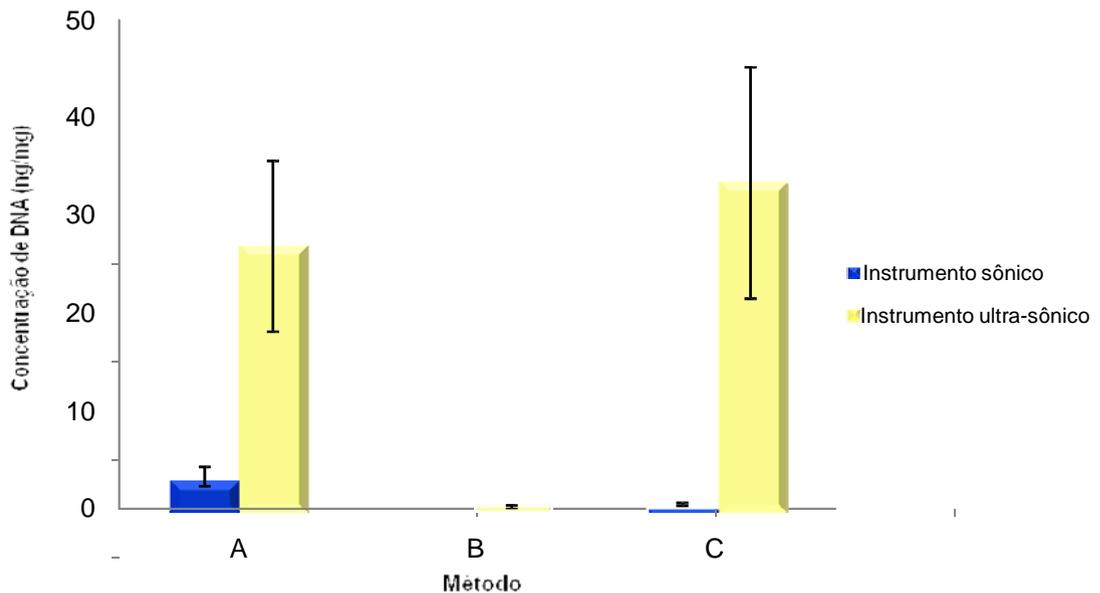
**Figura 1: Determinação do melhor tampão de lise em instrumento sônico.** A – água Milli Q; B – água Milli Q e PK; C – tampão com SDS; D – tampão com SDS e PK; E – tampão com SDS e DTT; F – tampão com SDS, PK e DTT; G – controle positivo. O método de purificação utilizado foi fenol-clorofórmio e filtro Microcon. Valores expressos em ng/mg.

### Comparação entre Energia Sônica e Ultra-Sônica na Lise Celular

As quantidades de DNA obtidos das amostras submetidas ao instrumento sônico, utilizando como solvente apenas água Milli Q, foram menores que às submetidas ao instrumento ultra-sônico, independente do método de purificação utilizado, e não correspondem à quantidade mínima necessária para ser utilizado em identificação criminal (figura 2).

As amostras submetidas ao ultra-som, utilizando como solvente apenas água não apresentaram diferença em um nível de significância de 0,05 ( $p=0,883$ ) quando purificadas

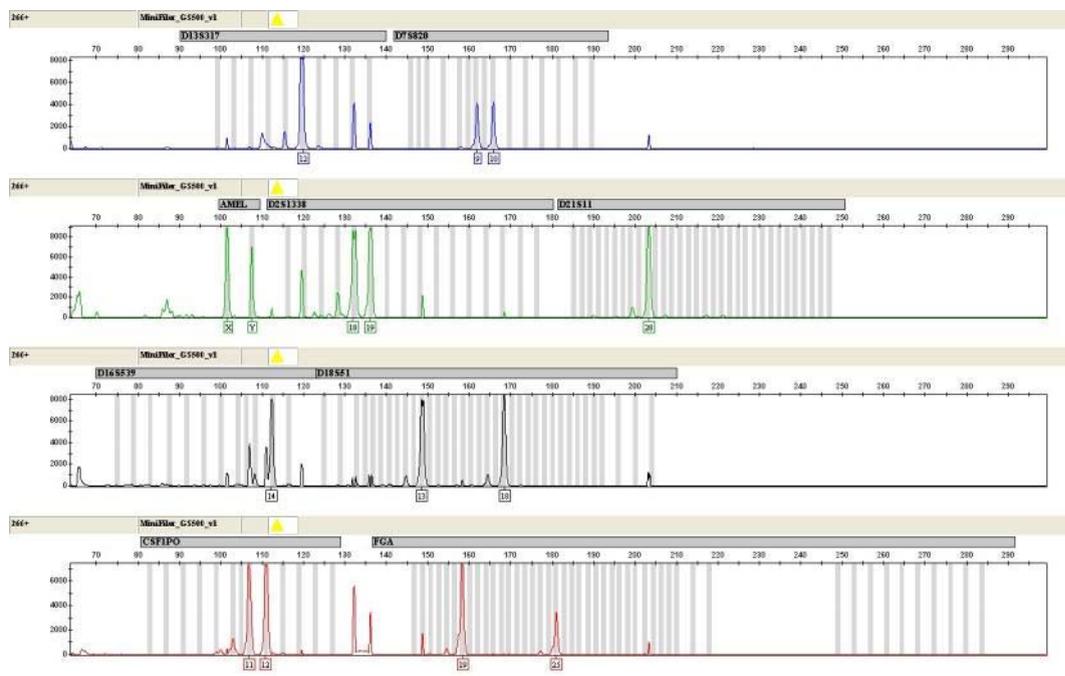
com fenol-clorofórmio ou não submetidas à purificação (figura 2). Todas essas amostras resultaram em uma quantidade de DNA extraído compatível com o mínimo necessário para obtenção de um perfil genético para identificação criminal.



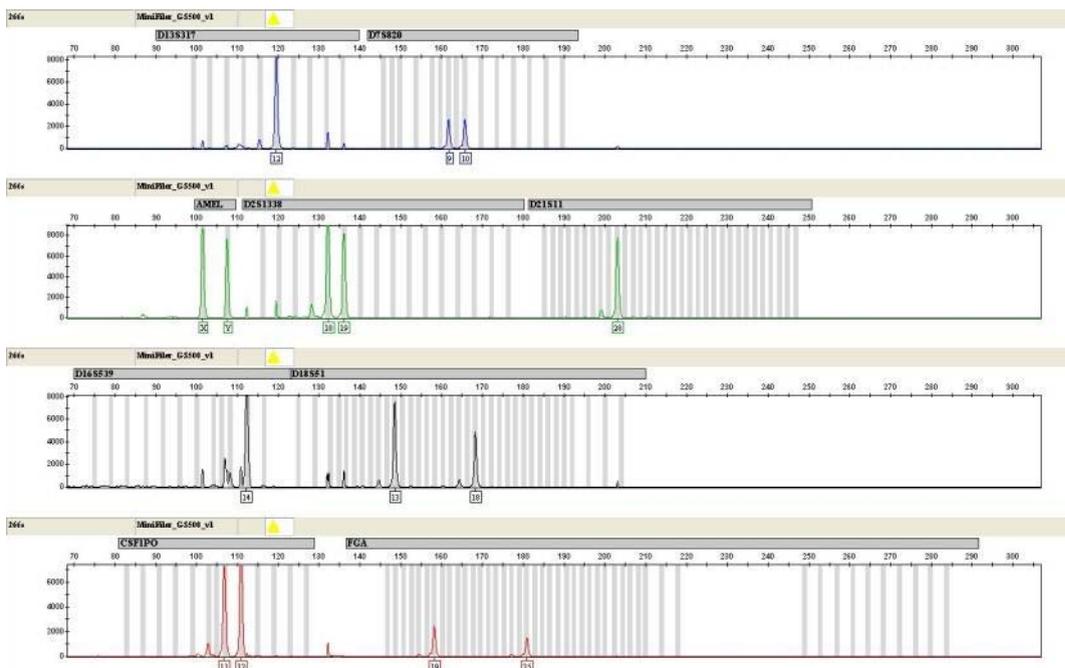
**Figura 2 – Comparação entre energia sônica e ultra-sônica.** As amostras lisadas pelos dois métodos utilizaram apenas água Milli Q como solvente. A – sem purificação; B – purificação com etanol; C – purificação com fenol-clorofórmio. Valores expressos em ng/mg.

### Teste de Reprodutibilidade

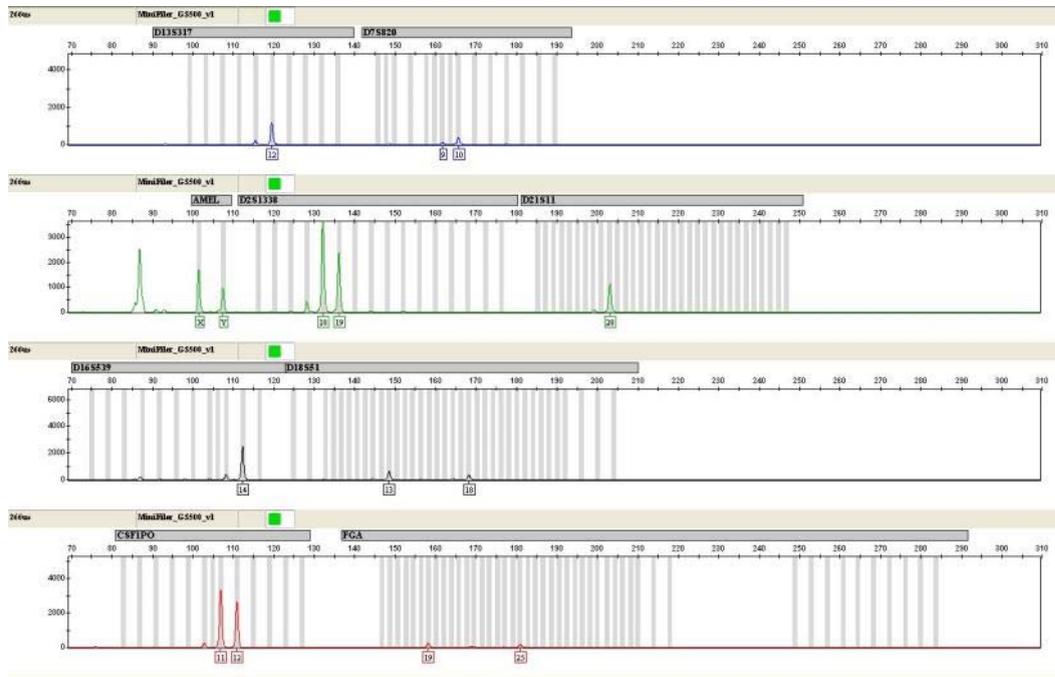
Os eletroferogramas gerados tanto pela amostra controle como pelas amostras tratadas com energia sônica e ultra-sônica foram semelhantes (figuras 3, 4 e 5), e o mesmo perfil genético foi obtido das amostras submetidas aos três sistemas de extração de DNA.



**Figura 3.** Eletroferograma de amostra de músculo obtida pelo método orgânico tradicional (Minifiler®). 1  $\mu$ L da amostra extraída foi utilizado para amplificação e eletroforese.



**Figura 4.** Eletroferograma de amostra de músculo obtida com o uso de instrumento sônico (Minifiler®). 1  $\mu$ L da amostra extraída foi utilizado para amplificação e eletroforese.



**Figura 5.** Eletroferograma de amostra de músculo obtida com o uso de instrumento ultra-sônico (Minifiler®). 1µL da amostra extraída foi utilizado para amplificação e eletroforese.

## DISCUSSÃO

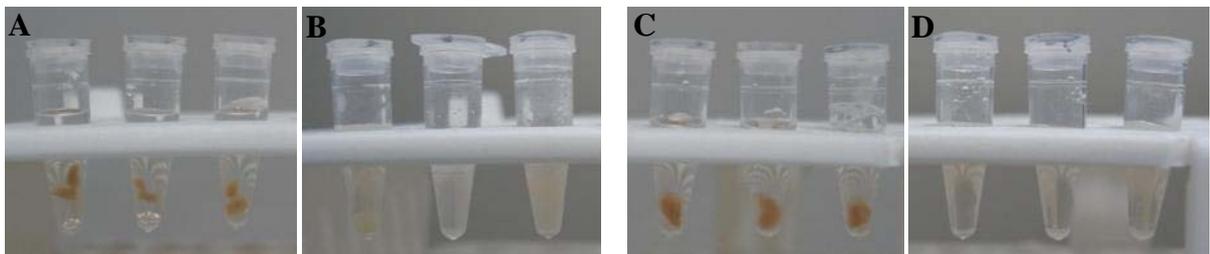
### Determinação do Melhor Tampão de Extração

Em estudo comparativo com um controle positivo foi constatado que amostras de tecido muscular submetidas a tratamento com ondas sônicas resultam em DNA extraído com a mesma quantidade e qualidade que o obtido pelo método orgânico tradicional, portanto, este método de homogeneização é efetivo para a lise celular para fins de identificação criminal pelo DNA (figura 1). Testes realizados em experimentos anteriores (dados não mostrados) determinaram o tempo de 2 minutos como o mínimo necessário para a obtenção de uma quantidade de DNA similar ao controle. Amostras submetidas a ondas sônicas não sofreram aquecimento, e um controle de temperatura da amostra não foi necessário.

As quantidades de DNA obtido quando se utiliza tampão SDS e purificação com fenol-clorofórmio são significativamente maiores (cerca de 216 vezes) do que quando o

tampão não está presente (figura 1), o que pode indicar uma lise celular incompleta pelas ondas sônicas, quando apenas água é utilizada. O sucesso na detecção e caracterização do DNA humano depende de uma eficiente extração deste DNA das amostras. A lise insuficiente das células que compõem a amostra conduz a uma incompleta obtenção de DNA analisável e podem limitar a sensibilidade da PCR.<sup>8</sup>

Capelo *et al.* demonstraram em seus trabalhos um aumento significativo na hidrólise enzimática de ligações de selênio a proteínas quando submetida a ondas ultra-sônicas (20 kHz) utilizando apenas água.<sup>11</sup> Entretanto, em nosso experimento, a adição de proteinase K à água Milli Q não aumentou significativamente a obtenção de DNA na amostra submetidas a ondas sônicas (8 kHz), o que demonstra não ser a água o meio ideal para uma boa atividade da PK. A introdução de um tampão de lise contendo 2% de SDS foi determinante para uma melhor atividade da PK e obtenção de DNA em quantidades suficientes para ser utilizado em estudos de perfis genéticos. Amostras lisadas apenas com água e PK apresentaram-se turvas e restos teciduais puderam ser observados no interior do tubo, um indicativo de uma lise incompleta. Quando um tampão contendo SDS foi adicionado, o produto de lise apresentou-se translúcido, sem restos teciduais (figura 6).



**Figura 6. Lise das amostras de músculo utilizando instrumento sônico.** (A) 135  $\mu$ l de água Milli Q e 15 $\mu$ l de PK são adicionadas às alíquotas de músculo em triplicata. Após 2 min de sonicação (B), o aspecto do produto de lise. (C) 135  $\mu$ l de tampão Tris-HCl contendo 2% de SDS P/V e 15  $\mu$ l de PK são adicionados às alíquotas em triplicata. Após 2 min de sonicação (D), o aspecto do produto de lise.

Ao acrescentar ao tampão contendo 2% de SDS outros reagentes, como PK e DTT, observou-se um aumento nas quantidades de DNA obtido, provavelmente por tais substâncias agirem como facilitadores da ruptura celular. Rohland e Hofreiter, trabalhando com amostras de ossos antigos, concluíram que a maioria dos reagentes químicos adicionados em tampões de lise celular não aumentava, e muitas vezes até diminuía, a quantidade de DNA obtido e que apenas EDTA e PK produziam aumentos significantes na obtenção de DNA.<sup>12</sup> De fato, ao adicionar somente de PK ao tampão, os resultados foram significativamente maiores ( $p=0,015$ ) do que os obtidos na amostra controle. Apesar de esta associação ter aumentado a obtenção de DNA (em um nível de significância de 0,05), a decisão por uma lise celular utilizando-se apenas tampão SDS deve ser ponderada pela redução dos custos, pois esta técnica alcançou quantidades de DNA superiores às necessárias para identificação criminal ( $\geq 1\text{ng}/\mu\text{L}$ ). O emprego de ondas sônicas reduz significativamente o tempo necessário para a extração de DNA de músculo humano.

### **Comparação entre Energia Sônica e Ultra-Sônica na Lise Celular**

O emprego de energia sônica ou ultra-sônica viabiliza a lise do material muscular apenas com água. As ondas sônicas ou ultra-sônicas aumentam significativamente a entropia do sistema, resultando em ruptura de membranas e outras estruturas celulares. Uma variedade de reagentes químicos, como detergentes, agentes redutores e proteinase K são bastante utilizados para a lise celular e liberação do DNA, entretanto, podem interferir no resultado da PCR, o que exige etapas de purificação antes da amplificação. Desde que os inibidores da PCR afetam a sua eficiência, pequenas variações da quantidade de inibidores não retirados podem levar a grandes variações no produto da amplificação.<sup>13</sup> Portanto, o emprego de água pura na etapa de lise celular simplifica o processo de extração de DNA.

As amostras submetidas a ondas ultra-sônicas apenas com água Milli Q demonstraram um melhor comportamento em relação à lise celular do que aquelas submetidas a ondas sônicas, independente do método de purificação utilizado (figura 2). Um equipamento ultra-sônico opera a uma frequência maior do que um equipamento sônico; pode-se deduzir que uma maior quantidade de células é rompida por ondas ultra-sônicas.

As quantidades de DNA obtido pela lise ultra-sônica - seja pela adição do extrato do tecido lisado diretamente para quantificação, seja quando uma purificação com fenol-clorofórmio é realizada - não foram diferentes em um nível de significância de 0,05. Pode-se concluir que a lise celular utilizando apenas água independe de purificação quando energia ultra-sônica é utilizada.

Ao utilizar o equipamento ultra-sônico, um aquecimento da amostra foi observado logo nos primeiros segundos. De acordo com Taylor *et al.* e Chandler *et al.*, o US produz um significativo aumento na temperatura das amostras, entre 50 a 90°K. Este aumento na temperatura, entretanto, é tolerável quando a intenção é a extração de DNA e conseguinte análise em PCR.<sup>4,7</sup>

Devido ao fato de que amostras submetidas ao ultra-som necessitam apenas de água para lise celular e que a sua purificação não é essencial para obtenção de DNA em concentração suficiente para utilização em um perfil genético utilizando STRs, torna-se possível a extração de DNA em amostras de músculos com finalidade de identificação criminal em apenas 2 min.

Ondas sônicas e ultra-sônicas empregadas na extração de DNA de músculo humano resultaram em quantidades suficientes de DNA para identificação humana em ciência forense, entretanto, as quantidades de DNA obtidas para amostras sonicadas em tampão com 2% de SDS e PK ( $252,03 \pm 25,89$ ) resultaram em significativamente maiores que as obtidas das amostras submetidas ao ultra-som utilizando apenas água ( $26,84 \pm 8,73$ ).

## CONCLUSÕES

As ondas sônicas e ultra-sônicas podem ser utilizadas na extração de DNA de amostras de músculos com finalidades de identificação criminal. O emprego de ondas sônicas possibilita a obtenção de uma maior quantidade de DNA em relação ao método orgânico tradicional com considerável redução de custos e tempo de análise, enquanto as ondas ultra-sônicas permitem a obtenção de DNA disponível para análise em apenas dois minutos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Diretor do Instituto de Polícia Científica do estado da Paraíba, Antônio Albuquerque Toscano, pela cessão do espaço físico e equipamentos para realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Castella, V.; Dimo-Simonin, N.; Brandt-Casadevall, C.; Mangin, P.; *Forensic Sci Intern.* **2006**, 156, 70–73.
2. Kuske, C. R.; Banton, K. L.; Adorada, D. L.; Stark, P. C.; Hill, K. K.; Jackson, P.; *J Appl Environ Microbiol*, **1998**, 64, 2463-2472.
3. Moré, M.I.; Herrick, J.B.; Silva, M.C.; Ghiorse, W.C.; Madsen, E. L.; *Appl Environ Microbiol*, **1994**, 60, 1572-1580.
4. Chandler, D. P.; Brown, J.; Bruckner-Lea, C.J.; Olson, L.; Posakony, G.P.; Stults, J.R.; Valentine N.B.; Bond, L.J.; *Anal Chem*, **2001**, 73, 3784-3789.

5. Belgrader, P.; Hansford, D.; Kovacs, G.; Venkateswaran, K.; Mariella, R.; Milanovich, F.; Nasarabadi, S.; Okuzumi, M.; Pourahmadi, F.; Northrup N.; *Anal Chem*, **1999**, 71, 4232-4236.
6. Marentis, T.C.; Kusler, B.; Yaralioglu, G.G.; Liu, S.; Hæggström, E.O.; Khuri-Yakub, B.T.; *Ultrason Med Biol*, **2005**, 31, 9, 1265–1277.
7. Taylor, M.T.; Belgrader, P.; Furman, B.J.; Pourahmadi, F.; Kovacs, G.T.A.; Northrup, M.A.; *Anal Chem*, **2001**, 73, 492-496.
8. Fykse, E. M.; Olsen, J. S.; Skogan, G.; *J Microbiol Method*, **2003**, 55, 1 – 10.
9. Butler, J. M.; *Forensic DNA Typing. Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, Second Edition*, Academic Press: New York, 2005.
10. Kalmár, T.; Bachrati, C. Z.; Marcsik, A.; Raskó, I.; *Nucl Acids Res*, **2000**, 28, 12.
11. Capelo, J.L.; Ximenez-Embun, P.; Madrid-Albarran, Y.; *Anal Chem*, **2004**, 76, 233-237.
12. Roland, N.; Hofreiter, M.; *BioTech*, **2007**, 42, 343-352.
13. Diaco, R.; *Practical considerations for the design of quantitative PCR assays*; Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J., eds.; Academic Press: San Diego, 1995, 84–108.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que:

As ondas sônicas podem ser utilizadas na extração de DNA de amostras de músculos com finalidades de identificação criminal.

A lise de amostras de tecido muscular com emprego de ondas sônicas, para fins de extração de DNA, pode ser feita em apenas dois min.

O tampão contendo SDS para extração é o mais adequado para lise de amostras de tecido muscular com finalidade de extração de DNA, quando se utilizada ondas sônicas;

O emprego de ondas sônicas possibilita a obtenção de uma maior quantidade de DNA em relação ao método orgânico tradicional com considerável redução de custos e tempo de análise.

As ondas ultra-sônicas permitem a obtenção de DNA disponível para análise em apenas dois minutos.

## 6 ANEXOS

Instruções para autores

Revista **Química Nova**

ISSN 0100-4042

### **NORMAS DE PUBLICAÇÃO 2009**

**GERAL** - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

**Artigos Originais** (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Artigos de Revisão** (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de *QN* poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

**Artigos sobre Educação** (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Notas Técnicas** (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou

acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Assuntos Gerais** (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química. etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

**PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS** - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line de QN*. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (\*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*).. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de *QN* junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada

no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

## Referências

### Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

### Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai*

*Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

***Livros:***

*com editor(es):*

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

*sem editor(es):*

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5<sup>th</sup> ed., Wiley: New York, 1988.

***Programas de computação (Softwares):***

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

***Teses:***

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

***Material apresentado em Congressos:***

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

***Páginas Internet:***

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

**Material não publicado:**

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

**SUBMISSÃO DOS ARTIGOS** – A QN oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo .pdf, a partir de arquivo .doc ou .rtf, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

**Material Suplementar** – Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da

revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

**MANUSCRITOS REVISADOS** – Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de três meses ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento .pdf completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de QN.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

**VERSÃO FINAL** – Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato .pdf não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif ou jpg, desde que nas dimensões especificadas pelos

Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão tif/jpg, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: cdr, eps, cdx ou opj. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

*A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.*

### **Copyright ©2009 Sociedade Brasileira de Química**

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.