

CIRCULAR TÉCNICA

n. 440 - março 2026

ISSN 0103-4413

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Departamento de Informação Tecnológica
Av. José Cândido da Silveira, 1647 - União - 31170-495
Belo Horizonte - MG - www.epamig.br - Tel. (31) 3489-5000



AGRICULTURA,
PECUÁRIA E
ABASTECIMENTO



GOVERNO
DE MINAS

AQUI O TREM PROSPERA.

Protocolo otimizado para a extração do DNA de cacau com o uso de disruptor de células¹

Luciana Cardoso Nogueira Londe², Joyce Costa Ribeiro³, Kennia Karolline Gonçalves Pereira⁴, Ely Caroliny Dias Soares⁵, Bruna Rafaella Alves da Silva⁶, Gabriela Cristina Alves Custódio⁷, Ana Flavia Nascimento Ribeiro⁸, Samy Pimenta⁹

INTRODUÇÃO

No processo de caracterização genética de espécies vegetais, a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) de alta qualidade é etapa fundamental, servindo como base para a aplicação de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia de Polimerase – polymerase chain reaction (PCR) e a genotipagem apoiada em marcadores moleculares (Azevedo, 2019). Qualquer problema nesta fase pode comprometer as etapas subsequentes, resultando em falhas na amplificação de DNA, erros na análise de fragmentos ou na identificação incorreta de variantes genéticas (Rosenbaum *et al.*, 2019).

O sucesso da extração depende de diversos fatores, incluindo a escolha do protocolo mais adequado para o tipo de tecido e espécie, o estágio de desenvolvimento do material vegetal e o manejo criterioso de utensílios e reagentes para evitar conta-

minações. No caso do cacau (*Theobroma cacao*), a presença de polifenóis, taninos e polissacarídeos representa um desafio significativo. Esses compostos, abundantes nas folhas e sementes, podem-se oxidar rapidamente e ligar-se ao DNA, dificultando a purificação e prejudicando a integridade do material genético (Henao Ramírez; Salazar Duque; Urrea Trujillo, 2018).

Para superar essas limitações, o uso de disruptores de células tem sido recomendado, pois promove a quebra física eficiente do tecido vegetal, favorecendo a liberação do DNA e minimizando a ação de contaminantes que comprometem sua qualidade (Carey *et al.*, 2023).

Neste contexto, esta Circular Técnica apresenta um protocolo otimizado para a extração do DNA de genótipos de cacau oriundos de um programa de melhoramento genético da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), utilizando disruptores de

¹Circular Técnica produzida pela EPAMIG Norte - CEGR, (38) 2040-0053, cegr@epamig.br.

²Bióloga, D.Sc., Pesq. EPAMIG Norte - CEGR/Bolsista BIPDT-A FAPEMIG, Nova Porteirinha, MG, luciana@epamig.br.

³Bióloga, Doutoranda Produção Vegetal no Semiárido UNIMONTES, Campus Janaúba, Bolsista CAPES, joycecosta85@hotmail.com.

⁴Engenheira-agrônoma, Doutoranda Produção Vegetal no Semiárido UNIMONTES, Campus Janaúba, Janaúba, MG, kenniaagro@gmail.com.

⁵Graduanda Zootecnia UNIMONTES, Campus Janaúba, Bolsista FAPEMIG/CNPq//UNIMONTES, Janaúba, MG, carolinydias0304@gmail.com.

⁶Engenheira-agrônoma, Mestranda Produção Vegetal no Semiárido UNIMONTES, Campus Janaúba, Bolsista FAPEMIG/UNIMONTES, Janaúba, MG, brunarafaellaagro@gmail.com.

⁷Engenheira-agrônoma, D.Sc., Pesq. UNIMONTES/GEPEFT, Bolsista CAPES, Janaúba, MG, gabrielac.agro@gmail.com.

⁸Graduanda Zootecnia UFMG, Campus Montes Claros, Montes Claros, MG, anaflavianr03@icloud.com.

⁹Engenheiro-agrônomo, D.Sc., Prof. UNIMONTES, Bolsista BIPDT-A FAPEMIG, Campus Janaúba, Janaúba, MG, samy.pimenta@unimontes.br.

células. São descritas as etapas de coleta e preparo das amostras, extração, purificação e análise da qualidade do DNA, com recomendações para reduzir a contaminação por compostos secundários e assegurar alto rendimento e pureza.

USO DO DISRUPTOR DE CÉLULAS NO PREPARO DE AMOSTRAS

De acordo com a Loccus[®] (2025), o disruptor celular mecânico utiliza microesferas (*beads*) escolhidas especificamente para o tipo de amostra. A intensidade da agitação provoca perturbações celulares, por meio do impacto constante de alta velocidade. Esse procedimento é útil para homogeneização, res-suspensão, maceração, disrupção e até para extração do DNA de diversos tipos de tecidos e células. É altamente eficaz para amostras difíceis de serem homogeneizadas em agitadores comuns. O disruptor de células realiza tanto a homogeneização quanto a disrupção simultânea de até 24 amostras em microtubos descartáveis de 2 mL (Fig. 1).

Figura 1 - Folha jovem de cacau (*Theobroma cacao*) em solução de lise no disruptor de células



Joyce Costa Ribeiro

No processo de extração do DNA vegetal, o uso de materiais descartáveis, como microtubos e ponteiros de micropipetas, garante a qualidade e a integridade das amostras. Fabricados em polipropileno, esses itens são inertes e evitam contaminações químicas e biológicas. O uso de materiais descartáveis é prática padrão em procedimentos moleculares, pois minimiza o risco de contaminação por DNA exógeno ou nucleases, o que pode comprometer as análises subsequentes, como a PCR (Wu *et al.*, 2018). Os microtubos são utilizados para macerar o

tecido vegetal e centrifugar as amostras, enquanto ponteiros descartáveis asseguram a precisão na manipulação dos reagentes.

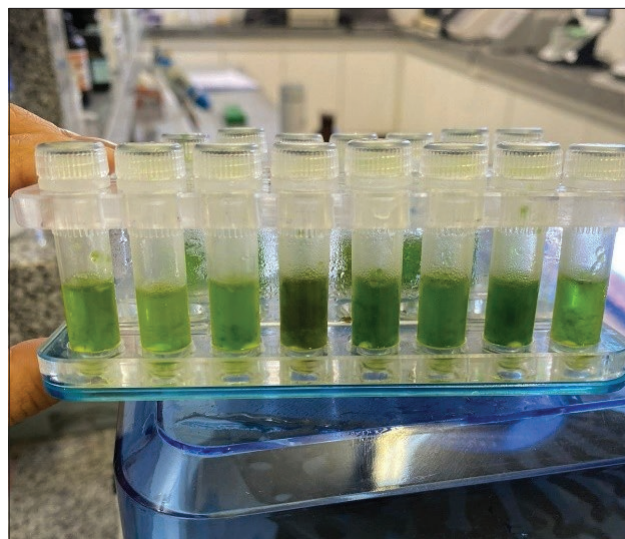
ETAPAS DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA vegetal envolve várias etapas, cada uma com reagentes específicos para garantir a obtenção de DNA de alta qualidade para análises moleculares. Cada uma dessas etapas é importante para assegurar a pureza, a concentração e a estabilidade do DNA extraído, mantendo sua qualidade para os próximos procedimentos moleculares (Splabor, 2024).

Lise celular

Nesta primeira etapa, o tecido vegetal é rompido mecanicamente (com disruptores) e quimicamente (com tampões como o brometo de cetiltrimetilamônio – cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)). O objetivo é liberar o conteúdo celular, incluindo o DNA, enquanto se protege a amostra de nucleases (Fig. 2). Uma lise eficiente é fundamental para garantir que todo o material genético seja acessado sem degradação.

Figura 2 - Solução contendo amostras de cacau (*Theobroma cacao*) após a lise celular

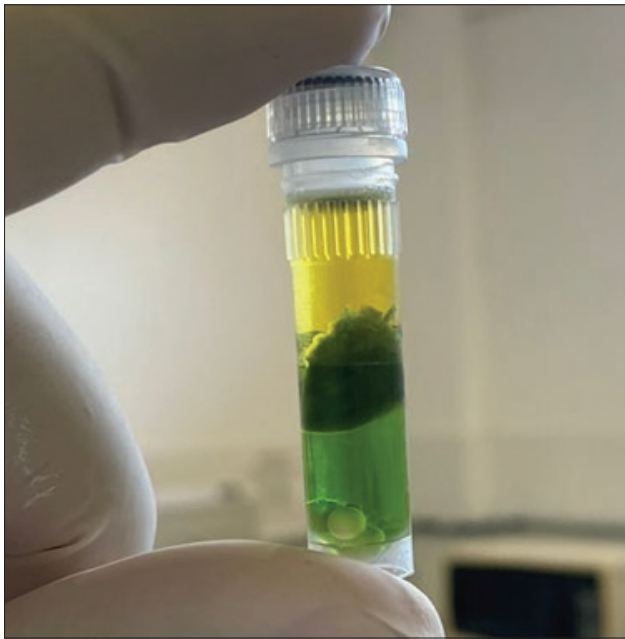


Joyce Costa Ribeiro

Remoção de contaminantes

Após a lise, adiciona-se ao microtubo a solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para purificação do DNA e para separar proteínas, lipídios e outras impurezas da fase aquosa, onde o DNA fica dissolvido. Essa separação é essencial para garantir que o DNA esteja livre de contaminantes que poderiam interferir em análises posteriores, como a PCR (Fig. 3).

Figura 3 - Solução centrifugada de amostras de cacau (*Theobroma cacao*) após a adição da solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1)



Joyce Costa Ribeiro

Precipitação do DNA

O DNA é precipitado com etanol absoluto ou isopropanol gelado (armazenado em ultrafreezer a -80 °C), o que permite sua visualização e separação (Fig. 4). A adição de etanol faz com que o DNA se agregue, facilitando sua recuperação por centrifugação. Este passo é importante para concentrar o DNA em um volume menor, pronto para análise.

Figura 4 - Solução com DNA precipitado após a adição de isopropanol gelado



Joyce Costa Ribeiro

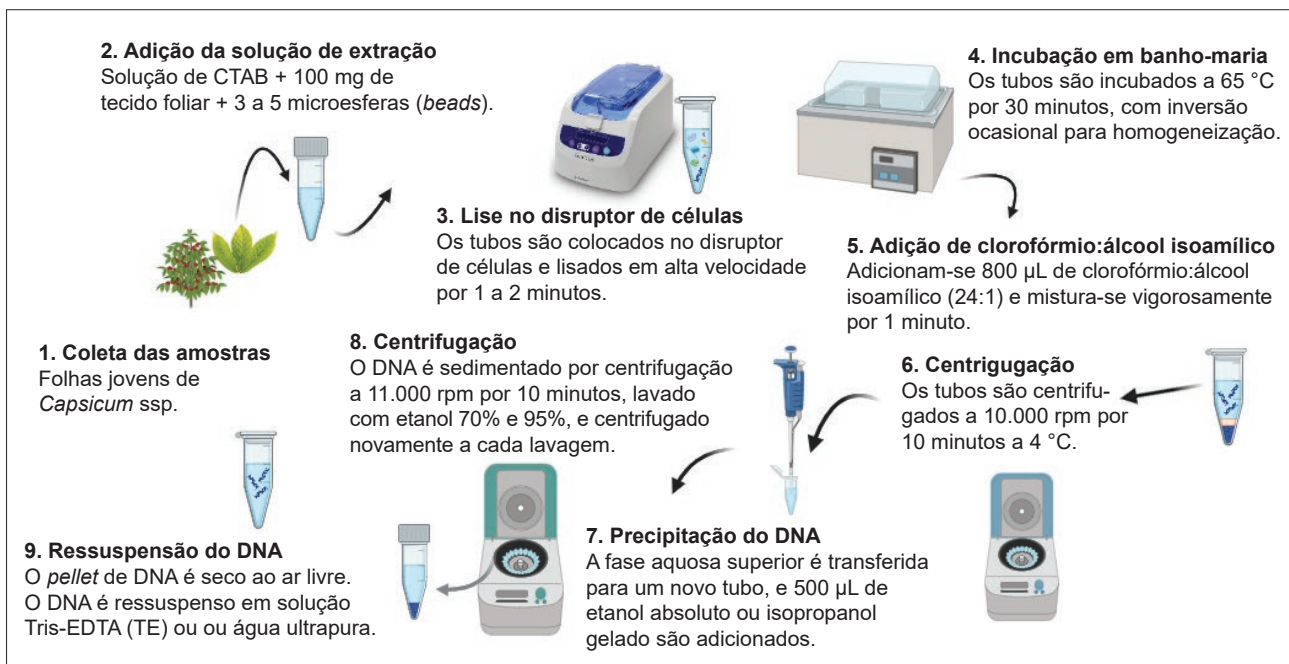
Purificação, lavagem e ressuspensão do DNA

O DNA precipitado é purificado com etanol 70% e 95% para remoção de sais e impurezas residuais, garantindo sua pureza para procedimentos como PCR e sequenciamento. Após a secagem do precipitado, o DNA é ressuspensão em solução tampão (geralmente Tris-EDTA (TE) ou água ultrapura, fundamental para armazenar o DNA em solução estável e preservar sua integridade para análises futuras.

PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO DO DNA

A preparação das amostras de espécies de cacau inicia-se com a coleta de folhas jovens (Fig. 5),

Figura 5 - Representação esquemática das etapas do processo de extração do DNA de cacau (*Theobroma cacao*)



Fonte: Elaboração da autora Joyce Costa Ribeiro.

Nota: CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio; TE - Tris-EDTA; EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético; DNA - ácido desoxirribonucleico; Rpm - Rotação por minuto; µL - Microlitro.

que devem ser armazenadas sob refrigeração ou congelamento para evitar a degradação do DNA (Doyle; Doyle, 1987). Alternativamente, amostras armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) também podem ser utilizadas nesse processo.

Para a ruptura física das células, 100 mg de tecido foliar congelado são colocados em microtubos de 2 mL, com adição de 3 a 5 esferas de zircônio (esferas de 3,0 mm são indicadas para a lise de células e a maceração de tecidos duros de animais e de vegetais). Em seguida, adicionam-se 700 µL de solução de extração CTAB. Os tubos são colocados no disruptor de células e tecidos L-Beater 24[®] (Loccus, 2025), onde o tecido é triturado em alta velocidade por 1 a 2 minutos, ou conforme indicado pelo fabricante, até que seja completamente pulverizado. Os tubos são incubados em banho-maria a 65 °C por 30 minutos, com inversão ocasional para homogeneização.

Após esse tempo, 800 µL da solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) são adicionados, e a mistura é agitada vigorosamente por 1 minuto. Os microtubos são então centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Para a purificação do DNA, a fase aquosa superior (contendo o DNA) é cuidadosamente transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, ao qual são adicionados 500 µL de etanol absoluto ou isopropanol gelado para precipitar o DNA. O DNA é sedimentado por centrifugação a 11.000 rpm por 10 minutos, lavado com etanol 70% e, posteriormente, com etanol 95%, sendo novamente centrifugado. O precipitado é seco ao ar livre (em temperatura ambiente) e ressuspenso em 50-100 µL de solução TE ou água ultrapura.

INTEGRIDADE DO DNA EXTRAÍDO

De acordo com a Thermo Fisher Scientific (2022) a análise da integridade e pureza do DNA extraído é frequentemente realizada por meio de espectrofotometria, utilizando instrumentos como o NanoDrop[®]. Esse método baseia-se na medição da absorbância do DNA em comprimentos de onda específicos, 260 e 280 nm. O DNA puro absorve luz a 260 nm por causa da presença de nucleotídeos, enquanto proteínas e outros contaminantes, como fenol, absorvem a 280 nm. A relação entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (260/280) é usada para avaliar a pureza da amostra. Valores entre 1,8 (aceito como DNA

“puro”) e 2,0 (aceito como RNA “puro”) podem indicar que o DNA está livre de contaminação proteica ou de solventes, sugerindo que o DNA extraído é adequado para análises moleculares subsequentes, como PCR e genotipagem (Datamed, 2019).

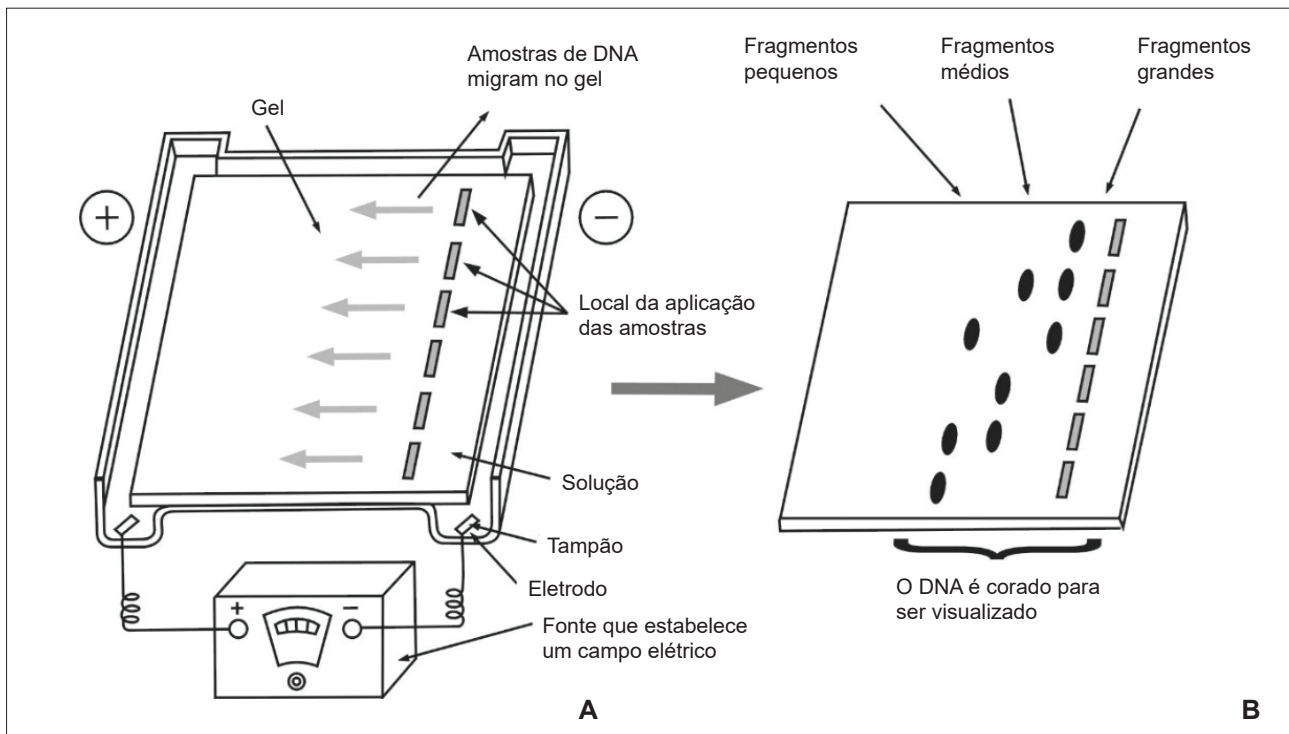
Alternativamente, a relação 260 e 230 nm (260/230), que normalmente deve ser próxima de 2,0 é utilizada para avaliar a presença de contaminantes orgânicos e sais que podem interferir nas reações enzimáticas. De acordo com Passaglia e Zaha (2014), o NanoDrop[®] é amplamente utilizado pela precisão e pela pequena quantidade de amostra necessária (cerca de 1-2 µL), proporcionando uma análise rápida e eficiente. O controle adequado dessas relações de pureza é essencial para garantir que o DNA possa ser utilizado de maneira eficiente em experimentos moleculares sem comprometer os resultados.

QUALIDADE DO DNA POR ELETROFORESE

De acordo com Acquaad (1992), a eletroforese é uma técnica bioquímica versátil, rápida e de grande poder informativo, inicialmente realizada em meio líquido e aperfeiçoada ao longo das décadas. Nos anos de 1950, experimentos de Smithies em 1955 e de Hunter e Market em 1957 usando a técnica de eletroforese contribuíram para sua evolução, tornando-a essencial em biologia molecular (Brammer, 2001; Oliveira *et al.*, 2015). A técnica é amplamente aplicada na análise de enzimas, proteínas e ácidos nucleicos, sendo útil em estudos de genética, taxonomia, fisiologia e identificação de organismos. Recentemente tem sido usada na caracterização de moléculas de DNA e ácido ribonucleico (RNA), auxiliando no mapeamento e sequenciamento de nucleotídeos (Fig. 6).

A eletroforese envolve a migração de moléculas ionizadas em campo elétrico, conforme suas cargas e pesos moleculares (Fig. 6). De acordo com McPherson (2011), as moléculas com carga negativa movem-se para o ânodo (positivo), enquanto as de carga positiva vão para o cátodo (negativo). A carga líquida das moléculas depende dos aminoácidos que as compõem. Como as proteínas são anfóteras, podendo adquirir cargas positivas ou negativas conforme o pH, é essencial manter o pH constante durante o processo, o que é garantido pelo uso de soluções-tampão (Brammer, 2001; Leal *et al.*, 2019).

Figura 6 - Representação esquemática de um processo de eletroforese



Fonte: Bordoni (2011).

Nota: A - Sistema de eletroforese com aplicação das amostras e migração do DNA no gel sob campo elétrico; B - Separação dos fragmentos de DNA por tamanho após a corrida eletroforética.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração do DNA de alta qualidade é essencial para análises moleculares aplicadas ao melhoramento genético do *Theobroma cacao*, especialmente diante dos desafios impostos por compostos como polifenóis e polissacarídeos. O uso de disruptores mecânicos de células, aliado a um protocolo otimizado de extração, purificação e avaliação da qualidade, demonstrou eficiência na obtenção de amostras puras e íntegras, adequadas para PCR, genotipagem e sequenciamento. A aplicação deste método em programas de melhoramento, como o da Unimontes, fortalece a caracterização genética, auxilia na seleção assistida por marcadores e contribui para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e resistentes.

REFERÊNCIAS

- ACQUAAD, G. **Practical protein electrophoresis for genetic research**. Portland: Discorides Press, 1992. 131p.
- AZEVEDO, C.D. de O. **Microsatélites como ferramentas moleculares para assegurar a propriedade intelectual e direitos patrimoniais advindos de programas de melhoramento de *Capsicum annuum* L.** 2019. 96f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) –

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2019. Disponível em: <https://uenf.br/posgraduacao/gmp/wp-content/uploads/sites/6/2020/05/Tese-DS-CARLOS-DIEGO-DE-OLIVEIRA-AZEVEDO-assinada.pdf>. Acesso em: 26 mar. 2026.

BORDONI, E. **Aparelho de eletroforese e o resultado do fracionamento dos fragmentos de DNA**. [Rio de Janeiro]: Fundação CECIERJ, 2011. Figura ilustrativa. Disponível em: <https://canal.cecierj.edu.br/recurso/8307>. Acesso em: 6 out. 2024.

BRAMMER, S.P. **A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. [8p.]. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 6). Disponível: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm. Acesso em: 1 out. 2024.

CAREY, S.J. *et al.* Optimizing the lysis step in CTAB DNA extractions of silica-dried and herbarium leaf tissues. **Applications in Plant Sciences**, v.11, n.3, e11522, May-June 2023.

DATAMED. **Quantificação fotométrica e análise crítica da extração!** Belo Horizonte, 20 mar. 2019. Disponível em: <https://datamedweb.com.br/quantificacao-fotometrica-e-analise-critica-da-extracao/>. Acesso em: 3 jul. 2025.

- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, n.1, p.11-15, 1987.
- HENAO RAMÍREZ, A.M.; SALAZAR DUQUE, H.J.; URREA TRUJILLO, A.I. Quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) DNA from foliar tissue at different stages of development. **Acta Agronómica**, v.67, n.2, p.311-318, 2018. Disponível em: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/63046. Acesso em: 19 ago. 2025.
- LEAL, V.L. *et al.* (org.). **Protocolos e técnicas laboratoriais de rotina**: aplicações em biologia molecular, microbiologia, cultivo celular e farmacognosia. Santa Cruz do Sul: UNISC, 2019. 224p.
- LOCCUS. **Disruptor de células e tecidos - L-Beader 24**: descrição. São Paulo: Loccus do Brasil Ltda, 2025. Disponível em: <https://www.loccus.com.br/disruptor-l-beader-24/>. Acesso em: 3 ago. 2025.
- MCPHERSON, R.A. Specific proteins. *In*: MCPHERSON, R.A.; PINCUS, M.R. **Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 22nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011. pt.2: Clinical chemistry, cap.20, p.259-272.
- OLIVEIRA, E. de *et al.* Eletroforese: conceitos e aplicações. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.11, n.22, p.1129-1149, 2015.
- PASSAGLIA, L.M.P.; ZAHA, A. Técnicas de biologia molecular. *In*: ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. (org.). **Biologia molecular básica**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. cap.16, p.331-362.
- ROSENBAUM, J. *et al.* Evaluation of oral cavity DNA extraction methods on bacterial and fungal microbiota. **Scientific Reports**, v.9, n.1, Feb. 2019. Article 1531.
- SPLABOR. **Desafios e soluções na extração de DNA eficaz**. [Presidente Prudente], 6 mar. 2024. Disponível em: <https://www.splabor.com.br/blog/equipamentos-para-laboratorio/desafios-e-solucoes-na-extracao-de-dna-eficaz>. Acesso em: 3 out. 2024.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Nucleic acid quantification**: easy choices for RNA and DNA quantification. [Waltham]: Thermo Fisher Scientific Inc., 2022. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-quantitation.html>. Acesso em: 1 ago 2025.
- WU, Y. *et al.* DNA decontamination methods for internal quality management in clinical PCR laboratories. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.32, n.3, e22290, 2018.

Os nomes comerciais apresentados nesta Circular Técnica são citados apenas para conveniência do leitor, não havendo por parte da EPAMIG preferência por este ou aquele produto comercial.

Disponível em: <http://www.livrariaepamig.com.br/difusao-de-tecnologia/>
Departamento de Informação Tecnológica