



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE UnB PLANALTINA

CAMILA VITORIA REZENDE SERRANO

**EXTRAÇÃO DE DNA EM PLANTAS DO CERRADO:  
UMA REVISÃO INTEGRATIVA**

Brasília, DF

2023

CAMILA VITORIA REZENDE SERRANO

**EXTRAÇÃO DE DNA EM PLANTAS DO CERRADO:  
UMA REVISÃO INTEGRATIVA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora, como exigência parcial para a obtenção de título de Licenciado do Curso de Ciências Naturais, da Faculdade UnB Planaltina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Erina Vitório Rodrigues

Brasília, DF

2023

**EXTRAÇÃO DE DNA EM PLANTAS DO CERRADO:  
UMA REVISÃO INTEGRATIVA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora, como exigência parcial para a obtenção de título de Licenciado do Curso de Ciências Naturais, da Faculdade UnB Planaltina.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Luiz Fabricio Zara

---

Prof. Dr. Franco de Salles Porto

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Erina Vitório Rodrigues  
Orientadora

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho às mulheres da minha família materna que, apesar dos pesares, sofreram muito para tentar alcançar um lugar de reconhecimento na sociedade e que, na minha geração, só foi possível após muitos anos de estudo.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Universo por todas as oportunidades que me trouxeram até aqui e ao Destino por ter me guiado e me livrado de males piores.

Agradeço pelo apoio incondicional da minha família, em especial à minha irmã Priscila Vitória por sempre me acolher sem julgamentos, ao meu namorado Tainan Augusto por sempre ser companheiro em tudo, ao meu cunhado Alife pela amizade e boa convivência e aos meus companheiros de vida Zeus, Atena e Tutuca.

Agradeço ao F.E.F. (*in memoriam*) e à sua família, em especial Sandra Maria, Lindval e Marco Antônio, por terem me acolhido em seu lar durante parte da minha graduação e por me incentivarem a não desistir do ensino superior.

Agradeço ao Departamento da FUP - Faculdade UnB Planaltina pelos auxílios financeiros e profissionais acolhedores, que me ajudaram nos momentos mais difíceis da vida de um estudante.

Agradeço aos meus amigos pela companhia, em especial à Déborah e à sua família pelo acolhimento em um momento difícil no início do meu curso, à Maitê pelas conversas, passeios e por me acompanhar a tantos anos mesmo à distância, à Lisis Jânala pela amizade de longa data e por compartilhar muitos problemas em comum, à Isabela por ter acompanhado de perto minha vida pessoal e acadêmica, ao Alex Gabriel pelos momentos de descontração e ajuda ao longo do curso, à Eloisa por ter me auxiliado nos últimos estágios, à Sthefanie pela mútua motivação de concluir a graduação, ao Matheus pelo apoio emocional e espiritual, ao Marcus Victor pelos momentos de entretenimento, à Letícia pela amizade e jornada em comum, ao Marco Túlio pela amizade de longa data e boa vizinhança com a Ana Clara, que também me ajudou muito com o trabalho.

Agradeço à minha orientadora Erina por me aceitar como orientanda quando nenhum outro professor pôde e por me ensinar muitas lições de vida.

Por fim, agradeço à minha mãe Jussara pela minha criação e educação até o meu ingresso no ensino superior e ao meu pai João pela contribuição financeira até o final do meu curso.

## EPÍGRAFE

*“Às vezes você desperta  
o dom de tudo que é mais belo  
sem poder explicar  
que a beleza está na terra,  
no ar,  
e até mesmo na gente!*

*A beleza não está no rosto,  
e sim, no coração das pessoas.*

*Quando em uma pessoa  
desperta o dom da sabedoria,  
seus olhos brilham...”*

*(Petruz Rezende, in memoriam)*

## RESUMO

O estudo das técnicas de extração de DNA em plantas tem bastante relevância para pesquisas na área das ciências naturais, principalmente em relação ao melhoramento genético, fragmentação de habitats e produção de fármacos, pois busca otimizar a eficiência dos protocolos mais utilizados em laboratório atualmente, a fim de melhorar as análises de DNA e conhecer mais sobre as propriedades fitoquímicas das plantas. Assim, considerando as espécies vegetais do Cerrado como objeto desse estudo, sabe-se que elas têm particularidades relacionadas aos mecanismos evolutivos de adaptação e que, em geral, ainda há grande variação nos resultados de extração de DNA vegetal com os protocolos existentes. Por isso, alguns protocolos podem apresentar falhas nessas espécies, devido à presença de metabólitos secundários e à maioria deles ainda utilizar reagentes de métodos antigos, que são caros, tóxicos e podem contaminar as amostras de material genético, atrasando a pesquisa e inviabilizando as análises por impactar negativamente na quantidade e qualidade de material genético extraído, necessitando, assim, de mais testes para otimização para protocolos que envolvam plantas do Cerrado. Portanto, conclui-se que estudos prévios de revisão bibliográfica tem importância fundamental para o sucesso de trabalhos científicos, a fim de evitar informações ultrapassadas que podem prejudicar a pesquisa. Assim, devido ao baixo volume de trabalhos encontrados na base de dados do *Web of Science*, recomenda-se que pesquisas relacionadas ao Cerrado brasileiro utilizem bancos de dados que buscam resultados no idioma português brasileiro, por se tratar de um tema intrínseco do Brasil e a maioria dos trabalhos serem publicados na língua do país. Por fim, dentre os protocolos revisados, os protocolos de Souza et al. (2012), Cansanção e Coutinho (2013) e Souza (2019) foram os mais otimizados e viáveis para extração de DNA em plantas do Cerrado.

**Palavras-chave:** Metabólitos secundários. Plantas nativas. Otimização de protocolos.

## ABSTRACT

The study of DNA extraction techniques in plants is very relevant for research in the area of natural sciences, especially in relation to genetic improvement, habitat fragmentation and drug production, as it seeks to optimize the efficiency of the protocols most used in the laboratory today, in order to improve DNA analysis and learn more about the phytochemical properties of plants. Thus, considering the plant species of the Cerrado as the object of this study, it is known that they have particularities related to the evolutionary mechanisms of adaptation and that, in general, there is still great variation in the results of extracting plant DNA with the existing protocols. Therefore, some protocols may present flaws in these species, due to the presence of secondary metabolites and most of them still use reagents from old methods, which are expensive, toxic and can contaminate samples of genetic material, delaying research and making analyzes unfeasible by negatively impacting the quantity and quality of extracted genetic material, thus requiring further tests for optimization for protocols involving Cerrado plants. Therefore, it is concluded that previous studies of bibliographic review are of fundamental importance for the success of scientific works, in order to avoid outdated information that may harm the research. Thus, due to the low volume of works found in the Web of Science database, it is recommended that research related to the Brazilian Cerrado use databases that seek results in the Brazilian Portuguese language, as it is an intrinsic theme of Brazil and most of the works are published in the language of the country. Finally, among the reviewed protocols, the protocols by Souza et al. (2012), Cansanção and Coutinho (2013) and Souza (2019) were the most optimized and viable for DNA extraction in Cerrado plants.

**Keywords:** Secondary metabolites. Native plants. Protocol optimization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Limites do Bioma Cerrado no Brasil.....	13
<b>Figura 2</b> – Fitofisionomias do bioma Cerrado.....	14
<b>Figura 3</b> – Imagens de tecido foliar (epiderme) mostrando estômatos (A), tricomas (B) e presença de compostos fenólicos (C). Escala = 20 µm.....	15
<b>Figura 4</b> – Rede de palavras-chaves presentes nos artigos encontrados.....	20
<b>Figura 5</b> – Rede de palavras-chaves presentes nos artigos selecionados.....	21
<b>Figura 6</b> – Rede de coautores presentes nos artigos selecionados.....	21

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Solventes mais utilizados para extração de metabólitos secundários.....	16
<b>Tabela 2</b> – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas dos protocolos de extração de DNA estudados.....	17
<b>Tabela 3</b> – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Faleiro et al. (2003).....	23
<b>Tabela 4</b> – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Silva (2010).....	24
<b>Tabela 5</b> – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Moreira e Oliveira (2011).....	25
<b>Tabela 6</b> – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Queiroz (2011).....	25
<b>Tabela 7</b> – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Souza et al. (2012).....	26
<b>Tabela 8</b> – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Cansanção e Coutinho (2013).....	27
<b>Tabela 9</b> – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Nascimento et al. (2017).....	28
<b>Tabela 10</b> – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Almeida et al. (2017).....	29
<b>Tabela 11</b> – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Souza (2019).....	29

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
1.1. Diversidade vegetal do Cerrado.....	13
1.1.1. Características morfofisiológicas de plantas do Cerrado.....	14
1.1.2. Composição fitoquímica de extratos foliares .....	15
1.2. Protocolos de extração e purificação de DNA.....	16
3. METODOLOGIA .....	19
3.1 Estratégia de busca.....	19
3.2 Análise de dados .....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	31
REFERÊNCIAS.....	32

## 1. INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro é considerado uma das savanas mais biodiversas em flora, característica resultante de fatores adaptativos relacionados ao tempo, ao solo e ao fogo, que influenciaram para a sua extensa distribuição e suas diferentes fitofisionomias (KLINK e MACHADO, 2005; SILVA et al., 2006). As folhas do Cerrado apresentam adaptações ao xeromorfismo, com a presença de cutícula espessa, pilosidades, estômatos abaxiais e acúmulo foliar de alumínio, o que contribui para amenizar a desidratação por osmose, em contato com a atmosfera (SCARIOT et al., 2005). No entanto, o Cerrado vem sofrendo constantes modificações, por eventos naturais, como o fogo, ou por ações antrópicas, como o uso do solo para a agricultura, que levam a fragmentação de habitats e por consequência a perda de diversidade genética. (GAMARRA et al., 2021). Assim, é importante conhecer a diversidade genética do ambiente para nortear programas de conservação da biodiversidade vegetal.

Para avaliação da diversidade genética, são aferidas características morfológicas e moleculares, sendo essa última com base no DNA (*Deoxyribonucleic acid*). Contudo, o processo de extração do DNA deve seguir um método rigoroso e preciso para que seja garantida a qualidade do material. Porém, para extrair DNA vegetal a partir de tecido foliar em plantas do Cerrado, muitos empecilhos são encontrados, decorrentes principalmente dos mecanismos intrínsecos aos componentes celulares das plantas. Um exemplo disso é a presença de compostos fenólicos nas folhas, como fenóis, tanino e flavonoides, que comprometem a quantidade e qualidade do DNA (SILVA, 2010).

A técnica de extração de DNA vegetal é utilizada para diferentes estudos genéticos. Por isso, há uma variedade de protocolos, que podem variar de acordo com o tipo de material. Alguns protocolos podem não funcionar para determinados tipos de planta, e quando utilizados podem inviabilizar os estudos (SILVA, 2010). Além disso, certos métodos são caros, demorados, utilizam reagentes tóxicos e podem apresentar contaminação (SOUZA, 2019). Portanto, avanços nessa área podem facilitar a adequação dos protocolos para que sejam atendidas as especificidades de cada material vegetal.

Considerando a importância de estudos de diversidade genética seja para conservação genética e/ou para o melhoramento de plantas e ainda as dificuldades

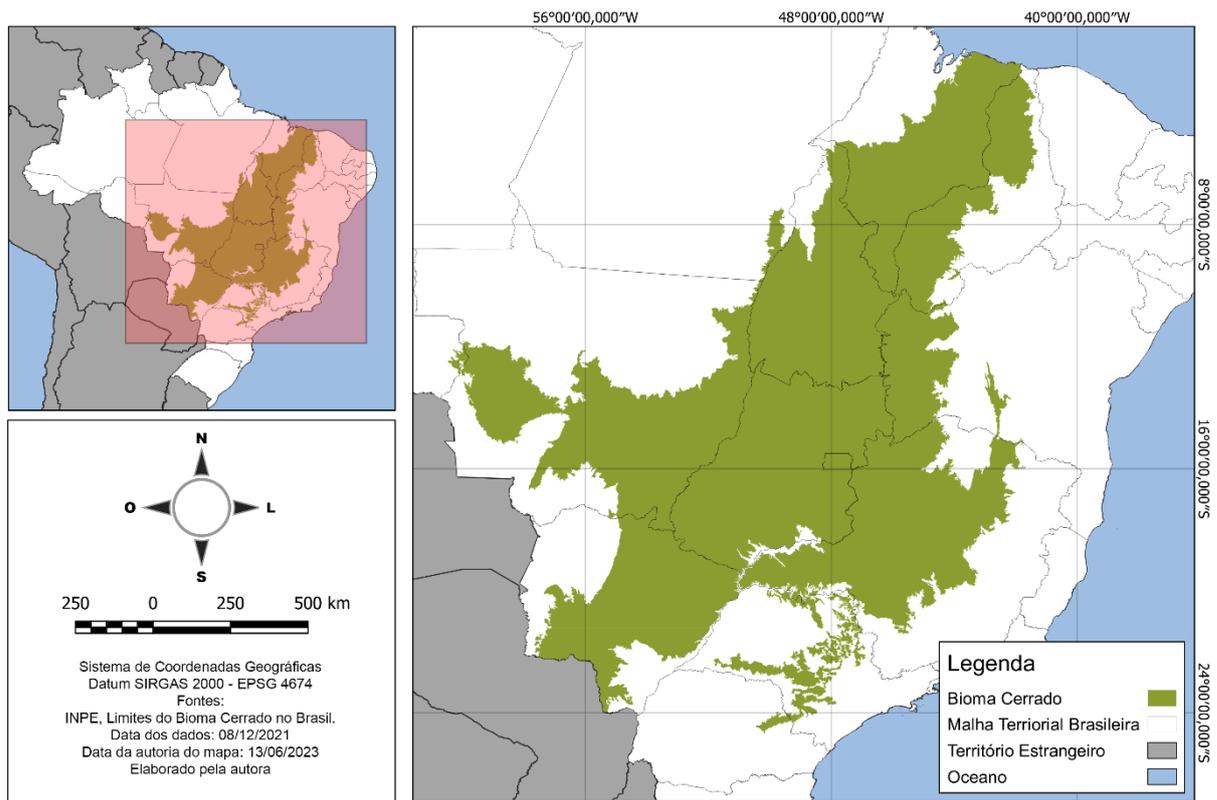
inerentes ao processo de extração de DNA, é fundamental investigar os protocolos de extração de DNA existentes, bem como possíveis ajustes a fim de otimizar esse processo. Por isso, neste estudo fizemos uma revisão integrativa a fim de investigar os principais protocolos de extração e purificação de DNA em plantas do Cerrado, para fazer um levantamento geral dos materiais e métodos mais utilizados e encontrar lacunas de pesquisa envolvendo otimizações necessárias para os protocolos de acordo com a especificidade das plantas. Esse é um trabalho piloto para, em breve, iniciarmos um estudo sobre diversidade genética de plantas do Cerrado. Assim, é importante conhecer os métodos utilizados para facilitar o desenvolvimento da atividade supracitada.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1. Diversidade vegetal do Cerrado

O Cerrado é um dos principais biomas brasileiros, sendo o segundo maior em extensão, abrangendo cerca de 24% do território nacional com aproximadamente 2 milhões de km<sup>2</sup> (Figura 1) (RIBEIRO e RODRIGUES, 2006; INPE, 2021). É caracterizado pelo clima predominantemente chuvoso e tropical, com duas estações bem definidas, seca de abril a setembro e chuva de outubro a maio (KLINK e MACHADO, 2005; KLINK et al., 2020). Apesar de ser considerado um ambiente savânico árido, o Cerrado apresenta grande diversidade de plantas, sendo considerado um dos *hotspots* de biodiversidade mais importantes do mundo (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2011).

**Figura 1** – Limites do Bioma Cerrado no Brasil.



Estima-se que existem cerca de 12 mil espécies de plantas nativas no Cerrado, sendo aproximadamente 4.400 espécies endêmicas, ou seja, exclusivas nesse bioma (MENDONÇA et al., 1998). Essa rica diversidade vegetal é resultado da adaptação das plantas às condições climáticas adversas do Cerrado (EMBRAPA, 2023). Além disso, são descritos 11 tipos de vegetação do Cerrado, compostas por formações

florestais, savânicas e campestres, totalizando 25 fitofisionomias (Figura 2) (RIBEIRO, 1998).

**Figura 2** – Fitofisionomias do bioma Cerrado.



Fonte: Adaptado do Site da Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/cerrados/colecao-entomologica/bioma-cerrado>> Acesso em: 18 de Junho de 2023.

#### 1.1.1. Características morfofisiológicas de plantas do Cerrado

As espécies endêmicas possuem um potencial econômico muito importante, por serem fontes de alimentos, medicamentos e outros produtos de interesse humano, sendo, portanto, essencial a preservação dessas espécies para a manutenção da biodiversidade do Cerrado e para o desenvolvimento sustentável da região (SANO et al., 2010). As plantas nativas do Cerrado possuem características morfofisiológicas peculiares, como resistência à seca, tolerância a solos pobres em nutrientes e capacidade de rebrotar após incêndios, o que permite sua sobrevivência em condições adversas extremas e sua atuação na conservação do bioma (SCARIOT et al., 2005; KLINK et al., 2020).

Outra característica comum da vegetação do Cerrado é a adaptação reprodutiva com a produção de sementes resistentes ao fogo e formação de bancos de sementes que garantem a sobrevivência das espécies após incêndios (SANO et al., 2008). Além disso, muitas espécies, principalmente as subarbustivas, apresentam adaptações evolutivas como raízes profundas e ajustamento osmótico intracelular, que permitem a absorção de água mesmo em períodos de seca intensa (GIROLDO, 2016; FURQUIM et al., 2018).

Em seu estudo, Sakita (2013) verificou que as folhas de algumas espécies nativas do Cerrado são cobertas por tricomas, estômatos, cutículas espessas, compostos fenólicos e cristais (Figura 3). Essas adaptações fisiológicas servem para

reduzir a perda de água por transpiração e são essenciais para a sobrevivência em um ambiente com uma estação seca prolongada e alta taxa de evapotranspiração (KLINK et al., 2020).

**Figura 3** – Imagens de tecido foliar (epiderme) mostrando estômatos (A), tricomas (B) e presença de compostos fenólicos (C). Escala = 20 µm.



Fonte: Sakita, 2013.

#### 1.1.2. Composição fitoquímica de extratos foliares

No estudo de Bessa et al. (2013), os autores investigaram a presença de metabólitos secundários como em extratos foliares de nove espécies de plantas medicinais nativas do Cerrado, os compostos mais encontrados foram fenóis e taninos, alcalóides e flavonóides. Apesar desses metabólitos secundários apresentarem valor comercial e biológico, pela sua ampla distribuição e por inúmeras funções ecológicas e farmacológicas comprovadas (NETO et al., 2015), eles podem interferir na qualidade do DNA, comprometendo a eficiência das análises (VIANA; BURIN; DIEHL, 2021).

Assim, corroborando as afirmações anteriores, em uma prospecção fitoquímica, Filho e Castro (2019), detectaram ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcaloides, antraquinonas, catequinas, cumarinas, depsídeos e depsídonas, fenóis simples, flavonoides, glicosídeos cardiotônicos, saponinas espumídicas e taninos em seis espécies vegetais do Cerrado, mas não houve detecção qualitativa dos compostos olefínicos, polissacarídeos e purínicos.

Porém, em um estudo de extração de DNA a partir de tecidos foliares maduros de espécies nativas do Cerrado, Silva (2010) observou quantidades variadas de polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários, que representam um dos principais fatores limitantes no processo de extração e purificação do DNA obtido, pois inibi a atividade de duas enzimas importantes, a Taq DNA polimerase e as enzimas

de restrição. Isso posto, para Pandey e Tripathi (2014) é importante um estudo prévio a respeito dos compostos químicos, para direcionar a escolha dos reagentes em relação ao pH e a polaridade dos metabólitos secundários, sendo os solventes mais utilizados (Tabela 1) água, etanol, metanol, clorofórmio, éter e acetona.

**Tabela 1** – Solventes mais utilizados para extração de metabólitos secundários.

Água	Etanol	Metanol	Clorofórmio	Éter	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Alcaloides	Fenóis
Amidos	Polifenóis	Terpenoides	Flavonoides	Terpenoides	Flavonóis
Taninos	Poliacetilenos	Saponinas		Cumarinas	
Saponinas	Flavonóis	Taninos		Ácidos graxos	
Terpenoides	Terpenoides	Xantoxilinas			
Polipeptídeos	Esteróis	Totaróis			
Lectinas	Alcaloides	Quassinoides			
		Lactonas			
		Flavonas			
		Fenonas			
		Polifenóis			

Fonte: Adaptado de Pandey e Tripathi (2014).

## 1.2. Protocolos de extração e purificação de DNA

A análise genética permite investigar a estrutura populacional, a variabilidade genética e a história evolutiva das espécies vegetais do Cerrado, além de outras informações. Além disso, o conhecimento genético das plantas nativas é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de preservação ecológica (GOMES e MOURA, 2010). De forma geral, a extração de DNA, em plantas, envolve as seguintes etapas: i) coleta de amostras de tecido vegetal; ii) lise celular; iii) isolamento (purificação) e iv) eluição do DNA.

Diversos métodos têm sido utilizados para a extração de DNA vegetal, sendo que o protocolo CTAB (*cetyl trimethylammonium bromide*) é um dos mais adotados. Esse protocolo envolve a extração do DNA em uma solução de CTAB, seguida de etapas de tratamento e lavagem (DOYLE e DOYLE, 1987). No entanto, considerando a quantidade de metabólitos secundários difíceis de remover sem a utilização de solventes orgânicos, como fenol e outros compostos tóxicos, comprometem a e quantidade do DNA (TAHMASEBI et al., 2023)

Existem ainda outros métodos, como o uso de kits comerciais de extração de DNA de plantas disponíveis no mercado, também têm sido empregados com sucesso em estudos genéticos de plantas nativas do Cerrado (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Esses kits garantem DNA em quantidade e qualidade para análises

moleculares (LICKFELDT et al., 2002). No entanto, estes kits apresentam alto custo, inviabilizando seu uso em alguns laboratórios (XIN; CHEN, 2012).

É importante a escolha adequada dos reagentes, com ênfase em detergentes que removem os compostos presentes nas células vegetais e, além disso, a modificação de condições como a concentração de reagentes, o tempo de incubação e a temperatura, pode ser explorada para melhorar a eficiência do protocolo. A utilização de etapas de purificação e concentração do DNA extraído também é fundamental para a obtenção de amostras de alta qualidade (FALEIRO et al., 2003). A validação dos protocolos pode ser feita por meio de análises de eletroforese em gel, espectrofotometria e comparação com outros métodos alcançados (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Em um estudo de Souza (2019), foram testados os protocolos de Faleiro et al. (2003) e Silva (2010), além da criação otimizada de um novo protocolo intitulado SDS e Triton X-100 para lise celular (Tabela 2), o qual demonstrou eficiência na extração de DNA de plantas do Cerrado com integridade, pureza e quantidade razoável para análises moleculares, podendo ser utilizado em outras espécies vegetais, por meio de um método simples, rápido, seguro e de baixo custo em comparação com os demais para extração de DNA de plantas do bioma Cerrado.

**Tabela 2** – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas dos protocolos de extração de DNA estudados.

Protocolos	Extração	Purificação	Precipitação
<b>Faleiro et al. (2003)</b>	100 mM Tris-HCl	Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1	Isopropanol
	20 mM EDTA		
	1,3 M NaCl	CTAB 7 %	
	CTAB 2,8%		
	PVP 1 %		
Beta-mercaptoetanol 0,2%			
<b>Silva (2010)</b>	100 mM Tris-HCl	Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1	Isopropanol
	20 mM EDTA		
	1,4 M NaCl	CTAB 10 %	
	CTAB 2 %		
	PVP 1 %		
Beta-Mercaptoetanol 1 %			
<b>Souza (2019)</b>	100 mM Tris HCl		Etanol absoluto
	20 mM EDTA		
	1,4 M NaCl		
	SDS 5%		
	Triton X-100 5%		

Fonte: Adaptado de Souza (2019).

Portanto, a escolha e adequação dos protocolos de extração depende de vários fatores, tais como, qualidade e quantidade do DNA, quantidade de amostras e presença de metabólitos secundários. Assim, a revisão integrativa se faz necessária, visto a quantidade de variações de protocolos para uma mesma finalidade, extração de DNA de plantas.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Estratégia de busca

Foi realizada uma revisão integrativa, que, de acordo com Mendes et al. (2008), é uma alternativa para realizar uma revisão rigorosa e combinar estudos com diversas metodologias, a fim de integrar os resultados. O enfoque desta revisão integrativa foi investigar os principais protocolos de extração e purificação de DNA utilizados em espécies do Cerrado. Assim, foram realizadas buscas na base de dados da *Web of Science*. Utilizamos mais de um conjunto de descritores, a priori, TS = "DNA extraction" AND plant\* AND (Cerrado or Savana) que gerou resultados menor número de trabalhos. Com isso, visando ampliar a busca, utilizamos os descritores TS = DNA AND extraction AND plant\* AND native, ou seja, excluimos o termo "Cerrado" dos descritores. E, recuperamos um número maior de trabalhos. No entanto, também fizemos uma busca específica sobre extração de DNA em espécies nativas do Cerrado de importância relevante na plataforma *Google Scholar*, considerando que este tipo de revisão permite a integração de outros trabalhos.

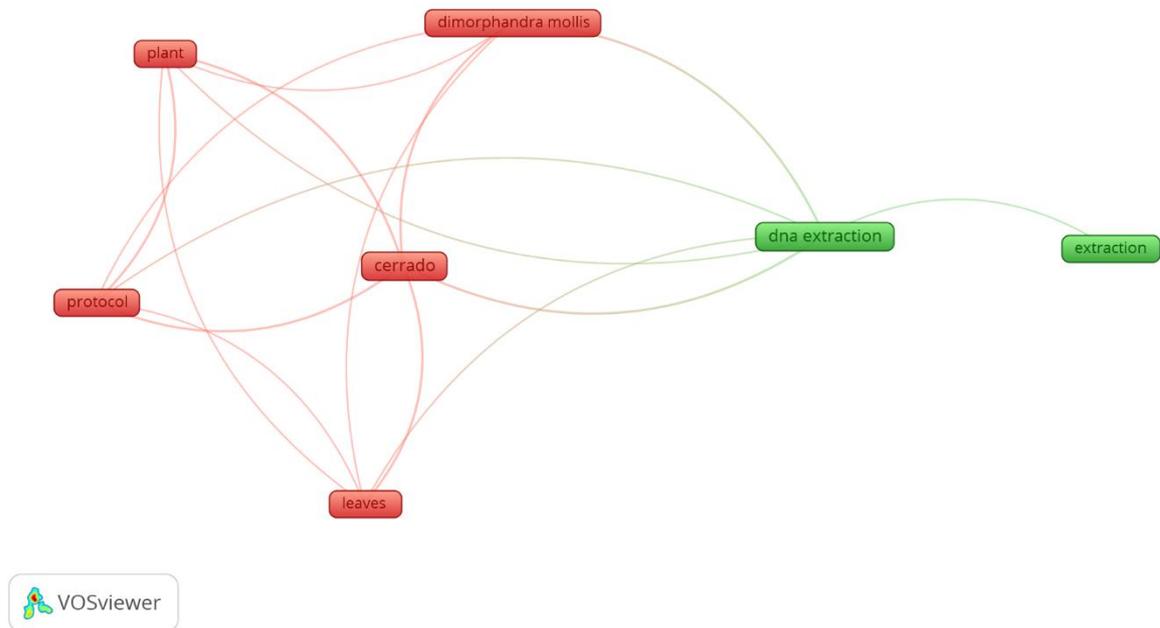
#### 3.2 Análise de dados

Após a pesquisa, os dados foram exportados da base *Web of Science* para planilha Excel. Na triagem a seleção foi realizada por meio da leitura de títulos e resumos. Além disso, foi realizada uma análise no VOSviewer para construção e visualização de redes de palavras-chaves e análises cienciométricas.

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

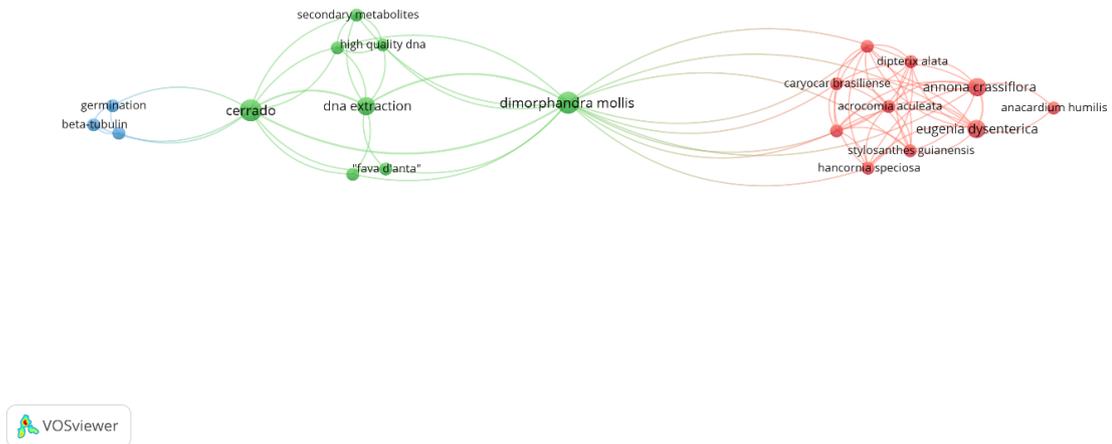
Inicialmente, apresentamos uma rede de palavras-chaves mais comuns nos artigos (Figura 4) a fim de conhecer aquelas que estão sendo mais exploradas na literatura e, que, possuem associação com o tema abordado. Observamos dois grandes grupos em que um deles contempla os termos "dna extraction" e "extraction", que estão presentes nos trabalhos de busca mais ampla. Enquanto o outro grupo, contempla a especificidade do tema de pesquisa, vale mencionar que aparece a espécie *Dimorphandra mollis*, nativa do Cerrado, pertence à família fabaceae e constitui importância, principalmente na produção de fármacos.

**Figura 4** – Rede de palavras-chaves presentes nos artigos encontrados.



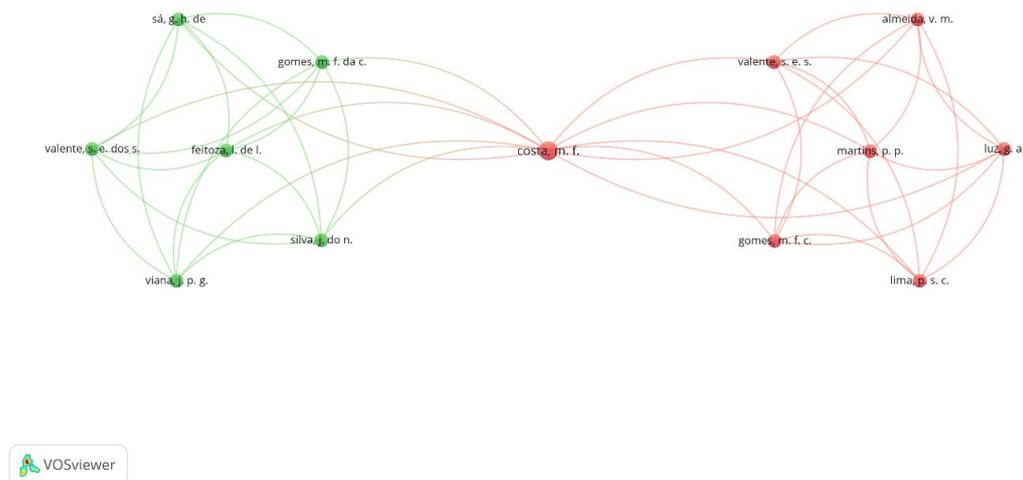
Em seguida, também apresentamos uma rede de palavras-chaves (Figura 5), porém mais específica, dos termos mais utilizados dentre os artigos escolhidos para os resultados. Observa-se que o ponto central é o nome de uma planta do Cerrado e à direita são vários nomes de plantas do Cerrado também, que estão, porém, desconectadas da palavra Cerrado e de “extração de dna” à esquerda, sugerindo um problema muito comum em pesquisas nessa área, pois muitos trabalhos não evidenciam o bioma Cerrado no estudo das plantas contidas nele.

**Figura 5** – Rede de palavras-chaves presentes nos artigos selecionados.



E, por fim, apresentamos uma rede que relaciona coautores entre todos os trabalhos escolhidos para os resultados (Figura 6), com um nome central bastante comum, que participou de vários trabalhos na área.

**Figura 6** – Rede de coautores presentes nos artigos selecionados.



No levantamento dos resultados, foram encontrados 10 trabalhos relevantes para a pesquisa dos protocolos de extração de DNA mais utilizados em plantas do

Cerrado. Com isso a apresentação dos resultados, seguidos da discussão dos mesmos, consistirá em ordem cronológica de data de publicação dos trabalhos, do mais antigo para o mais recente.

A maioria dos protocolos existentes na literatura se baseia nas metodologias de Doyle & Doyle (1987 e 1990), com o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) que é classificado como perigoso pelo NCBI (2023) (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia), seguindo o GHS (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos). Esse protocolo ainda tem se mostrado bastante eficaz na extração de DNA, com otimizações para as particularidades das plantas, porém, em estudos mais atuais, o detergente CTAB já tem sido substituído por ser corrosivo, irritante e causar riscos ambientais e à saúde.

Assim, o primeiro resultado relevante é de Faleiro et al. (2003) que teve como objetivo desenvolver uma metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do Cerrado, visando a análises moleculares. Para isso, foi testado um protocolo único (Tabela 3) de extração de DNA baseado na metodologia de Doyle & Doyle (1990) e modificado por Faleiro et al. (2002) para cacaueiro. O protocolo consistiu em macerar tecido foliar em nitrogênio líquido, adicionar tampão de lise com CTAB, incubação em banho-maria, desproteínização com clorofórmio-álcool isoamílico, precipitação com isopropanol, lavagem com etanol e ressuspensão em água com RNase. Assim, o protocolo foi aplicado em 10 espécies nativas do Cerrado com diferentes características foliares, como presença de pêlos, mucilagens, látex e polifenóis. A quantidade e a qualidade do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose e os resultados mostraram que o protocolo foi eficiente em extrair DNA de boa qualidade e quantidade suficiente para análises moleculares baseadas em PCR. Por fim, os autores recomendam o uso do protocolo desenvolvido para extrair DNA de outras espécies nativas do Cerrado, considerando a diversidade dos tecidos foliares e, também, destaca as vantagens do protocolo em termos de baixo custo, facilidade operacional e reprodutibilidade das análises moleculares.

**Tabela 3** – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Faleiro et al. (2003).

Protocolo	Extração	Purificação	Precipitação
<b>Faleiro et al. (2003)</b>	100 mM Tris-HCl	Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1	Isopropanol
	20 mM EDTA		
	1,3 M NaCl		
	CTAB 2,8%	CTAB 7 %	
	PVP 1 %	RNAse	
	Beta-mercaptoetanol 0,2%		

Ante o exposto, o protocolo de Faleiro et al. (2003) é efetivo na extração de DNA com qualidade e quantidade suficientes para análise, porém o método pode ser otimizado com a substituição dos reagentes utilizados, como a exemplo: o nitrogênio líquido na etapa de maceração, que pode custar caro de acordo com Souza (2019); o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) para lise celular, que como mencionado anteriormente é corrosivo, irritante e pode causar riscos ambientais e à saúde; o EDTA (edetato dissódico) na etapa de lise celular, que pode ser irritante e tem risco à saúde de acordo com o NCBI (2023); o PVP (polivinilpirrolidona) na etapa de extração, que pode ser corrosivo, tem toxicidade aguda e risco ambiental de acordo com o NCBI (2023); o  $\beta$ ME ( $\beta$ -mercaptoetanol), também na etapa de extração, que pode ser tóxico se houver ingestão, inalação ou absorção pela pele, além de ter potencial corrosivo, irritativo, toxicidade aguda e riscos ambientais e à saúde de acordo com o NCBI (2023); o clorofórmio na etapa de purificação, que não é inflamável na maioria das condições, mas queima em condições extremas e pode causar doenças por inalação, absorção pela pele ou ingestão, sendo também carcinogênico de acordo com o NCBI (2023); e o álcool isoamílico, também na etapa de purificação, que pode causar riscos à saúde devido ele ser inflamável, corrosivo e por produzir vapor irritante de acordo com o NCBI (2023).

Em seguida, o segundo resultado relevante é o de Silva (2010), que descreve um procedimento modificado (Tabela 4) a partir de Doyle e Doyle (1990) para extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do Cerrado. Para a autora, o principal problema do isolamento do DNA é a presença de polissacarídeos, fenóis e outros metabólitos secundários que prejudicam o procedimento de isolamento do DNA e posterior aplicação. Assim, o protocolo otimizado foi testado em folhas maduras de *Annona crassiflora* (araticum), *Eugenia dysenterica* (cagaita), *Anacardium humilis* (caju-do-campo), *Hancornia speciosa* (mangaba) e *Caryocar brasiliensis*

(pequi) e foi eficiente em isolar DNA, livre de polissacarídeos e polifenóis de alto peso molecular, pois utilizou concentrações de  $\beta$ -mercaptoetanol acima de 1% no tampão de extração.

**Tabela 4** – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Silva (2010).

Protocolo	Extração	Purificação	Precipitação
<b>Silva (2010)</b>	100 mM Tris-HCl		
	20 mM EDTA		
	1,4 M NaCl	Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1	
	CTAB 2 %		Isopropanol
	PVP 1 %	CTAB 10 %	
	Beta-Mercaptoetanol 1 %		

De acordo com o exposto, no trabalho de Silva (2010) observou-se que folhas maduras de plantas do Cerrado possuem muitos polissacarídeos, que não são encontrados em quantidades relevantes nos estágios intermediários de maturação da maioria das folhas do Cerrado, de acordo com estudos de prospecção fitoquímica (FILHO e CASTRO, 2019). Além disso, o protocolo utilizado é eficaz na extração de DNA de alta pureza, porém utiliza os mesmos reagentes de Faleiro et al. (2003), alterando apenas a concentração e a exclusão de uma enzima RNase na etapa de purificação, necessitando, assim, de otimizações, visando o custo-benefício do protocolo e a substituição dos reagentes tóxicos.

O terceiro resultado relevante é o de Moreira e Oliveira (2011), que relata o efeito da idade da folha na extração de DNA de *Dimorphandra mollis*, assim como o estudo de Silva (2010) mencionado anteriormente, que extraiu DNA de folhas maduras do Cerrado. A hipótese inicial do trabalho consiste na ideia de que as folhas jovens têm mais DNA do que as folhas velhas do mesmo indivíduo, porque as defesas químicas de taninos e fenóis se acumulam nas folhas mais velhas. Folhas jovens e velhas foram amostradas de oito árvores maduras, bem como folhas de oito mudas na região norte do estado de Minas Gerais. A extração de DNA genômico seguiu o protocolo padrão CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987) com algumas modificações (Tabela 5) contidas no protocolo de Faleiro et al. (2003) e foi bem-sucedida para folhas jovens de 16 indivíduos de *D. mollis*, pois o DNA extraído apresentou alta qualidade e a quantidade de DNA. Em contraste, a extração de DNA a partir de folhas velhas não foi bem-sucedida. Quando o DNA foi extraído de folhas velhas, apresentou pigmento

marrom, indicando contaminação por compostos fenólicos conforme explica Romano e Brasileiro (2015).

**Tabela 5** – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Moreira e Oliveira (2011).

Protocolo	Extração	Purificação	Precipitação
<b>Moreira e Oliveira (2011)</b>	100 mM Tris-HCl	Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1	Isopropanol
	20 mM EDTA		
	1,3 M NaCl		
	CTAB 2,8%	CTAB 7 %	
	PVP 1 %	RNAse	
	Beta-mercaptoetanol 0,2%		

Assim, ante o exposto, uma otimização possível no protocolo de Moreira e Oliveira (2011) seria o de testar novos reagentes menos tóxicos para as etapas de extração e purificação de DNA folhas maduras. Seguindo a mesma observação mencionada anteriormente nos protocolos de Silva (2010) e Faleiro et al. (2003).

Em sequência, o quarto resultado relevante é o de Queiroz (2011), que teve como objetivo realizar estudos moleculares em *Annona crassiflora* Mart., uma espécie nativa do Cerrado brasileiro de bastante interesse econômico, pelo seu fruto. Para isso, a autora relata que foi extraído o DNA de folhas jovens da planta utilizando um protocolo de microextração (Tabela 6), com os materiais e métodos semelhantes ao protocolo de Faleiro et al. (2003). Os resultados mostraram que o DNA extraído apresentou boa qualidade e quantidade, podendo ser usado para estudos de variabilidade genética e melhoramento da espécie.

**Tabela 6** – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Queiroz (2011).

Protocolo	Extração	Purificação	Precipitação
<b>Queiroz (2011)</b>	100 mM Tris-HCl	Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1	Isopropanol
	20 mM EDTA		
	1,4 M NaCl		
	CTAB 2,8 %	CTAB 10 %	
	PVP 1 %		
	Beta-mercaptoetanol 0,2%		

Assim, apesar da eficiência na extração de DNA obtido, as mesmas discussões sobre o protocolo de Faleiro et al. (2003) servem para o protocolo de Queiroz (2011),

pelo fato de a autora utilizar os mesmos reagentes, com mínimas modificações e não explicar com detalhes sobre a origem do protocolo de microextração que ela utilizou.

O quinto resultado relevante foi o de Souza et al. (2012), que teve como objetivo isolar DNA de alta qualidade e livre de polissacarídeos a partir de folhas de *Dimorphandra mollis*, uma árvore nativa do Cerrado brasileiro. Para isso, foram testados quatro protocolos de extração de DNA vegetal que podem ser utilizados para minimizar problemas como contaminação por polissacarídeos, que é mais pronunciada em material de folhas maduras, assim como também visto nas discussões dos estudos de Moreira e Oliveira (2011) e Silva (2010). O protocolo que produziu a melhor qualidade de DNA foi o “D” (Tabela 7) de Russell et al., (2010), com algumas modificações dos protocolos de Doyle e Doyle (1987), Li et al. (2007) e Tel-Zur et al. (1999). A modificação mais importante ocorre no início do procedimento, com a adição de um tampão de sorbitol para remover polissacarídeos mucilaginosos. Em seguida, o material foliar macerado é lavado com este tampão até que não haja mucilagem visível na amostra. Este protocolo é adequado para extração de DNA tanto de folhas jovens quanto maduras e pode ser útil não apenas para *D. mollis*, mas também para outras espécies que apresentam altos níveis de contaminação por polissacarídeos durante o processo de extração.

**Tabela 7** – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Souza et al. (2012).

Protocolo	Extração	Purificação	Precipitação
	100 mM Tris-HCl		
	0,35 M sorbitol	Clorofórmio:álcool isoamílico	
	5 mM EDTA (tampão sorbitol)	24:1	
<b>Souza et al. (2012)</b>	20 mM EDTA (tampão CTAB)	CTAB 10 %	Isopropanol
	CTAB 3,0 %	3 M Acetato de sódio	
	1% PVP-40		
	3 M NaCl	TE-RNase	
	Beta-mercaptoetanol 0,2%		

Perante o exposto, o protocolo de Souza et al. (2012) é promissor, pois, apesar de utilizar CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) que é corrosivo, irritante e pode causar riscos ambientais e à saúde de acordo com o NCBI (2023), foram adicionados sorbitol como etapa de pré-purificação das folhas e acetato de sódio na etapa de

precipitação, com ambos não sendo tóxicos de acordo com o NCBI (2023) e nem caros, sendo boas estratégias de otimização para o protocolo de Russell et al. (2010).

Posteriormente, o sexto resultado relevante foi o de Cansação e Coutinho (2013), que compara dois métodos de extração de DNA genômico do pequi usando folhas jovens como material vegetal. O primeiro método usou CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) para o isolamento do DNA, enquanto o segundo método usou SDS (dodecil sulfato de sódio) via liquidificador para a lise mecânica. Os resultados mostraram que o segundo método (Tabela 8) usando SDS via liquidificador foi mais eficiente em extrair uma maior quantidade e melhor qualidade de DNA em comparação com o primeiro método usando CTAB. Este método também foi mais simples e menos custoso, tornando-o mais favorável para o uso laboratorial.

**Tabela 8** – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Cansação e Coutinho (2013).

Protocolo	Extração	Purificação	Precipitação
<b>Cansação e Coutinho (2013)</b>	1 M Tris-HCl		
	0,25 M EDTA	Clorofórmio:álcool isoamílico	
	5 M NaCl	24:1 650 µl	
	SDS 20 %		

Em relação ao exposto, o segundo protocolo de Cansação e Coutinho (2013) se mostrou muito promissor, pois substitui a maceração com N<sub>2</sub> líquido (Nitrogênio) por lise mecânica em liquidificador e, também, substituiu o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) na extração pelo SDS (dodecil sulfato de sódio), que não é tóxico e nem oferece riscos ambientais e a saúde, apesar de ser inflamável, corrosivo e irritante de acordo com o NCBI (2023), sendo ambas as substituições alternativas melhores em termos de custo-benefício, quando comparadas às utilizadas no primeiro protocolo que compartilha reagentes e concentrações semelhantes aos dos protocolos Doyle & Doyle (1987 e 1990) e Faleiro et al. (2003).

O sétimo estudo relevante é o de Nascimento et al. (2017) que foi desenvolvido para avaliar a eficiência de protocolos de extração de DNA na aplicação de técnicas moleculares em amostras da espécie. Foram utilizadas folhas jovens provenientes de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado em Itaporanga d’Ajuda, Sergipe. Foram testados quatro protocolos e os ácidos nucleicos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro. A

análise conjunta da quantificação e amplificação da PCR sugere a recomendação do protocolo de extração 2 (Tabela 9) para extração de DNA de mangabeira.

**Tabela 9** – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Nascimento et al. (2017).

Protocolo	Extração	Purificação	Precipitação
<b>Nascimento et al. (2017)</b>	100 mM Tris-HCl		
	20 mM EDTA		
	Proteinase K (10 mg/mL) 0,3%	Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1	Isopropanol
	CTAB 2,0 %	CTAB 10 %	
	PVP 1 %		
	Beta-mercaptoetanol 0,2%		

Ante o exposto, o protocolo de extração 2 recomendado por Nascimento et al. (2017) se baseia no protocolo de Doyle e Doyle (1990), adaptado por Alzate-Marin et al. (2005), e utiliza os principais reagentes de Faleiro et al. (2003), mantendo as discussões mencionadas anteriormente, que falam sobre a necessidade de otimização dos reagentes utilizados no protocolo, a fim de melhorar o custo-benefício e diminuir a toxicidade do procedimento.

Em seguida, o oitavo resultado relevante foi o de Almeida et al. (2017), que teve como objetivo comparar oito métodos para isolar DNA genômico de *Hancornia speciosa*, também conhecida como mangabeira. Os oito métodos testados foram seis métodos orgânicos Dellaporta et al. (1983), Doyle e Doyle (1987), Ferreira e Grattapaglia (1998), Khanuja et al. (1999), Murray e Thompson (1980), Romano e Brasileiro (1999) e dois kits comerciais de extração de DNA kit 1 (Qiagen, Venlo, Holanda) e kit 2 (Invisorb Spin Plant Mini Kit, Invitex, Berlim, Alemanha). O estudo constatou que o protocolo (Tabela 10) descrito por Khanuja et al. (1999) foi eficaz em isolar DNA de partes de plantas com alto teor de metabólitos secundários, como folhas de babaçu. Além disso, os autores recomendam o uso do kit 1, kit 2 e do protocolo proposto por Khanuja et al. (1999) para extrair DNA de mangabeira e é importante ressaltar que o protocolo descrito por Khanuja et al. (1999), embora mais trabalhoso, é menos dispendioso do que os kits comerciais de purificação testados.

**Tabela 10** – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Almeida et al. (2017).

Protocolo	Extração	Purificação	Precipitação
<b>Almeida et al. (2017)</b>	1 M Tris-HCl	Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1	Isopropanol
	25 mM EDTA		
	1,5 M NaCl	5 µl Rnase	
	CTAB 2,5 %		
	1% PVP-40		
	Beta-mercaptoetanol 0,2%		

Assim, os protocolos utilizados por Almeida et al. (2017) evidenciam a eficácia dos kits de extração, que são mencionados anteriormente no referencial por Ferreira e Grattapaglia (1998), porém como Souza (2019) descreve, os kits são caros e difíceis de adquirir, o que não facilita as pesquisas, sendo mais viável a otimização de um protocolo com reagentes de baixo custo e não tóxicos, que no caso do protocolo de Almeida et al. (2017) não se encaixa nesses quesitos, pela toxicidade e alto custo de alguns reagentes.

O nono resultado e o mais relevante foi o de Souza (2019), que teve como objetivo desenvolver um novo e eficiente método (Tabela 11) para extrair DNA de plantas do Cerrado de maneira mais rápida, barata e segura. O método é baseado no uso combinado de SDS (dodecil sulfato de sódio) e Triton X-100, o que elimina a necessidade de múltiplas etapas de purificação e reduz o uso de reagentes caros e/ou tóxicos. Dez espécies representativas do bioma Cerrado foram selecionadas para teste. A qualidade e quantidade do DNA extraído foram analisadas por espectrofotômetro e gel de agarose e sua adequação para estudos moleculares foi avaliada através da digestão com enzima de restrição e amplificação via PCR com marcador RAPD. O DNA obtido por este método foi considerado íntegro, livre de contaminantes e excelente para digestão e amplificação via PCR.

**Tabela 11** – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas do protocolo de extração de DNA de Souza (2019).

Protocolo	Extração	Purificação	Precipitação
<b>Souza (2019)</b>	100 mM Tris HCl		
	20 mM EDTA		
	1,4 M NaCl		Etanol absoluto
	SDS 5%		
	Triton X-100 5%		

Com isso, o protocolo desenvolvido por Souza (2019) se mostra o mais inovador, extraindo DNA de folhas do Cerrado com alta qualidade e quantidade substituindo os reagentes tóxicos da etapa de extração, como a exemplo: CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), PVP (polivinilpirrolidona) e  $\beta$ ME ( $\beta$ -mercaptoetanol) por SDS (dodecil sulfato de sódio) e Triton X-100, que pode ser corrosivo, irritante e tem risco ambiental de acordo com o NCBI (2023), porém ainda assim é menos nocivo do que os outros reagentes mais utilizados e, além disso, essa modificação na etapa de extração elimina todas as etapas de purificação dos protocolos de Silva (2010) e Faleiro et al. (2003), que continham CIA (clorofórmio:álcool isoamílico) e CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), ambos tóxicos, substituindo, também, ao final, o agente precipitador Isopropanol por Etanol, que apesar de inflamável não é irritante de acordo com o NCBI (2023). Por fim, o autor descreve o custo e o tempo dos 3 protocolos, sendo o dele o mais vantajoso em custo-benefício pelo tempo e menos tóxico.

Por fim, o décimo resultado relevante é o de Silva et al. (2021) que tem como objetivo comparar cinco métodos de extração de DNA de *Pterodon emarginatus*, uma planta do Cerrado com potencial econômico e medicinal. Os autores utilizaram cinco métodos de extração e os resultados mostraram que os protocolos propostos por Doyle e Doyle (1987), Romano e Brasileiro (1998) e Ferreira e Grattapaglia (1995) foram mais eficientes, rápidos e baratos do que os protocolos de Dellaporta, Wood e Hicks et al. (1983) e Khanuja et al. (1999), que não resultaram em quantidades satisfatórias de DNA. Os autores concluíram que os protocolos baseados no uso de CTAB são adequados para a extração de DNA de “sucupira branca” e podem ser utilizados para estudos de diversidade genética e conservação da espécie.

Portanto, apesar de Silva et al. (2021) utilizar cinco protocolos de extração de DNA diferentes para uma mesma espécie do Cerrado e ser o estudo mais recente dessa pesquisa, todos os protocolos que os autores utilizaram eram antigos e necessitavam de otimizações para diminuir a toxicidade e melhorar o custo-benefício, como mencionado nas discussões anteriores, faltando uma revisão bibliográfica prévia para levantamento dos melhores métodos de extração de DNA em plantas do Cerrado, a exemplo do protocolo inovador de Souza (2019), publicado anteriormente.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que estudos prévios de revisão bibliográfica tem importância fundamental para o sucesso de trabalhos científicos, a fim de evitar informações ultrapassadas que podem prejudicar a pesquisa. Assim, devido ao baixo volume de trabalhos encontrados na base de dados do *Web of Science*, recomenda-se que pesquisas relacionadas ao Cerrado brasileiro utilizem bancos de dados que buscam resultados no idioma português brasileiro, por se tratar de um tema intrínseco do Brasil e a maioria dos trabalhos serem publicados na língua do país. Assim, dentre os protocolos revisados, o protocolo de Souza et al. (2012) é o único que apresenta otimizações viáveis, de baixo custo e menos tóxicas para a purificação de DNA em folhas maduras do Cerrado. Em seguida, o primeiro protocolo que menciona a substituição de reagentes caros e tóxicos na etapa de extração de DNA em folhas do Cerrado é o de Cansanção e Coutinho (2013), sendo importante por levantar uma preocupação acerca de métodos mais otimizados, servindo de base para trabalhos seguintes. E, por fim, o protocolo que envolve a melhor otimização viável para extração e purificação de DNA em plantas do Cerrado é o de Souza (2019) com a substituição de reagentes caros e tóxicos na etapa de extração, eliminando a etapa de purificação, diminuindo o custo e o tempo da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. M.; LUZ, G. A.; MARTINS, P. P.; GOMES, M. F. C.; COSTA, M. F.; LIMA, P. S. C.; VALENTE, S. E. S. Comparison of eight methods to isolate genomic DNA from *Hancornia speciosa*. **Genetics And Molecular Research**, Teresina, v. 16, n. 3, p. 1-7, jul. 2017. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039724>.

ALZATE-MARIN, A. L. et al. **Otimização de um método econômico e rápido de extração de DNA para quatro espécies de árvores tropicais**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. Anais. Águas de Lindóia: SBG, p.510. 2005.

BESSA, N. G. F. de; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L.; RIBEIRO, L. U.; QUIRINO, M. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Gurupi, Tocantins, v. 15, n. 41, p. 692-707, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722013000500010>.

CANSANÇÃO, I. F.; COUTINHO, H. D. M. Estudo comparativo de dois métodos de extração de DNA genômico do Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista de Biologia e Farmácia**, Campina Grande, v. 9, n. 1, p. 13-17, 2013.

DELLAPORTA S.L., WOOD J, HICKS J.B. (1983). Uma minipreparação vegetal: versão II. **Planta Mol. Biol. Relatório**. 1: 19-20. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Bioma Cerrado**. Embrapa, 2023. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/contando-ciencia/bioma-cerrado>>. Acesso em: 18 de Junho de 2023.

FALEIRO, F. G.; ARAÚJO, I. S.; BAHIA, R. C. S.; SANTOS, R. F.; YAMADA, M. M.; ANHERT, D. **Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD**. Agrotropica, Ilhéus, 2002.

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do Cerrado visando a análises moleculares**. Comunicado Técnico nº 92. Planaltina: Embrapa, 2003.

FERREIRA M.E., GRATTAPAGLIA D. (1998). **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3º. ed. Embrapa-Cenargen, Brasília.

FILHO, A. C. P. M.; CASTRO, C. F. S. Classes Fitoquímicas de metabólitos secundários em extratos etanólico foliares des espécies do Cerrado brasileiro.

**Revista Saúde & Ciência Online**, v. 8, n. 1, p. 45-61, abr. 2019. <https://doi.org/10.35572/rsc.v8i1>.

GAMARRA, R. M. et al. Fragmentação da vegetação em região de área protegida no Cerrado. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e27310716230-e27310716230, 2021.

GIROLDO, A. B. **Pequenas plantas, grandes estratégias: adaptações e sobrevivência no Cerrado**. 2016. 51 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. COORDENAÇÃO GERAL DE OBSERVAÇÃO DA TERRA. PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA AMAZÔNIA E DEMAIS BIOMAS. **Limite do Bioma Cerrado** (2021) – Disponível em: <http://terrabrasilis.dpi.inpe.br/downloads/>. Acesso em: 13 de junho de 2023

KHANUJA S.P.S., SHASANY A.K., DAROKAR M.P., KUMAR S. (1999). Isolamento rápido de DNA de amostras secas e frescas de plantas que produzem grandes quantidades de metabólitos secundários e óleos essenciais. **Planta Mol. Biol. Relatório**. 17: 74-74. <https://doi.org/10.1023/A:1007528101452>

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

LICKFELDT, D. W. et al. Comparing three DNA extraction procedures for cost, efficiency, and DNA yield. **HortScience**, v. 37, n. 5, p. 822-825, 2002.

LI J.T., YANG J., CHEN D.C., ZHANG X.L. et al. (2007). Um método de minipreparação otimizado para obter genoma de alta qualidade DNA de folhas maduras de girassol. **Genet. Mol. Res.** 6: 1064-1071.

MENDES, K. S., SILVEIRA, R. C. C. P., & GALVÃO, C. M. (2008). Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. **Texto & Contexto – Enfermagem**, 17(4), 758- 764. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-07072008000400018>

MENDONÇA, R. C.; J. M. FELFILI; B. M. T. WALTER, M. C. SILVA JUNIOR, A. V. REZENDE; T. S. FILGUEIRAS & P. E. N. SILVA, (1998). **Flora vascular do cerrado**. In: SANO, S. M., & ALMEIDA, SD. P., (Eds). Cerrado: ambiente e flora. Planaltina, DF, Brazil: EMBRAPA-CPAC. p. 288-556.

MITTERMEIER, C. G.; TURNER, W. R.; LARSEN, F. W.; BROOKS, T. M.; GASCON, C. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. **Biodiversity hotspots: distribution and protection of priority conservation areas**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 3-22. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5_1).

MOREIRA, P. A.; OLIVEIRA, D. A. Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. **Genetics And Molecular Research**, Montes Claros, v. 10, n. 1, p. 353-358, 2011. <http://dx.doi.org/10.4238/vol10-1gmr1030>.

MURRAY M.G., THOMPSON W.F. (1980). Isolamento rápido de DNA vegetal de alto peso molecular. **Res. de Ácidos Nucleicos**. 8: 4321- 4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000. <https://doi.org/10.1038/35002501>.

NASCIMENTO, A. L. S.; SÁ, A. J.; LEDO, A. S.; SILVA, A. V. C. DNA extraction in mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes). **Nucleus**, Sergipe, v. 14, n. 2, p. 97-106, 31 out. 2017. Fundacao Educational de Ituverava. <http://dx.doi.org/10.3738/1982.2278.2727>.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 702, **Ethanol**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 3776, **Isopropyl Alcohol**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isopropyl-Alcohol>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 5590, **Triton X-100**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triton-X-100>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 5780, **Sorbitol**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sorbitol>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 5974, **Cetrimonium Bromide**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cetrimonium-Bromide>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 6212, **Chloroform**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloroform>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 6917, **N-Vinyl-2-pyrrolidone**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Vinyl-2-pyrrolidone>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 31260, **Isoamyl alcohol**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoamyl-alcohol>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 517045, **Sodium Acetate**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-Acetate>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 3423265, **Sodium dodecyl sulfate**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-dodecyl-sulfate>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 9839867, **Disodium EDTA**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Disodium-EDTA>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NETO, G. A. L.; KAFFASHI, S.; LUIZ, W. T.; FERREIRA, W. R.; SILVA, Y. S. A. Dias da; PAZIN, G. V.; VIOLANTE, I. M. P. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 43, p. 1069-1077, 2015. [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/14\\_161](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/14_161).

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of pharmacy phytochemistry**. v. 2, n. 5, p. 115-9, 2014. Disponível em: <http://www.phytojournal.com/vol2Issue5/11.1.html>. Acesso 19 julho 2023.

QUEIROZ, S. É. E. Estudos moleculares em *Annona crassiflora* Mart., **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 11, n. 2, p. 23-29, 2011

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **Fitofisionomias do bioma cerrado**. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de (Ed.). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p. 89-166. 1998.

RIBEIRO, R.A.; RODRIGUES, F.M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2006.

RODRIGUES, F. A.; PIMENTA, V. S. C.; BRAGA, K. M. S.; ARAÚJO, E. G. OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, GO. v. 13, n. 23, p. 870-887, 24 jun. 2016. Centro Científico Conhecer. [http://dx.doi.org/10.18677/enciclopedia\\_biosfera\\_2016\\_075](http://dx.doi.org/10.18677/enciclopedia_biosfera_2016_075).

ROMANO E., BRASILEIRO A.C.M. (1999). Extração de DNA de plantas. **Biotechnol. Ciênc. Desenvolv.** 2: 40-43.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C., 2015. **Extração de DNA de tecidos vegetais**. In: BRASILEIRO, A.C.M., CARNEIRO, V.T.C. *Manual de transformação genética de plantas*. 2nd ed. Brasília: EMBRAPA-PI/EMBRAPA – CENARGEN, pp. 163 -177.

RUSSELL A., SAMUEL R., RUPP B. e BARFUSS M.H.J. (2010). **Filogenética e citologia de uma orquídea pantropical gênero *Polystachya* (Polystachyinae,**

**Vandae, Orchidaceae):** Evidência de dados de sequência de DNA plastidial. *Táxon* 59: 389-404.

SAKITA, H.Y. 2013. **Anatomia foliar de espécies lenhosas do cerrado sentido restrito do Brasil Central.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas). Faculdade de Ciências e Letras, UNESP. Assis.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF, v.1, p. 410 Embrapa Cerrados, 2008.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: v.2, n.1, p. 1279 Embrapa Cerrados, 2010.

SCARIOT, A. SOUZA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. (Org.) 2005. **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação.** Brasília, Ministério do Meio Ambiente.

SILVA, J. do N.; VIANA, J. P. G.; COSTA, M. F.; SÁ, G. H. de; GOMES, M. F. da C.; FEITOZA, L. de L.; VALENTE, S. E. dos S. A simple and cost-effective method for DNA extraction suitable for PCR in “sucupira branca”. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 37, n. 1, p. 37-42, 29 dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.14393/bj-v37n0a2021-54133>.

SILVA, M. N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, v. 34, n. 6, p. 973-978, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622010000600002>.

SOUZA, D. C. de. **Extração de DNA de plantas do Cerrado: metodologia inédita e eficiente.** 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2019. <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.323>.

SOUZA, H. A. V.; MULLER, L. A. C.; BRANDÃO, R. L.; LOVATO, M. B. Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. **Genetics And Molecular Research**, Belo Horizonte, v. 11, n. 1, p. 756-764, 2012. <http://dx.doi.org/10.4238/2012.march.22.6>.

TAHMASEBI, A.; NASROLLAHI, F. Comparison of DNA extraction methods from *Halocnemum strabilaceum* (Amaranthaceae). **Journal of Wildlife and Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 81-97, 2023.

TEL-ZUR N., ABBO S., MYSLABODSKI D. e MIZRAHI Y. (1999). Procedimento CTAB modificado para isolamento de DNA de cactos epífitos dos gêneros *Hylocereus* e *Selenicereus* (Cactaceae). **Planta Mol. Biol. Rep.** 17: 249-254.

VIANNA, G.; BURIN, M. R.; DIEL, V. B. N. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E OUTRAS MOLÉCULAS CONTAMINANTES EM AMOSTRA DE DNA VEGETAL. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 4, p. 02-02, 2021.

XIN, Z.; CHEN, J. A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. **Plant methods**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2012.