

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

KELRY CAMILLY BARBOSA COSTA

**TESTES COMPARATIVOS ENTRE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE
ABELHA CANUDO (*Scaptotrigona depilis*) DO MELIPONÁRIO DA FAMEZ/
UFMS**

CAMPO GRANDE – MATO GROSSO DO SUL

2025

KELRY CAMILLY BARBOSA COSTA

**PADRONIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE ABELHA CANUDO
(*Scaptotrigona depilis*) DO MELIPONÁRIO DA FAMEZ/ UFMS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul, como parte das
exigências para obtenção do título de
bacharel em Zootecnia.

Orientador(a): Gabriela Puhl Rodrigues
Coorientador(a): Leila Sabrina Ullmann

**CAMPO GRANDE - MATO GROSSO DO SUL
2025**

KELRY CAMILLY BARBOSA COSTA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em 04/11/2025, e aprovado pela
Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
GABRIELA PUHL RODRIGUES
Data: 05/11/2025 16:32:27-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profª Drª. Gabriela Puhl Rodrigues
Presidente



Documento assinado digitalmente
LEILA SABRINA ULLMANN
Data: 06/11/2025 16:04:12-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profª Drª. Leila Sabrina Ullmann
Membro da Banca



Documento assinado digitalmente
FREDERICO NAKASONE FERREIRA
Data: 06/11/2025 15:01:52-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Biól. Frederico Nakasone Ferreira
Membro da Banca



Documento assinado digitalmente
ANDRESSA DOS SANTOS NEVES
Data: 05/11/2025 16:36:20-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Med. Vet. Andressa dos Santos Neves
Membro da Banca

*Dedico este trabalho “às minhas famílias”,
que sempre estiveram ao meu lado em todos
os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, por me conceder o dom da vida, a saúde e a força necessárias para continuar lutando pelos meus sonhos.

Aos meus pais, Cleverson de Oliveira Costa e Silvana Maria Barbosa, meu amor eterno e minha gratidão sem limites. Vocês sempre estiveram ao meu lado, mesmo quando tudo parecia difícil. Lutaram por mim com coragem, com fé e com o amor mais puro que alguém pode oferecer.

Às minhas irmãs, Kevily Gabrielly e Sabrina Barbosa, que caminharam comigo nos momentos de alegria e, principalmente, nos de tristeza. Ter vocês ao meu lado tornou tudo mais leve, mais suportável e mais verdadeiro.

À minha família querida de Campo Grande, Rayara Margutty, Elisa Margutty, Esther Margutty, Jeniffer Rosa, Arthur Rosa, Gabriela Bueno e Micaela Arguelho, meu mais profundo carinho. Vocês me deram forças quando eu pensei em desistir, me acolheram com amor e me ajudaram a enxergar a luz mesmo nos dias mais escuros. Cada riso, cada abraço e cada palavra de incentivo se tornaram combustível para minha jornada. Vocês são parte essencial da pessoa que me tornei, e levo cada um no meu coração com gratidão e ternura.

Ao meu amor, Ryan Felipe Guimarães, obrigada por ser meu porto seguro nessa reta final. Sua paciência, seu apoio e seu carinho foram fundamentais para que eu não perdesse a fé nos meus próprios passos. Você me mostrou que o fim de um ciclo pode ser doce, especialmente quando se tem ao lado alguém que acredita de verdade na gente.

À minha irmãzinha Isis Barbosa Costa, que mesmo antes de nascer, já havia mudado a minha vida. É por você que me esforço ainda mais, porque seu amor silencioso me ensinou que, por quem amamos, tudo vale e sempre valerá a pena, não importa o quão difícil seja a caminhada.

E por fim agradeço à minha orientadora Gabriela Puhl Rodrigues, por estar ao meu lado e sempre me fornecer o suporte e a atenção necessária para o desenvolvimento deste trabalho, agradeço o carinho, o tempo sacrificado e a paciência.

RESUMO

As abelhas desempenham papel fundamental na polinização de plantas nativas e cultivadas, contribuindo para a manutenção da biodiversidade e a produção de alimentos. A compreensão genética dessas espécies é muito importante, para sua conservação e para o fortalecimento da meliponicultura. Este trabalho teve como objetivo realizar a comparação e padronização de diferentes protocolos de extração de DNA, em abelhas nativas da espécie *Scaptotrigona depilis*, pertencentes ao meliponário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ/UFMS). A identificação molecular dessas abelhas é essencial para o avanço da meliponicultura e para estudos de conservação genética. Foram testados quatro protocolos distintos sendo eles SDS + Proteinase K, beads magnéticas, kit comercial Promega® e fenol-clorofórmio/SNET. As amostras foram analisadas por espectrofotometria (NanoDrop), determinando-se concentração e pureza do DNA por meio das razões A260/A280 e A260/A230. Todos os protocolos apresentaram eficiência na obtenção de DNA viável, porém o método de fenol-clorofórmio/SNET demonstrou melhor desempenho, com maiores rendimentos de DNA e pureza adequada para análises moleculares.

Palavras-chave: *Scaptotrigona depilis*; biologia molecular; fenol-clorofórmio; pureza do DNA; meliponicultura.

ABSTRACT

Bees play a fundamental role in the pollination of native and cultivated plants, contributing to biodiversity maintenance and food production. The genetic understanding of these species is crucial for their conservation and for strengthening meliponiculture. This study aimed to compare and standardize different DNA extraction protocols for native bees of the species *Scaptotrigona depilis*, belonging to the meliponary of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science (FAMEZ/UFMS). Molecular identification of these bees is essential for the advancement of meliponiculture and for genetic conservation studies. Four distinct protocols were tested: SDS + Proteinase K, magnetic beads, the commercial Promega® kit, and phenol-chloroform/SNET. Samples were analyzed by spectrophotometry (NanoDrop), determining DNA concentration and purity using the A260/A280 and A260/A230 ratios. All protocols showed efficiency in obtaining viable DNA; however, the phenol-chloroform/SNET method demonstrated the best performance, with higher DNA yields and purity suitable for molecular analyses.

Keywords: *Scaptotrigona depilis*; molecular biology; phenol-chloroform; DNA purity; meliponiculture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Coleta das amostras biológicas.....	17
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados obtidos nas extrações de DNA.....	22
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 A MELIPONICULTURA BRASILEIRA	12
2.2 METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ABELHAS	14
2.2.1 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA	14
2.2.2 IDENTIFICAÇÃO POR BIOLOGIA MOLECULAR	14
3. METODOLOGIA	15
3.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS	15
3.2 MATERIAL BIOLÓGICO	16
3.3 DETALHES SOBRE O PREPARO DAS AMOSTRAS	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.2 DISCUSSÃO COMPARATIVA DOS PROTOCOLOS	22
4.1 ANÁLISE DAS EXTRAÇÕES DE DNA	21
5. CONCLUSÃO	24
6. REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

As abelhas são insetos pertencentes à ordem *Hymenoptera* e à família *Apoidea*, compreendem aproximadamente 25 mil espécies conhecidas, que habitam o planeta há cerca de 120 milhões de anos (SILVA, 2014). Essas espécies podem apresentar comportamento solitário ou social, sendo as sociedades altamente organizadas e com divisão de tarefas entre rainhas, operárias e zangões (WITTER, 2014). O papel ecológico das abelhas é essencial, visto que atuam como principais agentes polinizadores das plantas com flores, garantindo a reprodução vegetal e a manutenção da biodiversidade (SOUZA, 2007). Estima-se que cerca de 87% das plantas com flores dependam, total ou parcialmente, da polinização realizada por abelhas (SILVA, 2014).

No Estado de Mato Grosso do Sul, já foram registradas mais de 386 espécies de abelhas, representando grande diversidade de gêneros e subfamílias (LIMA; SILVESTRE, 2017). De acordo com a Resolução nº 496, de 19 de agosto de 2020, é permitida apenas a criação de abelhas nativas, que ocorram naturalmente em cada região geográfica, conforme o Catálogo Nacional de Abelhas Nativas sem Ferrão (BRASIL, 2020). Segundo Sousa (2020), o estado abriga oito espécies registradas, embora novas atualizações indiquem a necessidade de revisão constante desses dados (MENEZES, 2023).

O Catálogo Nacional de Abelhas Nativas sem Ferrão, publicado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) em 2021, registra mais de 60 espécies manejadas no país. Entretanto, a diversidade real é muito maior, com cerca de 280 espécies documentadas em levantamentos nacionais (DOS SANTOS *et al.*, 2021). Essa grande diversidade e as semelhanças morfológicas entre espécies e subespécies tornam a identificação taxonômica um desafio. A variação de características físicas, como cor, tamanho e formato do corpo, pode dificultar a diferenciação entre grupos próximos, exigindo análises complementares com base em marcadores moleculares (WIEBKE *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a biologia molecular tem se tornado uma ferramenta essencial para a identificação precisa de espécies de abelhas, especialmente aquelas sem ferrão, que apresentam alta variação intraespecífica. O ponto de partida para qualquer estudo molecular é a extração de DNA, processo responsável por isolar o material genético em condições adequadas para análises como a Reação em Cadeia da

Polimerase (PCR), sequenciamento genético, genotipagem de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) e estudos com microssatélites (SIMÕES; BITONDI, 2021; CRUZ *et al.*, 2022).

A qualidade e pureza do DNA obtido são fatores determinantes para o sucesso dessas técnicas. Amostras degradadas ou contaminadas podem comprometer a amplificação e a leitura de sequências genéticas (ALVES; IMPERATRIZ-FONSECA, 2023). Além disso, o método de extração ideal varia conforme a espécie de abelha, o tipo de tecido utilizado tórax, pernas, antenas, espermateca ou larvas; os reagentes empregados como Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), detergentes e kits comerciais e as condições de incubação, como o tempo de lise e o uso de enzimas como a Proteinase K (CRUZ *et al.*, 2022; WIEBKE *et al.*, 2022).

Estudos recentes têm comparado diferentes protocolos de extração, analisando o rendimento do DNA (ng/μL), a razão de pureza (A260/A280) e a eficiência nas reações de PCR, buscando determinar o método mais adequado para cada grupo taxonômico (MORAIS *et al.*, 2023). A padronização desses protocolos é fundamental para garantir reprodutibilidade, escalabilidade e confiabilidade dos resultados, especialmente quando os estudos envolvem diversas populações ou diferentes laboratórios (FREITAS; PINHEIRO, 2022).

Apesar dos avanços, ainda existem lacunas importantes, especialmente no que diz respeito à padronização de protocolos para espécies nativas de abelhas do Centro-Oeste brasileiro, cuja diversidade genética ainda é pouco estudada. Dessa forma, este trabalho busca contribuir com o desenvolvimento de um protocolo eficiente e acessível de extração de DNA, adequado às condições laboratoriais locais e às características biológicas das abelhas nativas, visando subsidiar futuras pesquisas de conservação e manejo genético desses polinizadores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A meliponicultura brasileira

A prática de criação racional de abelhas sem ferrão é chamada de meliponicultura, ocorrendo em diversas partes do planeta, pois o resultado da criação desses animais gera diversos benefícios, ao planeta e a economia. Essas abelhas têm papel fundamental na polinização de espécies vegetais nativas e cultivadas,

contribuindo diretamente para a manutenção da biodiversidade e a produção agrícola sustentável (VENTURIERI, 2020).

O Brasil é considerado o país com maior diversidade de abelhas sem ferrão do mundo, com aproximadamente 250 a 300 espécies registradas, distribuídas principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

No estado de Mato Grosso do Sul, há mais de 380 espécies registradas, com ampla variedade de gêneros e subfamílias, evidenciando o potencial da região para estudos genéticos e de conservação (LIMA; SILVESTRE, 2017).

De acordo com a Resolução nº 496/2020 do Ministério do Meio Ambiente, é permitida apenas a criação de abelhas nativas que ocorrem naturalmente na região geográfica, conforme indicado no Catálogo Nacional de Abelhas Nativas sem Ferrão (BRASIL, 2020). Essa regulamentação é essencial para a conservação da fauna local, evitando a introdução de espécies exóticas que possam competir por recursos e ameaçar populações nativas.

A meliponicultura também possui importância socioeconômica, pois além de gerar renda para pequenos produtores rurais, pois a partir da produção, diversos produtos são comercializados como o mel, pólen e própolis tendo um alto valor nutricional, contribui também para a educação ambiental e a segurança alimentar (SOUSA, 2020).

Nos últimos anos, a crescente demanda por produtos naturais e sustentáveis aumentou o desenvolvimento de políticas públicas voltadas à expansão da atividade, como programas de incentivo ao meliponicultor e a inclusão das abelhas nativas no Cadastro Nacional de Atividades Econômicas (CNAE).

Porém, a expansão da meliponicultura também impõe desafios, como a necessidade de padronização de técnicas de manejos adequadas para cada espécie, controle sanitário e identificação correta das espécies manejadas, que muitas vezes apresentam diferenças morfológicas pequenas, dificultando a identificação assertiva, podendo assim trazer prejuízos em relação a produção, pois cada espécie tem suas necessidades específicas (MENEZES, 2023).

Nesse contexto, os estudos moleculares têm ganhado destaque por possibilitarem a identificação precisa e rápida de espécies, complementando a taxonomia tradicional e evitando erros de manejo e cruzamentos indesejados, pois é

necessário manter o controle das espécies criadas em cada região (WIEBKE *et al.*, 2022).

2.2 Metodologias para identificação das abelhas

A identificação das espécies de abelhas tem grande importância para o manejo eficiente e para manter a conservação da biodiversidade. Essa etapa permite entender a diversidade genética, monitorar populações ameaçadas e evitar problemas com identificações taxonômicas, especialmente em grupos com grande variação morfológica, como as abelhas sem ferrão (SILVA, 2014; SOUSA, 2020).

A forma mais utilizada para identificação das espécies é utilizando análises morfológicas, utilizando características como coloração, tamanho corporal, pilosidade e estrutura das asas, para diferenciar uma espécie da outra. Porém, as semelhanças entre as espécies acabam trazendo certas incertezas em relação a esse método, pois ele acaba não sendo totalmente confiável (WITTER, 2014).

Por essa razão, o avanço das técnicas moleculares tem trazido técnicas mais precisas e confiáveis, baseadas na análise direta do material genético das abelhas, onde a possibilidade de erro na hora de classificar a espécie se torna nula.

2.2.1 Identificação taxonômica

A taxonomia tradicional é baseada na morfologia comparada, utilizando caracteres anatômicos como forma das antenas, mandíbulas, asas e proporções corporais. Essas características são analisadas com auxílio de ferramentas de identificação biológica e microscopia estereoscópica (MICHENER, 2013).

Apesar de ser um método amplamente utilizado, a identificação taxonômica apresenta limitações importantes, principalmente quando aplicada a espécies com características bem semelhantes, ou quando as amostras estão danificadas (FERREIRA; ALMEIDA, 2019).

2.2.2 Identificação por biologia molecular

A biologia molecular revolucionou os estudos de biodiversidade por permitirem a análise direta do DNA, oferecendo um meio mais específico para identificação de espécies (SIMÕES; BITONDI, 2021).

O primeiro passo para qualquer estudo molecular é a extração de DNA, que tem o objetivo de isolar o material genético com alta pureza e integridade, com condições essenciais para se aplicar técnicas como PCR, sequenciamento genético, microsatélites e genotipagem de SNPs (CRUZ *et al.*, 2022; MORAIS *et al.*, 2023).

A qualidade do DNA extraído depende de fatores como o tipo de tecido utilizado, o método de extração celular, a presença de contaminantes e o tempo de armazenamento das amostras (ALVES; IMPERATRIZ-FONSECA, 2023).

Em abelhas, o material genético pode ser obtido da abelha inteira ou até mesmo de vários tecidos, incluindo tórax, antenas, pernas, espermateca e larvas, sendo o rendimento e pureza variáveis conforme o método aplicado (CRUZ *et al.*, 2022).

Diversos protocolos foram desenvolvidos para otimizar a extração de DNA em abelhas, como o uso de detergentes (CTAB, SDS), enzimas (Proteinase K) e solventes orgânicos (fenol e clorofórmio).

Segundo Green e Sambrook (2012), a combinação de SDS e Proteinase K permite uma lise eficiente e alta pureza do DNA, enquanto o método de fenol-clorofórmio ainda é considerado o mais robusto e reprodutível. Kits comerciais também são amplamente utilizados por sua praticidade e rapidez, embora apresentem custo mais elevado (BRUIJNS *et al.*, 2022).

Assim, o uso de técnicas moleculares favorece diversos meios, pois além de representar um avanço significativo para a meliponicultura, também favorece a conservação e contribui para a padronização de estudos comparativos.

3. METODOLOGIA

3.1 Local dos experimentos

As extrações de DNA foram realizadas na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul UFMS, nos laboratórios de Biologia Molecular, Virologia Veterinária que se encontram no setor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Famez) e nos laboratórios de Parasitologia Animal e Ecologia e Biologia Evolutiva, que pertence ao Instituto de Biociências (Inbio).

Os laboratórios possuem estrutura adequada para realizar os experimentos, contando com diversos equipamentos básicos, incluindo centrífugas, micropipetas, vórtex, banho-maria, termocicladores, capelas de fluxo laminar e freezers para armazenamento de amostras, sendo estes fundamentais para realizar as extrações de DNA necessárias.

Esses cuidados seguem as boas práticas laboratoriais descritas em protocolos de biologia molecular, que recomendam superfícies limpas, uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) e esterilização com álcool 70% e luz ultravioleta (GREEN; SAMBROOK, 2012).

3.2 Material Biológico

Para realização das extrações de DNA, foram utilizadas abelhas da espécie *Scaptotrigona depilis*, popularmente conhecidas como abelha “canudo”, que fazem parte do grupo de abelhas sem ferrão. As coletas foram realizadas no meliponário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pertencente à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, durante os meses de março e abril de 2025.

Foram realizadas duas coletas contendo em média 30 amostras cada com cerca de 60 indivíduos. A primeira foi efetuada no dia 24 de março e a segunda no dia 29 de abril de 2024. Para coleta, foram capturadas apenas abelhas operárias adultas, que estavam saindo da entrada das colmeias, com o auxílio de sugadores e tubos falcon de 50 ml, as abelhas foram apanhadas e levadas ao laboratório, (Figura 1).

A eutanásia dos insetos foi realizada por meio do método de congelamento, colocando os insetos diretamente em freezer, mantendo-os congelados a -20°C , até o período da extração de DNA. Este método assegura a viabilidade das amostras, mantendo a qualidade do material biológico e também evita o sofrimento desnecessário das abelhas (Brehm *et al.*, 2013).



Figura 1. Coleta das amostras biológicas. (Arquivo Pessoal)

3.3 Detalhes sobre o preparo das amostras

Para cada extração foram utilizadas 15 amostras de abelhas, realizando as extrações em triplicata, com 5 abelhas por microtubo.

Para o método de extração 1, as abelhas estavam congeladas e foram maceradas por um bastão de vidro.

No protocolo de extração 2, elas foram maceradas com nitrogênio líquido, usando pistilos e cadinhos.

Já no protocolo 3, os insetos foram macerados por esferas de aço.

E na extração 4 as amostras foram digeridas com enzimas e proteinase k.

3.3.1 Protocolo 1. Extração realizada no laboratório de Biologia Molecular BIOMOL - FAMEZ/UFMS.

O primeiro teste foi realizado no laboratório de Biologia Molecular (BIOMOL), onde a extração de DNA foi realizada seguindo o Procedimento Operacional Padrão POP nº LBM/001 – FAMEZ/UFMS (2023). sendo necessário modificar alguns passos, pois as amostras utilizadas para realizar o protocolo eram de sangue, tendo diferenças das amostras de abelha.

A parte do laboratório reservada para realizar os processos precisam de alguns cuidados, para evitar contaminação e manter a biossegurança, iniciando pela higienização da capela de fluxo laminar, usando álcool 70% e ligando a luz ultravioleta

por 15 minutos. Em seguida, os microtubos de 2 mL foram organizados e identificados para não misturar as amostras, por fim ligar os aparelhos que serão usados e configurar o termobloco na temperatura de 65 °C.

Foram realizadas três extrações, utilizando o material de 5 abelhas congeladas, por microtubo e junto a elas foi adicionado 350 µL de PBS, para realizar a maceração com o bastão de vidro. Após a maceração e homogeneização da amostra, 500 µL de SDS 20% e 10 µL de Proteinase K quando foram incorporados nos microtubos. As amostras foram incubadas a 65 °C por overnight para lise celular e desnaturação proteica.

Após a lise, 400 µL de clorofórmio e seguido de 300 µL de solução de precipitação proteica, foram adicionados a mistura, sendo todos os reagentes agitados vigorosamente em vórtex, posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 × g por 10 minutos. Ocorrendo uma precipitação, separando fase sólida e aquosa, para dar continuidade a parte líquida foi cuidadosamente transferido para um novo tubo foi acrescentado 1 mL de etanol 100% refrigerado, promovendo a precipitação do DNA.

As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 × g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet lavado com 1 mL de etanol 70%. Após nova centrifugação de 2 minutos e mesma velocidade, o etanol residual foi removido com micropipeta e os tubos foram deixados abertos em termobloco até a completa secagem da amostra.

O DNA foi então ressuspenso em 100 µL de tampão TE e incubado a 65 °C por 5 minutos para solubilização total do material, sendo posteriormente armazenado a – 20 °C até as análises posteriores.

3.3.2 Protocolo 2. Extração de DNA utilizando *beads* magnéticas realizado no laboratório de Virologia Veterinária - FAMEZ/UFMS.

A extração com *beads* magnéticas foi realizada seguindo o protocolo do Procedimento Operacional Padrão (POP LABVIR-001, versão 1.0, FAMEZ/UFMS, 2024), porém esse protocolo foi adaptado para os testes em abelhas, normalmente são feitas três lavagens, mas na extração em questão foram realizadas apenas duas lavagens. O método baseia-se na lise celular e posterior ligação seletiva do DNA às

partículas magnéticas carboxiladas, permitindo a purificação do material genético por meio de sucessivas lavagens.

As amostras biológicas foram separadas, maceradas e colocadas nos microtubos de 1,5 mL identificados, em seguida, foi adicionado 10 µL de Proteinase K e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente, para realizar a digestão proteica. Após esse processo, foi adicionado 350 µL de Isotiocianato de Guanidina (GITC) e 350 µL de isopropanol, realizando uma nova incubação de 2 minutos.

Posteriormente, foram incorporadas 100 µL da solução de partículas magnéticas carboxiladas, seguido de homogeneização e incubação por 3 minutos à temperatura ambiente.

O tubo foi então colocado sobre a estante magnética, e o sobrenadante removido cuidadosamente. O DNA ligado às partículas passou por duas etapas de lavagem sucessivas, utilizando GITC/isopropanol e etanol 70%, intercaladas por períodos de incubação na estante magnética.

Após a segunda lavagem, os microtubos foram deixados abertos por 2 minutos para evaporação do etanol residual, e o DNA foi ressuspenso adicionando-se 50 µL de tampão de eluição.

O material foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, seguido de homogeneização e nova incubação por 2 minutos na estante magnética. O DNA purificado foi então transferido para microtubos limpos e identificados e por fim foram armazenados a -20 °C, até as análises posteriores.

3.3.3 Protocolo 3. Extração de DNA utilizando kit comercial Promega®, realizado no laboratório de Ecologia e Biologia Evolutiva LEBio - UFMS.

O protocolo utilizado para extração é disponibilizado pela empresa do Kit Promega®. O processo realiza a lise química das células, seguida da precipitação das proteínas e purificação do DNA em solução alcoólica.

Inicialmente as amostras foram separadas nos microtubos identificados, maceradas por esferas de aço, até o conteúdo virar um pó fino. Posteriormente foi adicionado 300 µL solução de lise nuclear e 1,5 µL de RNase, após esse processo as amostras foram incubadas a 37 °C em banho-maria por 30 minutos e resfriadas em temperatura ambiente.

Com as amostras resfriadas acrescentou-se 100 µL de solução de precipitação de proteína as homogeneizando em vórtex e centrifugado a 14.000rpm por 5 minutos para ocorrer a precipitação.

Ocorrendo a divisão das partes sólidas e aquosas, o sobrenadante foi pipetado, pois é nele que fica o DNA e transferido para um novo microtubo identificado, adicionando também 300 µL de isopropanol em temperatura ambiente, realizando a mistura dos reagentes por inversão com cautela.

As amostras foram centrifugadas novamente a 14.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo o DNA foi lavado com 300 µL de etanol 70%, repetindo o processo duas vezes. Após a última centrifugação, o etanol foi removido, e as amostras deixadas a 65 °C por aproximadamente 1 hora para completa evaporação do solvente.

Por fim, o DNA foi ressuspense em 50 µL de solução de reidratação (DNA Rehydration Solution) e incubado “overnight” (durante a noite) em temperatura ambiente. As amostras foram então armazenadas a –20 °C até o momento da quantificação.

3.3.4 Protocolo 4. Procedimento de extração de DNA utilizando fenol clorofórmio/SNET (Sambrook and Russel 2001), realizado no laboratório de Parasitologia Animal – UFMS.

Para iniciar o processo foi preparado uma solução de 500 µL de SNET, contendo 10 µL proteinase K, mais a amostra mantidas a 55 °C overnight. Após esse processo foi adicionado 510 µL de fenol clorofórmio, incubando essa mistura em temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente a reação foi passada em vortex por 10 segundos e centrifugada a 5000rpm por 5 minutos.

Realizando esses processos a separação das fases, a fase líquida superior foi transferida para um outro microtubo identificado, adicionando a mesma quantidade pipetada de isopropanol e centrifugando a 13250rpm por 15 minutos, com temperatura controlada a 4°C.

Após o processo realizado, o sobrenadante foi desprezado, cuidando para não retirar de DNA depositado no fundo do microtubo, em seguida adicionado 1 ml de álcool etílico a 70%.

Novamente centrifugadas a 13250rpm por 5 minutos e o álcool foi descartado com cuidado, para não aspirar o pellet de DNA.

As amostras de DNA foram solubilizadas em 50 µL solução de TE1 e armazenadas a -20 °C até análise posterior.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise das extrações de DNA

A avaliação da qualidade e concentração do DNA foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro NanoDrop, utilizando os parâmetros de absorbância A260/A280 e A260/A230, que indicam, respectivamente, a pureza em relação a proteínas e contaminantes orgânicos (GARCÍA-ALEGRÍA *et al.*, 2020; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2021).

De acordo com a literatura, valores próximos de 1,8 e 2,0 para A260/A280 são indicativos de DNA puro, com baixa contaminação protéica (Wilfinger, 1997; Chen 2010; Firmansyah, 2023).

Enquanto razões entre 1,8 e 2,2 para A260/A230 indicam ausência de sais, fenóis e outros solventes residuais (MORAIS *et al.*, 2023; CRUZ *et al.*, 2022, Desjardins; Conklin 2010).

Os resultados das amostras obtidas neste estudo são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados obtidos nas extrações de DNA.

Protocolos *	Amostras	ng/ul	A260/A280	A260/230
1 – Biomol	A	558.3	2.08	2.09
	B	642.0	2.05	2.12
	C	612.8	2.04	2.09
2-Beads magn.	A	222,9	1.96	0.45
	B	180,3	1.95	0.53
	C	102,0	2.50	0.22
3-Kit comercial	A	160.0	1.41	1.41
	B	195.6	1.47	1.47
	C	182.0	1.77	1.25
4- Fenol clorof.	A	797.3	1.90	1.49
	B	674.9	1.95	1.63
	C	481.2	1.95	1.89

**Protocolo 1* - Extração realizada no laboratório de Biologia Molecular BIOMOL - FAMEZ/UFMS. *Protocolo 2* - Extração de DNA utilizando beads magnéticas realizado no laboratório de Virologia Veterinária - FAMEZ/UFMS. *Protocolo 3* - Extração de DNA utilizando kit comercial Promega®, realizado no laboratório de Ecologia e Biologia Evolutiva LEBio - UFMS. *Protocolo 4* - Procedimento de extração de DNA utilizando fenol clorofórmio/SNET, realizado no laboratório de Parasitologia Animal – UFMS.

Fonte: (Arquivo Pessoal)

4.2 Discussão comparativa dos protocolos

Em relação a capacidade de obter DNA das amostras extraídas, os quatro protocolos foram capazes de obter resultados promissores em relação a quantidade de material genético extraído, porém foi constatado diferenças significativas em relação a concentração de pureza entre os métodos, podendo ser influenciado por diversos fatores, como os reagentes e as técnicas utilizadas.

O Protocolo quatro utilizando Fenol-Clorofórmio/SNET, foi o que obteve respostas mais promissoras, analisando os resultados obtidos pelo NanoDrop, apresentando as maiores concentrações médias de DNA (481,2 a 797,3 ng/μL) e valores de pureza A260/A280 próximos de 1,9, o que indica uma alta eficiência na extração, pois tem altos valores de DNA, contaminação de proteínas e reagentes mínima.

Esses resultados são compatíveis com estudos que destacam o método do fenol clorofórmio como um dos mais eficazes para obtenção de DNA de alta pureza, especialmente em insetos e tecidos ricos em proteínas (DOYLE; DOYLE, 1990; GREEN; SAMBROOK, 2012).

Porém o método carrega dois pontos importantes, sendo um deles conter reagentes tóxicos a saúde humana, em seu protocolo, mas com manipulações cuidadosas continua sendo um método considerado padrão ouro, pois entrega um desempenho excepcional e tem um custo relativamente baixo para aplicação (CRUZ *et al.*, 2022). O segundo ponto a se analisar é a quantidade de DNA, pois segundo Sambrook e Russell (2001), as amostras com concentração superior a 500 ng/μL, são consideradas adequadas, mas devem ser diluídas, para não ocorrer inibição da PCR.

O Protocolo um SDS + Proteinase K também demonstrou elevado rendimento (558,3 a 642,0 ng/μL) de DNA e pureza bons, mesmo tendo certo tipo de contaminação (A260/A280 entre 2,04 e 2,08), mostrando que o uso combinado de detergentes aniônicos e enzimas proteolíticas proporciona uma lise eficiente e liberação adequada do DNA (GREEN; SAMBROOK, 2012; MORAIS *et al.*, 2023). As vantagens deste protocolo são, ser acessível, ter uma alta aplicabilidade em diversas amostras biológicas, obtendo resultados positivos em sua maioria.

Por outro lado, o Protocolo três, utilizando o Kit comercial da marca Promega® apresentou concentrações intermediárias (160,0 a 195,6 ng/μL) de DNA e valores de pureza mais baixos (1,41–1,77), o que sugere a possível presença de proteínas residuais. Entretanto, a praticidade e rapidez do método o tornam adequado para rotinas laboratoriais e análises de PCR, conforme apontado por Bruijns *et al.* (2022). Kits comerciais também garantem padronização e menor risco de erro humano, ainda que a custos mais elevados.

O Protocolo dois das Beads magnéticas adaptadas, foi o que apresentou concentração boas de DNA entre (102,0 a 222,9 ng/μL), porém as razões A260/A230 tiveram resultados muito abaixo do ideal (0,22 a 0,53), sugerindo contaminação por

solventes.

Resultados semelhantes foram relatados por García-Alegría et al. (2020), que observaram baixa eficiência de eluição em métodos magnéticos aplicados a tecidos pequenos, recomendando ajustes no tempo e temperatura de incubação para otimizar o rendimento.

Portanto, considerando os resultados obtidos neste estudo, o protocolo de fenol-clorofórmio/SNET destacou-se como o mais eficiente, conciliando alto rendimento, pureza adequada e viabilidade econômica, sendo o método mais indicado para futuras padronizações em abelhas da espécie *Scaptotrigona depilis*.

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que todos os protocolos foram capazes de isolar DNA em concentrações e purezas satisfatórias, mas o método de fenol-clorofórmio/SNET apresentou superioridade em relação ao rendimento e qualidade, sendo o mais recomendado para futuras aplicações.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, D. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Aplicações da biologia molecular na conservação de abelhas nativas. *Revista Brasileira de Entomologia*, 2023.
- BRASIL. Resolução nº 496, de 19 de agosto de 2020. Dispõe sobre a criação de abelhas nativas sem ferrão. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2020.
- BREHM, V. L. et al. Guidelines for the ethical use of insects in laboratory research. *Journal of Insect Ethics*, 2013.
- BRUIJNS, B. et al. Evaluation of commercial DNA extraction kits for insect tissues. *Molecular Ecology Resources*, 2022.
- CHEN, H.; RANGASAMY, M.; TAN, S. Y.; WANG, H.; SIEGFRIED, B. D. Evaluation of five methods for total DNA extraction from Western corn rootworm beetles. *PLOS ONE*, 2010.
- CRUZ, F. T. et al. Comparative analysis of DNA extraction methods in bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Apicultural Research*, 2022.
- DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 2010.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990.
- FERREIRA, P. C.; ALMEIDA, E. A. B. Taxonomia morfológica e molecular de abelhas sem ferrão: desafios e perspectivas. *Acta Biológica Catarinense*, 2019.
- FIRMANSYAH, N. E.; TAUFIK, M.; HARTAWAN, R.; MAHARDIKA, G. N. Comparison of three DNA extraction methods for PCR-based identification of insects. *PeerJ*, 2023.
- GARCÍA-ALEGRÍA, A. M. et al. Spectrophotometric assessment of DNA purity and concentration. *Analytical Biochemistry*, 2020.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003.
- LIMA, M. A.; SILVESTRE, R. Diversidade de abelhas no Mato Grosso do Sul: inventário e novas ocorrências. *Revista de Biologia Neotropical*, 2017.
- MENEZES, C. Atualização do catálogo de abelhas nativas do Mato Grosso do Sul. *Revista de Meliponicultura Brasileira*, 2023.
- MICHENER, C. D. *The Bees of the World*. 2. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2013.

- Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SILVA, M. D. Evolução e diversidade das abelhas no Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 2014.
- SIMÕES, Z. L. P.; BITONDI, M. M. G. Molecular biology and evolution of bees: from genes to behavior. *Annual Review of Entomology*, 2021.
- SOUSA, R. A. *Meliponicultura básica*. Série Meliponicultura sem Segredos. Brasília: Embrapa, 2020.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. *NanoDrop One Spectrophotometer User Guide*. Massachusetts: Thermo Fisher Scientific, 2021.
- VENTURIERI, G. C. *Criação de abelhas sem ferrão: a meliponicultura no Brasil*. 2. ed. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2020.
- WIEBKE, L. F. et al. Molecular identification of stingless bee species using mitochondrial markers. *Insect Systematics and Diversity*, 2022.
- WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; KRUG, D. E. Spectrophotometric and fluorometric methods for quantitating nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 1997.
- WITTER, S. Aspectos da biologia social das abelhas nativas. Porto Alegre: UFRGS, 2014.