

DISPOSITIVO ADAPTÁVEL DE SECAGEM PARA A CONDUÇÃO DE ANÁLISES DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

EDUARDO NUNES DELLAGOSTIN¹; AMANDA WEEGE DA SILVEIRA MARTINS²; EDUARDO BIERHALS BLÖDORN²; WILLIAM BORGES DOMINGUES²; GABRIEL DE OLIVEIRA URTIAGA²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹Laboratório de Genômica Estrutural – CDTec – UFPel – edu.ndell@gmail.com

²Laboratório de Genômica Estrutural – CDTec – UFPel – amandaweege98@gmail.com; edu.bblodorn@gmail.com; williamwwe@yahoo.com.br; gabrielurtiaga@gmail.com.

³Laboratório de Genômica Estrutural – CDTec – UFPel – fariascampoms@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A ciência forense busca amparar investigações criminais com dados científicos utilizando-se de amostras biológicas. Com o passar dos anos e com o avanço da tecnologia a análise das mesmas tem se tornado mais sensível (KLOOSTERMAN; SJERPS; QUAK, 2014). Entretanto, falsos positivos são empecilhos podendo até culpar indevidamente indivíduos que não cometem nenhum crime. Contaminações em rotinas de processamento de amostras podem se dar em diversas etapas, podendo ser no momento de coleta da amostra, durante o processamento dessa amostra em um laboratório ou até mesmo pode ocorrer uma contaminação prévia a todas as etapas (PICKRAHN et al., 2017). Metodologias de preservação de DNA seco em temperatura ambiente, durante sua preparação e evaporação do solvente estão sujeitas à contaminação, se não colocadas em tubos específicos, os quais têm valor superior ao tubo convencional (MONTGOMERY; BERKA; WEIMER, 2019).

Durante diversas rotinas é necessária a realização de secagens de amostras biológicas visando a obtenção de maiores concentrações para a análise das mesmas. Outra aplicação seria a utilização da secagem para o armazenamento de amostras como alternativa ao armazenamento em baixas temperaturas (FRIPIAT et al., 2011), entretanto é de suma importância a vedação das mesmas para evitar a contaminação cruzada (ARMANI et al., 2009). Existem métodos que não se utilizam de fontes de calor para a retirada do solvente de amostras, como por exemplo a utilização de vácuo e centrifugação (SÁNCHEZ; BETSOU; MATHIESON, 2019), entretanto nem todos laboratórios contam com o equipamento que permita tal procedimento. A secagem pela aplicação de calor se mostra com eficiência similar e um menor custo (SEBASTIANI et al., 2017), porém até o momento não foi desenvolvido um método ou dispositivo eficiente para a prevenção da contaminação de amostras biológicas que passaram pela metodologia de secagem/concentração pela aplicação de calor.

O objetivo do nosso trabalho foi desenvolver e testar um dispositivo que permitisse a evaporação de solventes em recipientes utilizados em rotinas com amostras biológicas e que evitasse a contaminação cruzada e de agentes externos à amostra.

2. METODOLOGIA

2.1 – Desenho do protótipo e fabricação

Desenvolveu-se dispositivo oco adaptável a tubos utilizados em rotinas laboratoriais, caracterizado por possuir orifícios passantes na base inferior e superior da estrutura, localizados diametralmente opostos em relação ao eixo

vertical da estrutura, e barreiras internas superior e inferior, posicionadas paralelamente entre si e também em lados opostos em relação ao eixo vertical da estrutura, formando regiões de segmento circular inferior e superior nas bases internas inferior e superior da estrutura cilíndrica.

Os orifícios de ventilação constituem os meios de comunicação do interior da estrutura cilíndrica com o meio externo ao dispositivo. As barreiras internas limitam o posicionamento dos ditos orifícios na região periférica das bases da estrutura, gerando um arranjo interno capaz de exigir que vapores de solvente, em percurso por através do dispositivo, perfaçam necessariamente um caminho em forma de "S". Após o desenho, foi realizada a impressão do dispositivo utilizando impressora 3D utilizando filamento de ABS (Acrilonitrila-butadieno-estireno).

2.2 – Teste de evaporação e contaminação

Testou-se o protótipo para sua capacidade de permitir a evaporação de solventes e para sua capacidade de evitar a contaminação por DNA exógeno. Dez microtubos eppendorf foram divididos dois grupos de 5 microtubos contendo 30 µL de água estéril cada. Um grupo permaneceu destampado e outro recebeu o protótipo do dispositivo. As aberturas dos tubos ficaram direcionadas a uma câmara de 2000 mm³ e foram submetidos a uma temperatura de 60°C durante 3 horas. No interior da câmara, foram realizados três borrifos do tipo pulverizado de uma solução contendo dois fragmentos de genes de origem e tamanho conhecidos (500 e 800 pares de base) em concentração de 25 ng/µL ao final da primeira hora e mais três borrifos ao final da segunda hora. Ao final da terceira hora foi realizada a eluição com 10 µL de água estéril.

2.3 – Reação em cadeia da polimerase e eletroforese

Para verificar a presença dos fragmentos no volume eluído foi realizada uma PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando primers específicos para tais fragmentos. Após, para a visualização foi realizada uma corrida eletroforetica em gel de agarose 1,2% e em seguida o gel foi visualizado sob luz UV para verificação da presença de bandas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da tecnologia de impressão 3D foi possível a confecção dos protótipos do dispositivo que tiveram perfeito encaixe em microtubos eppendorf de 1,5mL (Figura 1).



Figura 1. Protótipo de dispositivo em um microtubo eppendorf

A evaporação se mostrou similar entre o grupo o qual foram mantidas as tampas abertas sem o dispositivo e o grupo que continha o dispositivo na abertura do tubo, mostrando assim que o mesmo não atrapalhou a passagem do vapor para o meio externo. Além disso, os resultados do teste de borriço de DNA mostraram que não houve a entrada de material do meio externo nos tubos com o dispositivo, evitando assim a contaminação da amostra que havia dentro do tubo (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado dos testes de secagem de amostras quanto à contaminação e ao uso do dispositivo de secagem.

	Com Dispositivo Tubo 1	Com Dispositivo Tubo 2	Com Dispositivo Tubo 3	Com Dispositivo Tubo 4	Com Dispositivo Tubo 5	Sem Dispositivo Tubo 1	Sem Dispositivo Tubo 2	Sem Dispositivo Tubo 3	Sem Dispositivo Tubo 4	Sem Dispositivo Tubo 5
Contaminação 500pb	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Contaminação 800pb	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não

4. CONCLUSÕES

Através do presente estudo foi possível o desenvolvimento de uma patente de inovação relacionada à tecnologia descrita no presente trabalho, a qual apresenta caráter inovador no âmbito da proteção de amostras durante o processo de secagem para a utilização em análises. A tecnologia está disponível para consulta no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob numero de registro BR10201901303 e apta para a transferência tecnológica para o setor comercial em biotecnologia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMANI, M. et al. 2D-PCR: a method of mapping DNA in tissue sections. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 24, p. 3526, 2009.
- FRIPIAT, C. et al. Evaluation of novel forensic DNA storage methodologies. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 5, p. 386–392, nov. 2011.
- KLOOSTERMAN, A.; SJERPS, M.; QUAK, A. Error rates in forensic DNA analysis: Definition, numbers, impact and communication. **Forensic Science International: Genetics**, v. 12, p. 77–85, set. 2014.
- MONTGOMERY, M. C.; BERKA, J.; WEIMER, E. T. Suitability of dried DNA for long-range PCR amplification and HLA typing by next-generation sequencing. **Human Immunology**, v. 80, n. 2, p. 135–139, fev. 2019.
- PICKRAHN, I. et al. Contamination incidents in the pre-analytical phase of forensic DNA analysis in Austria—Statistics of 17 years. **Forensic Science International: Genetics**, v. 31, p. 12–18, nov. 2017.
- SÁNCHEZ, I.; BETSOU, F.; MATHIESON, W. Does vacuum centrifugal concentration reduce yield or quality of nucleic acids extracted from FFPE biospecimens? **Analytical Biochemistry**, v. 566, p. 16–19, fev. 2019.
- SEBASTIANI, A. et al. Comparison of speed-vacuum method and heat-drying method to measure brain water content of small brain samples. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 276, p. 73–78, jan. 2017.