

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ENGENHARIA FLORESTAL

**MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL EM
PLANTAS JOVENS DE *Mauritia flexuosa* L. f.: UM PROTOCOLO
OTIMIZADO**

ISADORA MILENY COSTA DE BRITO



Isadora Mileny Costa de Brito

**MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL EM PLANTAS
JOVENS DE *Mauritia flexuosa* L. f.: UM PROTOCOLO
OTIMIZADO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Ciências
Agrárias da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial, para a
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio
Nascimento Lopes

Montes Claros
Instituto de Ciências Agrárias – UFMG

2018

Isadora Mileny Costa de Brito. **MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE
RNA TOTAL EM PLANTAS JOVENS DE *Mauritia flexuosa* L. f.:
UM PROTOCOLO OTIMIZADO**

Aprovada pela banca examinadora constituída por:

Dra. Cristina de Paula Santos Martins - Pós-Doutoranda
UFMG

Prof. Dr. Leandro Silva de Oliveira
UFMG

Prof. Dr. Paulo Sérgio Nascimento Lopes - Orientador ICA/UFMG

Montes Claros, 5 de dezembro de 2018.

Ao curso de Engenharia Florestal da UFMG/UFVJM, as pessoas que convivi ao longo dessa caminhada e a Cristina de Paula Santos Martins por ter acreditado em meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Paulo Sérgio Nascimento Lopes pela orientação, apoio e confiança. A pós-doutora Cristina de Paula Santos Martins, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho. Ao GEFEN pelo incentivo e suporte para realização deste trabalho. À UFMG, ao laboratório de Biotecnologia que me forneceram ferramentas fundamentais para concretização desse trabalho. À UFVJM por todo o conhecimento técnico/teórico. Agradeço imensamente à Deus, por ter me concedido saúde, força e disposição para realizar meus sonhos. Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Ao meu esposo Igor pela compreensão e companheirismo. Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado nas lutas diárias.

RESUMO

O Buritizeiro (*Mauritia Flexuosa*) é uma das espécies mais numerosas da família Arecaceae e está entre as palmeiras mais utilizadas no mundo. O buritizeiro é uma espécie comum em bosque fechados ou abertos, terrenos com baixa drenagem e de baixa altitude, as Veredas. Mesmo estando em Áreas de Preservação Permanente os buritizais estão sujeitos a atividades antrópicas, como o desmatamento para implantação de pastagens e o extrativismo. Diante dessa interface são necessários estudos visando a conservação dessa espécie através de técnicas biotecnológicas. Avanços na genética criaram um cenário de perspectivas para o conhecimento da regulação gênica, através do acesso a técnicas como o PCR em tempo real, elevando a precisão de programas de conservação que executem o mapeamento e projetem a conservação de espécies florestais. O uso do RNA em técnicas biotecnológicas, porém para o isolamento do RNA de alto rendimento e pureza é necessário pesquisas isoladas para cada tipo de espécie e tecido. Visando a obtenção de um protocolo ideal para extração de RNA para raiz e folha de *Mauritia flexuosa*, buscamos com este trabalho identificar a metodologia mais adequada para isolar amostras de RNA, avaliar a integridade das amostras de RNA e possíveis contaminações. Objetivou-se também validar a qualidade do cDNA analisado via qPCR. Os tecidos vegetais analisados foram folhas e raízes de *Mauritia flexuosa* de mudas pré-estabelecidas em viveiro. O Trizol[®] reagente foi o protocolo mais eficaz para extração de RNA de folhas e raízes e sem contaminação por polifenóis, polissacarídeos e proteínas. A amplificação do gene via qPCR foi eficaz, indicando alta qualidade das amostras, podendo servir para análises moleculares de *Mauritia flexuosa*. A Ubiquitina, gene endógeno, obteve a melhor resposta para validar o cDNA.

Palavras-chave: Ácidos nucleicos. *Mauritia flexuosa*. cDNA. Produtos Florestais Não-Madeireiros. Veredas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Amostras avaliadas via qPCR.....	5
FIGURA 2. Embalagem do reagente TRI GRÁFICO 1 - Concentração de RNA (ng/μL) de amostras de RNA total extraídos de folhas e raízes <i>M. flexuosa</i> , utilizando os protocolos CTAB microextração, Fenol, CTAB macroextração e TRI Reagente® Sigma.....	6
GRÁFICO 2 - Expressão relativa de mRNA para folhas e raízes de <i>Maurita flexuosa</i>	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras avaliadas via qPCR.....	11
Tabela 2 - Grau de pureza em espectrofotômetro e erro(relação 260/230 e 260/280) de amostras de RNA total extraídos de folhas e raízes de plantas jovens de <i>M. flexuosa</i>	14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT2–Actina

ANOVA – Análise de variância

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

°C – Graus Celsius

CTAB –Brometo de Cetiltrimetilamônio

DEPC –Dietilpirocarbonato

DNA– Ácido desoxirribonucleico

DNase– Desoxirribonuclease

GAPC2–Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GEFEN – Grupo de Estudos em Frutíferas Exóticas Nativas do Cerrado

ml – Mililitro

M–Molaridade

mRNA–Ácido desoxirribonucleico mensageiro

nm – Nanômetro

ng/μL– Nano grama por microlitro

PCR – Reação em cadeia polimerase

RNA –Ácido ribonucleico

RNAses – Ribonucleases

qPCR– Reação cadeia polimerase em tempo real

Rpm – Rotação por minuto

RT – Transcriptase reversa

UBC2–Ubiquitina

UFVJM – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Veredas.....	2
2.2 Buritizeiro.....	3
2.3 Protocolos para extração de RNA.....	4
4. MATERIAIS E MÉTODOS	8
4.1 Protocolos de Extração RNA total.....	9
4.1.1 Fenol á quente.....	9
4.2 Validação da qualidade do cDNA	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
6. CONCLUSÃO.....	16
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

1. INTRODUÇÃO

A América tropical possui elevada diversidade de espécies frutíferas com importantes características nutricionais e medicinais. Uma das maneiras para retirar proventos da floresta é através da colheita de produtos florestais não madeireiros (PFNMs) possibilitando a geração de receita para as comunidades rurais (NEPSTAD e SCHWAERTMAN, 1992; PANAYATOU e ASHTON, 1992).

O Buritizeiro (*Mauritia flexuosa*) é uma das espécies mais numerosas da família Arecaceae no Brasil, além de estar entre as palmas mais utilizadas no mundo (RODRIGUES *et al.*, 2018; AGOSTINI-COSTA, 2018). Essa espécie está entre as palmeiras com maior propagação na América do Sul tropical (VIRANPOGSE *et al.*, 2017) em que existe um biossistema de áreas úmidas dentro de um horizonte tropical e de Cerrado (RULL e MONTOYA, 2014).

O buritizeiro é uma espécie comum encontrada nas veredas (BARBOSA *et al.*, 2009). Nas veredas o buriti contribui com parte significativa no acúmulo de teores de carbono, devido ao seu grande sistema radicular subterrâneo e hiperdominância em solos hidromórficos (HOUSEHOLDER *et al.*, 2012). Os buritizais têm função de relevância na estabilidade das veredas, onde são dominantes visto que cooperam na sustentação da umidade do solo e dos cursos d' água, principalmente na estação seca. Os buritizeiros impedem que os detritos causem o assoreamento dos corpos d' água, além de formar refúgios e fonte de alimento para a fauna (RIGUEIRA *et al.*, 2002; FERNANDES-PINTO e SARAIVA, 2006B; COMAPA, 2005; CALDERÓN, 2002).

Obstáculos feitos pelo homem ao fluxo genético, como estradas e desmembramentos de habitats, podem gerar diferença no material genético dos indivíduos de *M. flexuosa* (VIRAPONGSE *et al.*, 2017). Atividades antrópicas como a supressão de florestas tropicais e urbanização exigem das populações naturais uma diversidade genética condizente para acompanhar as transformações bruscas nos ecossistemas, diminuindo as chances de extinções a nível local (FEDERMAN *et al.*, 2013).

Há necessidade de estudos que aborde a atuação dos genes que predizem alterações moleculares submetidos a diversas condições, como estresses bióticos e abióticos, sendo que essa área carece de aplicações em pesquisas básicas e aplicadas. Logo, é importante estudos de expressão de genes relacionados a esses estresses, a exemplo, otimização de protocolos para espécies/tecidos, extrações com alta quantidade e qualidade. Avanços na genética criaram um cenário de perspectivas para o conhecimento da regulação gênica, através do acesso a técnicas como o qPCR, elevando a precisão de programas de conservação que executem o mapeamento e projetem a conservação de espécies florestais (GARCIA, 1995).

Visando a obtenção de um protocolo ideal para extração de RNA para folha e raiz de *M. flexuosa*, buscamos com este trabalho identificar a metodologia mais adequada para isolar amostras de RNA, avaliar a integridade das amostras de RNA e possíveis contaminações. Objetivou-se também validar a qualidade do cDNA analisado via qPCR.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Veredas

As formações vegetais conhecidas como veredas distinguem-se entre as fitofisionomias do Cerrado (GUIMARÃES *et al.*, 2017). As veredas são ecossistemas com solos hidromórficos estruturados em solos arenosos com eminente concentração de turfa encontrando-se encarregadas em abastecer aquíferos (EITEN, 1994). Ao decorrer dos cursos da água, o buriti é dominante e há presença de espécies arbustivas e herbáceas (PIMENTA e DE MARCO, 2015). As veredas são de suma importância devido à conservação de bacias hidrográficas, que compõem aproximadamente 80% dos cursos de água da região do noroeste de Minas Gerais (COSTA-MILANEZ *et al.*, 2014)

As veredas são componentes dos horizontes contínuos e vastos partilhados em áreas nativas (Eiten, 1993), sua largura pode variar de dezenas de metros a algumas centenas (MAILLARD *et al.*, 2008). A começar da relação com a flora do cerrado até o ponto mais baixo do vale, as veredas típicas apresentam o seguimento de pastagens, arbusto e árvores, onde a *M. flexuosa* predomina (MAILLARD *et al.*, 2008).

As veredas têm relevância para o Bioma cerrado, visto sua grandiosidade por ser abrigo para fauna e flora, moderador dos aquíferos e por proteger e abastecer água em quantidade e qualidade (BASTOS e FERREIRA, 2010). A vereda tem ao seu redor o Campo Limpo, com umidade considerável, e os buritis possuem cobertura de 5% a 10%, com porte médio de altura de 12 a 15 metros (RIBEIRO e WALTER, 1998).

As veredas são de suma importância devido à conservação de bacias hidrográficas, que compõem aproximadamente 80% dos cursos de água da região do noroeste de Minas Gerais (COSTA-MILANEZ *et al.*, 2014). Porém as veredas são intensamente exploradas e assoladas, mesmo com sua relevância para manutenção da diversidade (GUIMARÃES *et al.*, 2017). Conforme Ratter *et al.*, (1997) e Meirelles (2004), a ampliação das fronteiras agrícolas, o crescimento da urbanização e a exploração sem manejo adequado dos bens naturais conduziu ao acúmulo de sedimentos em nascentes, alterações nos atributos do solo e redução da vazão d'água.

2.2 Buritizeiro

M. flexuosa L. f. (Arecaceae), popularmente conhecida como buriti, é largamente distribuído bioma Amazônico e Cerrado. Nas veredas, formação vegetal do Cerrado, a *M. flexuosa* é uma espécie chave para definição dessa composição, devido ao seu alto valor no ecossistema e sua superior densidade contrastada com demais espécies florestais que sucede essa fitofisionomia (RESENDE *et al.*, 2012). Possui enorme importância ambiental, educacional e econômica (Koolen *et al.*, 2013), apresenta potencial para geração de economia para as localidades de ocorrência da espécie, sendo que o extrativismo do buriti já é realizado em determinados lugares (REZENDE *et al.*, 2012).

Os buritizeiros estão situados em diversas formações vegetais, como as veredas, sendo mais fácil de encontrar em locais inundados, gerando comunidades características (RUIZ e ALENCAR, 2004). O buritizeiro é encontrado em solos fluviais na região da floresta Amazônica e no bioma Cerrado (DRANSFIELD *et al.*, 2008; LORENZI *et al.*, 2010). Em solos

hidromórficos da floresta amazônica são chamadas de "buritizais" (ALMEIDA, 2016; SOUZA, 2016).

Dos componentes do fruto do buriti, a fração comestível, a polpa, se trata da maior utilização devido ao teor de nutrientes (KOOLEN *et al.*, 2018). Por ano, uma palmeira produz em média 290 kg de frutos (KOOLEN *et al.*, 2018). A safra do fruto está estimada em uma produção de 70 000 toneladas por safra (BOVI, 2015). Segundo o censo agropecuário do Brasil, em 2017 a extração do buriti gerou 491 toneladas, volume 1,9% acima do registrado no período anterior e uma produção de 2546 reais (IBGE, 2017).

A degradação das áreas de ocorrência natural dos buritizeiros, causada pelo homem para implantar pastos para bovinocultura ou para culturas de elevada cotação de comércio altera o meio natural da floresta de forma irreversível (VIEIRA *et al.*, 2018). A maior parte da palmeira tem uso amplo, e parte deles tem apresentado enorme valia (VIRAPONGSE *et al.*, 2017). O manejo inadequado para colheita de frutas acomete a capacidade da *M. flexuosa* na economia a nível agrícola e local (CUNHA *et al.*, 2012). Porém algumas áreas ainda não são atingidas pelo desmatamento de florestas em solos inundados por não oferecerem condições para mecanização.

O extrativismo pode acarretar alterações na proporção de plantas masculinas e femininas de uma espécie vegetal (Kusters, 2009), dentre as práticas que podem ser causa dessas alterações está o tombamento de palmeiras, o que coloca em risco a eficiência da reprodução (BRITES e MORSELLO, 2016). Nos anos 2000 a obtenção de frutos foi reduzida devido à coleta excessiva de plantas femininas, gerando menor conectividade com o comércio (HORN *et al.*, 2013). Estudos encadeados e empenho para um manejo adequado estão sendo geridos para *Mauritia flexuosa* (VIRAPONGSE *et al.*, 2017).

2.3 Protocolos para extração de RNA

Pesquisas na área de biologia molecular em plantas é alvo de estudos condizente às dificuldades de extração de RNA de alta qualidade, devido à alta quantidade de compostos fenólicos e polissacarídeos encontrados em espécies vegetais (SALZMAN e ZHU-SALMAN, 1999). O RNA

é estruturado por uma longa cadeia não ramificada de fita única composta por ribonucleotídeos, os quais são formados por uma ribose (açúcar), um fosfato e as bases nitrogenadas, unidas entre si por uma ligação fosfodiéster (BASTOS *et al.*, 2016). Em procedimentos de biologia molecular o RNA é bastante utilizado em pesquisas, dentre esses procedimentos está a análise de expressão gênica mediante arranjos de reação em cadeia da polimerase quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR) (TONI *et al.*, 2018) (FIGURA 1).



FIGURA 1- Amostras avaliadas via qPCR. Fonte: Da autora, 2018.

É imprescindível a escolha de um procedimento adequado para extração de RNA para a espécie a ser estudada (KIEFER *et al.*, 2000; KALUZNA *et al.*, 2016). Extrair RNA de alta qualidade é indispensável para pesquisar traços da expressão gênica, fundamentado em técnicas de Northern, qRT-PCR, bibliotecas de cDNA, amplificação por PCR, ou análises de Microarray (GEHRIG *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2002; IBELLI *et al.* 2007). Quando os polissacarídeos precipitam e ligam com o RNA elas ficam inapropriadas para a síntese de cDNA ou hibridação na análise de Northernblot (RUBIO-PINÑA e VÁZQUEZ-FLOTA, 2008).

Kits comerciais são empregados por estudiosos que estão disponíveis no mercado e que favorecem extrações imediatas de RNA com elevada qualidade e quantidade necessária para pesquisas de grande

retribuição, porém são de custo elevado (KALUZNA *et al.*, 2016). Para conseguir um RNA de elevada qualidade com o material vegetal, diversos procedimentos e/ou kits necessitam ser minuciosamente estudado primeiramente para ser utilizado em procedimentos de delineamento de expressão gênica (KALUZNA *et al.*, 2016).

Extração de RNA com fenol-clorofórmio aplicando substâncias químicas constituídas de Trizol (FIGURA 2) tem habitualmente menor custo, porém há presença de quantidades expressivas de impurezas que são capazes de perdurar no material, como fenol, guanidina, clorofórmio e sal, podem influenciar nas análises de RNA em espectrofotômetros e em ponderações de relevância do trabalho (TONI *et al.*, 2018).



FIGURA 2. Embalagem do reagente TRI Reagent®. Fonte: Da autora, 2018.

A extração de RNA se torna difícil dado a sensibilidade do RNA à degradação pela RNAses (RUBIO- PINÃ e VÁZQUEZ-FLOTA, 2008). Metodologias são pesquisadas constantemente para ajustar técnicas a diversos organismos e/ou tecidos que é imprescindível a construção de protocolos para extração de RNA com alta quantidade e acurácia (RUBIO- PINÃ e VÁZQUEZ-FLOTA, 2008; GHAHARI *et al.*, 2108).

Grandes quantidades de polissacarídeos co-precipitam junto ao RNA, influenciando na qualidade e quantidade de RNA (WANG *et al.*, 2007). Os polifenóis ou polissacarídeos pronunciados na amostra geram nos procedimentos um produto com RNA baixo ou criam agregados impuros,

gerando em RNA de baixa qualidade, tornando-se desapropriado para a primeira cadeia de síntese de cDNA e RT- RT-PCR análise (KOONJUL *et al.*, 1999; BIRTIC e KRANNER, 2006). A integridade do RNA na presença das RNases fica comprometida, devido ao poder de contaminar reagentes e amostras biológicas no período que antecede ao método do qPCR (DETTOGNI e LOURO, 2017; STÅHLBERG e KUBISTA, 2018).

Vários reagentes já foram testados para a extração de RNA total de diversas espécies. As técnicas para isolamento de RNA são fundamentadas na desnaturação e na lise das células por meio dos fenóis e sais de guanidina que propiciam a dispensa dos ácidos nucleicos totais e na presença de inibidores que impossibilitam a ação de ribonucleases (AUSUBEL *et al.*, 1998). Para desmembrar o RNA em duas fases distintas pode-se usar o fenol e o clorofórmio (RUBIO- PINA e VÁZQUEZ-FLOTA, 2008; VORREITER *et al.*, 2016). Para precipitar o RNA em pequenas concentrações alguns protocolos faz-se o uso do cloreto de lítio (RUBIO- PINA e VÁZQUEZ-FLOTA, 2008). A extração orgânica com tiocianato ácido de guanidina-fenol-clorofórmio, de Chomczynski e Sacchié (1987), utilizada em uma fase de quatro horas para isolar o RNA (DETTOGNI e LOURO, 2017).

Para isolamento de células de RNA, diversas metodologias foram expostas (CLICK e HACETT, 1966), dentre elas podemos citar a extração via Trizol e o CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio). A extração do RNA total utilizando o Trizol é uma técnica prática e de bom custo-benefício (BILGIN *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2016). O CTAB macroextração (BEKESIOVA, 1999) é empregado por ser simples e rápido, podendo ser moldado de diversas formas, para o emprego em diferentes espécies e otimizando a quantidade do material vegetal.

São usadas para contribuir no reconhecimento de genes que se expõe distintivamente em populações a nível celular, a expressão dos genes é feita com base na extração de RNA, convertendo mRNA em cDNA, possibilitado pelo emprego de ferramentas de DNA combinante e ao prático manuseio de grande parte de espécies de mRNA (ZHANG *et al.*, 1998).

A biotecnologia mostra-se como relevante ferramenta para elucidação de genes que afetam a qualidade, a manipulação, a identificação e

preservação do material genético, permitindo o monitoramento de todo o processo produtivo e as respostas a fragmentação das florestas.

A evolução de procedimentos moleculares fez com que a ciência buscasse técnicas atuais e válidas para extração de DNA e RNA, assim os dados devem ter exatidão e excelência para uma extração de ácidos nucleicos de alto padrão (EL-ASHRAM *et al.*, 2016; TONI *et al.*, 2018). Isolar o RNA de qualidade da *M. flexuosa* é pré-requisito para a descoberta de genes e estudos de validação funcional. O buriti apresenta polifenóis (Kollen *et al.*, 2013; Bataglion *et al.*, 2014; Cândido *et al.*, 2015) e polissacarídeos (Cantu-Jugles *et al.*, 2015; Cordeiro *et al.*, 2015; Nobre *et al.*, 2018) que atrapalham a extração de RNA com os protocolos e que necessitam de alta demanda de prova biológica (EL-ASHRAM *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016). Não há um protocolo ideal para extração de RNA para todas as espécies, necessitando de alterações de acordo a espécie vegetal (SILVA *et al.*, 2016; MORANTE-CARRIEL, 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram testados quatro métodos de extração de RNA: Fenol á quente, adaptado por Scherrer e Darnell (1961); Trizol reagente®; CTAB microextração, adaptado por Chang e colaboradores (1993) e CTAB macroextração, adaptado por Bekesiova e colaboradores (1999).

Os tecidos vegetais analisados foram folhas e raízes de *M. flexuosa* de plantas jovens pré-estabelecidas do Viveiro do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Geral localizado no município de Montes Claros/ MG. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatros repetições com folhas jovens de *M. flexuosa*.

4.1 Protocolos de Extração RNA total

4.1.1 Fenol á quente

No protocolo descrito por Scherrer e Darnell (1962) amostra de 100 mg de material vegetal macerado foi condicionado em um microtubo de 2 ml. Após foi adicionado 500 µL de fenol ácido, sendo em seguida agitado em vórtex por 10 segundos. Posteriormente, incubou-se em banho maria a 65°C por uma hora, vortexando repetidamente á cada 10 minutos. A amostra foi incubada em banho de gelo por 5 minutos e logo após, centrifugada por 5 minutos á 14.000 rpm. A fase superior foi transferida para um novo microtubo de 1,5 ml. Mais uma vez, adicionou-se 500µL de fenol ácido e agitou-se em vórtex por 10 segundos. Incubou-se a amostra em banho de gelo por 5 minutos e após levou-a á centrifuga por 5 minutos á 3.000 rpm. A parte flutuante foi transferida para um novo microtubo de 1,5 ml. Adicionou-se 500 µl de clorofórmio e vortexou por 10 segundos. Sucessivamente, o material vegetal foi centrifugado á 3.000 rpm por 5 minutos. A fase superior foi levada á um novo microtubo de 1,5 ml, sendo adicionado 50 µl de acetato de sódio á 3M (pH á 5,2) e 1 ml de etanol gelado. Logo, incubou-se a amostra por 1 hora á -20°C e centrifugou-se á 4.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 ml de etanol gelado á 70%. O sobrenadante foi retirado e o pellet secado por 10 minutos. Após esse período o pellet foi ressuspendido em 30 µL de água DEPC 0,1% e armazenado a -20° para em seguida quantificar o RNA total extraído em espectrofotômetro.

4.1.2 Trizol reagente®

No protocolo utilizando Trizol reagente®, acrescentou-se 1mL de Trizol em um microtubo com 100 mg de material vegetal macerado e a amostra foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a 12.000 rpm por 15 minutos. Após adicionou-se 200 µL de clorofórmio, agitou-se por cinco minutos e deixado em repouso na posição horizontal durante 10 minutos, á temperatura ambiente. Transferiu-se a fase aquosa para um novo microtubo acrescentado 0,5 ml de isopropanol. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições. Descartou-se sobrenadante e adicionou-se 1 ml de etanol 75%, centrifugando-se a 7.500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Foi

descartado o sobrenadante, e após secar o etanol, o pellet foi dissolvido em 30 µL de água com DEPC 0,1% para em seguida quantificar o RNA total em espectrofotômetro (INVITROGEN®).

4.1.3 CTAB microextração

O método de extração de RNA com CTAB utilizado no trabalho foi descrito por Chang *et al.*, (1993). Em cada microtubo, contendo 100 mg do material macerado, foram adicionados 500 µL de tampão de extração [2% (p/v) CTA (cethyltrimethylammoniumbromide), 2% (p/v) PVP, 100 mM de Tris-HCL, 25 mM de EDTA, 2,0 mM de NaCl]. Acrescentou-se 900 µl de clorofórmio e incubou-se a amostra a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida centrifugou-se a 7.500 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo de 2,0 ml e acrescido de 300 µL de clorofórmio e novamente centrifugado a 7.500 rpm durante 5 minutos, O sobrenadante foi transferido para novo microtubo de 1,5 ml e adicionado cloreto de lítio 10,0M por 24 horas a 4°C para precipitação do RNA, seguido novamente da centrifugação a 8.000 rpm durante 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet secado por 10 minutos, e ressuspendido em 30 µL de água com DEPC 0,1%.

4.1.4 CTAB macroextração

Para extração de RNA com CTAB foi utilizada a metodologia descrita por Bekesiova *et al.*, (1999). Em cada microtubo de 2 ml contendo 100 mg do material vegetal macerado, foram adicionados 700 µL de tampão de extração [2% (p/v) CTAB (cethyltrimethylammoniumbromide), 2% (p/v) PVP, 100 mM de Tris-HCL, 25 mM de EDTA 25 mM de NaCl] logo foram agitados suavemente e postos na incubadora a 65°C por 15 minutos, invertendo os tubos á cada 5 minutos. Acrescentou-se 1 ml da solução de clorofórmio: álcool isoamílico, e inverteram-se os tubos por 2 minutos. Após essa etapa a fase aquosa foi transferida para outro microtubo e repetiram-se os dois últimos passos respectivamente. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos e incorporou-se o semelhante á 1\4 do volume de Cloreto de lítio á 10M. A amostra foi incubada por um período de 24 horas á 4°C. Após as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos.

Incubou-se a amostra por 24 horas á 4°C. Em seguida centrifugou-se a 10.000 rpm durante 20 minutos. Adicionou-se 50 µL de água com DEPC 0,1% e foi feito a precipitação com 5µL de acetato de sódio 3M e 2,5 do volume de etanol absoluto. Os tubos foram invertidos por 2 minutos e incubados em freezer á -20°C por duas horas. Posteriormente, centrifugou-se a amostra por 20 minutos á 10.000 rpm. O pellet foi dissolvido em 30 µL de água com DEPC 0,1%, a amostra foi estocada a -20°C.

4.2 Validação da qualidade do cDNA

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase após o processo de extração, usando o Kit Turbo DNA-free (Ambion, Inc.), utilizando das instruções do fabricante (1 µL de DNase). A reação de transcrição reversa foi realizada usando o kit reverse transcription (AppliedBiosystems®), seguindo as instruções do fabricante. Todos os procedimentos de qPCR, incluindo testes, validações e experimentos, foram conduzidos no aparelho ABI 7500 (AppliedBiosystems, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O genes endógenos da β-actina (ACT2), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPC2) e Ubiquitina (UBC2) foram utilizados para validar o cDNA sintetizado na concentração de 10ng/ amostra (Tabela 1), .

Tabela 1. Símbolos, nomes e primers dos genes endógenos utilizados.

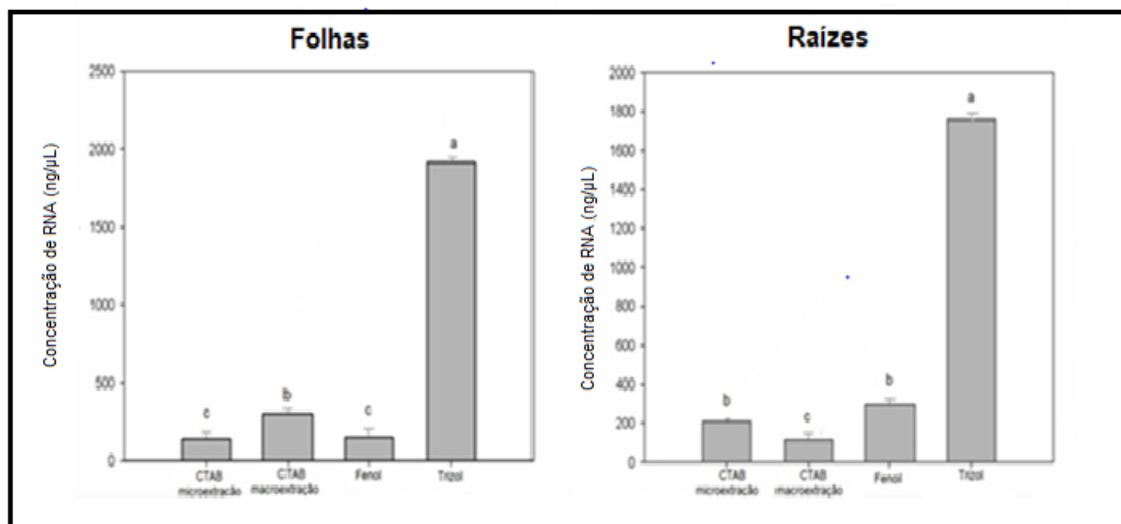
Símbolo	Nome do Gene	Primer
ACT2	Actin 2	F: 5'- CTCTCCTTGTACGCCAGTGGTC -3' R: 5'- TAAGGTCACGTCCAGCAAGGTC -3'
GAPC2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: 5'- TTGGTGACAACAGGTCAAGCA-3' R: 5'- AAAGTTGTCGCTCAATGCAATC -3'
UBC2	Ubiquitina	F: GGCATTTTAACGGGGTCTTT R: GTTGGGTGATGAGACGGACT

As reações de qPCR foram conduzidas em quadruplicata, em volume de reação de 20 μ L, contendo cDNA 10 ng com 3 genes endógenos para folha e raiz, primers (F+R) na concentração de 50nM, 10 μ L de PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (AppliedBiosystems®, EUA) e 5 μ L de água Milli-Q esterilizada por autoclavagem. As condições de amplificação foram realizadas utilizando-se as seguintes etapas: (1) ativação da Taq DNA polimerase a 50°C por 2 min, (2) desnaturação inicial a 95°C por 3 min, (3) desnaturação a 95°C por 15s, (4) anelamento a 60°C por 20s e (5) extensão a 60°C por 1 min. As etapas 3 a 5 foram repetidas por 40 ciclos.

Reações controle desprovidas de cDNA (NTC) também foram utilizadas em todos os experimentos. O programa Dissociation Curve 1.0 (AppliedBiosystems, EUA) foi usado para verificar que somente um único produto de PCR foi gerado pela amplificação dos transcritos. Foi realizado análise de variância dos dados de expressão, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados quatro protocolos utilizados para extração de RNA total em folhas e raízes de *M. flexuosa*, utilizando diferentes reagentes. O método de extração Trizol reagente® para folhas e raízes obteve maior eficiência, com a concentração de 1915 ng/μL de RNA para folhas e 1761 ng/μL de RNA para as raízes (GRÁFICO 1).



Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

GRÁFICO 1 - Concentração de RNA (ng/μL) de amostras de RNA total extraídas de folhas e raízes *M. flexuosa*, utilizando os protocolos CTAB microextração, Fenol, CTAB macroextração e TRI Reagente® Sigma.

Em análises com procedimento com o Trizol, conforme a Figura 3, a adição do isopropanol faz com que o RNA se isole das proteínas (WANG e STEGEMANN, 2010). A incorporação do clorofórmio favorece a solubilização dos lipídeos, o tiocianato de guanidina propicia a permanência do RNA em perfeito estado para as fases seguintes, através da desordem das células e dissolução dos componentes (CHOMZYNSK e SACCHI, 1987; SAMBROOK e RUSSEL, 2002). Segundo o fabricante do Trizol® Reagent, esse reagente conserva a integridade do RNA, pois inibe perduravelmente a atividade da RNase, mesmo ao tempo que obstrui as células e desfaz os elementos das células durante a uniformização da amostra (LUZ *et al.*, 2016). Estudo realizado por Meng e Feldman (2010) obtiveram RNA isento de DNA com alta

qualidade usando o reagente Trizol e precipitação com etanol para extração de RNA de *Arabidopsis siliquens*.

Para quantificar a pureza, os níveis de absorvância a 280 nm, 260 nm e 230 nm foram estudados, a razão 260/230 nm que indica contaminação por polissacarídeos/polifenóis, ao passo que a relação 260/280 indica contaminação das amostras com proteínas, o valor fixado para que as amostras estejam desprendidas de contaminantes é entre 1,8-2,0 (LOGEMANN *et al.*, 1987; MANNING, 1991; ASIF *et al.*, 2000).

A qualidade total do RNA, conforme determinado pelos seguintes critérios: a relação A260 / A230, a relação A260 / A280. As amostras de RNA do reagente Trizol® obteve a maior pureza de polissacarídeos/polifenóis na amostra para folhas e raízes (TABELA 2).

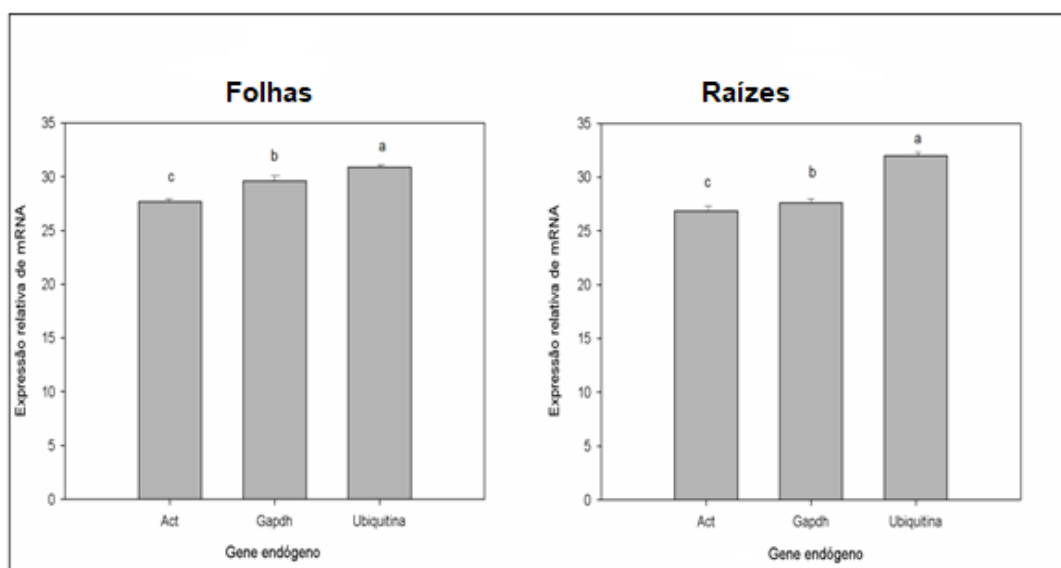
Tabela 2 - Grau de pureza em espectrofotômetro e erro(relação 260/230 e 260/280) de amostras de RNA total extraídos de folhas e raízes de plantas jovens de *M. flexuosa*.

Folhas	CTAB		CTAB	
	Microextração	Fenol	Macroextração	Trizol
Razão 260/230	0.8±0.330	1.4±0.039	1.7±0,236	2.0±0.070
Razão 260/280	1.8±0.174	1.5±0.054	1.8±0.147	1.9±0.071
Raízes	CTAB		CTAB	
	Microextração	Fenol	Macroextração	Trizol
Razão 260/230	1.2±0.154	1.7±0.081	1.7±0.211	2.0±0.187
Razão 260/280	1.7±0.102	2.0±0.076	2.0±0.309	1.8±0.043

Para a relação A260/A280 em folhas, os níveis para quase todos os protocolos mantiveram na faixa de 1,8-2,0, ficando isentas de contaminação por proteínas (Tabela 2). O método do fenol a quente não ficou livre de impurezas, em que os valores de absorvância não estiveram na faixa ótima, mesmo incorporando o clorofórmio que favorece a solubilização dos lipídeos, o resultado não foi adequado. Para a relação A260/A280 de raízes o método Fenol apresentou um valor superior dos demais métodos, estando isentos de proteínas (Tabela 2).

Os métodos CTAB macroextração e Trizol ficaram na faixa ótima, enquanto o CTAB microextração teve valor abaixo do recomendável para uma extração de RNA com alta qualidade. Pois mesmo fazendo uso de compostos que ajudam para que a amostra fique livre de impurezas, não apresentou resultados desejáveis (Tabela 2). Em estudos feitos por Paula (2009) com folhas de cafeeiro, o CTAB Chang foi o melhor método para extração de RNA, esse resultado pode ser devido à uma maior quantidade de proteínas, logo é evidenciado há necessidade de estudos para extração de RNA para a espécie de interesse.

O gene endógeno UBC2 obteve a melhor resposta para validar o cDNA utilizando a concentração de 10 ng por amostra para realizar as análises de expressão gênica, com o intuito de resguardar de inconstâncias das amostras, as concentrações de RNA foram harmonizadas para 20 µL de reação (GRÁFICO 2).



Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

GRÁFICO 2 - Expressão relativa de mRNA para folhas e raízes de *M. flexuosa*.

No experimento realizado o gene endógeno Ubiquitina foi considerado um bom normalizador, pois atendeu as premissas, permanecendo com expressão estável entre as amostras, independente do protocolo.

A extração de RNA total em órgãos vegetais são materiais de investigação para otimizar protocolos em diferentes tecidos e espécies vegetais

que diferem substancialmente em suas composições químicas, logo faz-se necessário a determinação de um protocolo adequado para espécies/tecidos.

6. CONCLUSÃO

O Trizol reagente® foi o protocolo mais eficaz para extração de RNA total de folhas e raízes de *Mauritia flexuosa* e para ausência de contaminação por polifenóis, polissacarídeos e proteínas.

A amplificação do gene via qPCR foi eficaz, indicando alta qualidade das amostras, podendo servir para análises moleculares de *M.flexuosa*.

A Ubiquitina foi gene endógeno que obteve a melhor resposta para validar o cDNA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P. Frutas nativas do Cerrado caracterização físico-químicas e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de (Ed.). Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.

ALMEIDA, I. R. S. Composição e estrutura trófica das assembleias de peixes em veredas de buritizais, no período de seca, no lavrado de Roraima, Brasil. 2016. 82 f.: il. color. Dissertação de Mestrado. INPA/UERR, 2016.

AGOSTININI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and health benefits of some palm species traditionally used in Africa and the Americas – A review. *Journal of Ethno pharmacology*, 224, 202-229, 2018.

ASIF, M. H.; DHAWAN, P.; NATH, P. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit, *Plant Mol. Biol. Rep.* 18 (2000) 109–115.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Eds.) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley e Sons, New York. 1998.

BASTOS, L. A.; FERREIRA, I. M. COMPOSIÇÕES FITOFISIONÔMICAS DO BIOMA CERRADO: estudos sobre o subsistema de Vereda. Espaço em Revista. vol. 12 n 1 jan/jun. 2010, p. 97 - 108.

BATAGLION, G. A.; SILVA, F. M. A.; EBERLIN, M. N. e KOOLEN, H. H. F. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Food Research International, 66, 396-400, 2014.

BARBOSA, R. L.; LIMA, A. D.; JUNIOR, M. M. Biometria de frutos do buriti (*Mauritia flexuosa* L f Arecaceae): ótica de produtividade de polpa e óleo vegetal em uma área de savana em Roraima Amazonia: INPA, CPEC. 24 p, 2009.

BASTOS, R. B.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F.; AUGUSTO, M. L. Tópicos Especiais em Genética Aplicada. 3 ed. Jaboticabal-SP: Funep, 2016. 1 p.

BEKESIOVA, I.; NAP, J. P e MLYNAROVA, L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. Plant Mol. Biol. Reprtr, v. 17, p. 269-277, 1999.

BILGIN, D. D.; DELUCIA, E. H. e CLOUGH, S. J. A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix Gene Chip analysis and quantitative real-time RT-PCR. Nature Protocols, 4 (3), 333–340, 2009.

BIRTĆ, S. e KRANNER, I. Isolation of high-quality RNA from polyphenol-, polysaccharide- and lipid-rich seeds. Análise Fitoquímica, 17 (3), 144-148, 2006.

BOVI, G. G. Óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.) nano emulsionado: produção por método de baixa energia, caracterização de físico-química das dispersões e incorporação em bebida isotônica. 2015. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

BRITES, A. B. ; MORSELLO, C. Efeitos ecológicos da exploração de produtos florestais não madeireiros: uma revisão sistemática. Desenvolv. Meio Ambiente, v. 36, p. 55-72, abr. 2016.

CALDERÓN, M. E. P. Patrones de caída de frutos em *Mauritia flexuosa* L.f. Y fauna involucrada em los procesos de remoción de semillas. Acta Bot. Venez. v.25 (2), 2002.

CÂNDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R.; e AGOSTINI- COSTA, T. S. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon Biomes. *Food Chemistry*, 177, 313-319, 2015.

CANTU-JUNGLES, T. M.; ALMEIDA, C. P.; IACOMINI, M., CIPRIANI, T. R. e CORDEIRO, L. M. C. Arabinan-rich pectic polysaccharides from buriti (*Mauritia flexuosa*): An Amazonian edible palm fruit. *Carbohydrate Polymers*, 122, 276-281, 2015.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J.A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, Athens, v. 11, n. 2, p. 113-116, 1993.

CHANG, E.; ZHAO, Y.; WEI, Q.; SHI, S. e JIANG, Z. Isolation of high-quality RNA from *Platy cladus orientalis* and other Cupressaceae plants b. *Revista Eletrônica de Biotecnologia*, 23, 21-27, 2016.

CHOMCZYNSKI, P. e SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159, 1987.

CLICK, R.E. e HACKETT, D. P. O isolamento do ácido ribonucleico de células vegetais, bacterianas ou animais. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Nucleic Acids e Protein Synthesis*, 129 (1), 74-84, 1996.

COMAPA. 2005. Plan de manejo forestal de *Mauritia flexuosa* “aguaje”: reserva nacional Pacaya Samiria. Comité de Manejo de Palmeras “Veinte de Enero”. Pro Naturaleza. Iquitos, Peru. 52p.

CORDEIRO, L. M. C. e IACOMINI, M. Unusual linear polysaccharides: (1?5)-a-L-Arabinan, (1?3)-(1?4)-a-D-glucan and (1?4)-b-D-xylan from pulp of buriti (*Mauritia flexuosa*), an edible palm fruit from the Amazon region. *Food Chemistry*, 173, 141-146, 2015.

COSTA-MILANEZ, C. B.; LOURENÇO-SILVA, G.; CASTRO, P. T. A.; MAJER, J. D. e RIBEIRO, S. P. São assembléias de formigas de veredas brasileiras caracterizadas por localização ou tipo de habitat ? *Revista Brasileira de Biologia*, 74(1), 89-99, 2015.

CUNHA, M. A. E.; NEVES, R. F.; SOUZA, J. N. S.; FRANÇA, L. F.; ARAÚJO, M. E.; BRUNNER, G. Supercritical adsorption of buriti oil (*Mauritia*

flexuosa Mart.) in Y-alumina: A methodology for the enriching of anti-oxidants. *Journal of Supercritical Fluids*, 66, 181–191, 2012.

DETTOGNI, R. e LOURO, I. Desafios da extração do RNA do vírus da dengue. 937-966, 2017.

DRANSFIELD, J.; UHL, N. W.; ASMUSSEN, C. B. A.; BAKER, W. J. HARLEY, M. M.; LEWIS, C. E. *Genera palmarum: the evolution and classification of palms*. Kew Publishing, Richmond, 2008.

EITEN, G. Vegetação do cerrado. In *Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas* (M.N. Pinto, ed.). Universidade de Brasília, Brasília, p. 17-73, 1993.

EITEN, G. Vegetação do Cerrado. Em PINTO, MN. *Cerrado: Caracterização, Ocupação e Perspectivas*. Brasília: Editora Universidade de Brasília. p. 17-73, 1994.

FERNANDES-PINTO, E. e SARAIVA, N. 2006. Caça de subsistência e conservação da fauna silvestre em uma região do semi-árido Maranhense – Município de Paulino Neves. VII Congresso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre na Amazônia e América Latina: Resumos, Ilhéus.

FEDERMAN, S.; HYSENI, C.; CLEMENT, W.; OATHAM, M. P. e CACCONE, A. Habitat fragmentation and the genetic structure of the Amazonian palm *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) on the island of Trinidad. *Conservation Genetics*, 15 (2), 355-362, 2013.

GARCIA, E. S. Biodiversity, Biotechnology and Health. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, 11 (3): 495-500, Jul/Sep, 1995.

Gehrig, HH, Winter, K., Cushman, J. et al. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Planta Mol Biol Rep* (2000) 18: 369.

FILGUEIRAS, T.S. 2002. Herbaceous plant communities. In *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (P.S. Oliveira e R.J. Marquis, eds.). Columbia University Press, New York, p. 121-139.

GUIMARÃES, A.; LIMA RODRIGUES, A. S. e MALAFAIA, G. Adapting a rapid assessment protocol to environmentally assess palm swamp (Veredas) springs in the Cerrado biome, Brazil, 189 (11), 2017.

GHAHARI, SAJJAD e GHAHARI, S. e NEMATZADEH, A. e GHORBAN. Magnetic nano fluids for isolation of genomic DNA and total RNA from various prokaryote and eukaryote cells. *Journal of Chromatography B*. 1102-1103, 2018.

HORN, C. M.; GILMORE, M. P.; ENDRESS, B. A. Ecological and socio-economic factors influencing aguaje (*Mauritia flexuosa*) resource management in two indigenous communities in the Peruvian Amazon. *Forest Ecology and Management*, 267, 93-103, Mar 2012.

HOUSEHOLDER, J.E.; JANOVEC, J..P; TOBLER, M. W. e PAGE, S. L. Turfeiras do rio madre de dios do Peru: distribuio, geomorfologia e diversidade de habitat *Wetlands* , 32 (2012) , pp. 359 – 368

Hu, G. C.; HONDA, C. H.; KITA, M. Y.; ZHANG, Z.; TSUDA, T. MoriguchiA simple protocol RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds *Plant Molecular Biology Reporter*, 20 (2002), p.69a-69g.

IBELLI, A. M. G.; REGITANO, L. C. de A.; NICIMURA, S. C. M. Extração de RNA. In: REGITANO, L. C. de A.; NICIURA, S. C. M.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. de S. *Protocolos em biologia molecular aplicada à produção animal*. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. p. 9-13. 1 CD-ROM.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agropecuário 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22620-pevs-2017-producao-da-silvicultura-e-da-extracao-vegetal-chega-a-r-19-1-bilhoes-e-cresce-3-4-em-relacao-a-2016>

INVITROGEN, manual e procedimento disponível em http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf

KALUZNA, M.; KURAS, A.; MIKICINSKI, A. Evaluation of different RNA extraction methods for high-quality total RNA and mRNA from *Erwinia amylovora* in planta. *European Journal of Plant Pathology*, 2016, Volume 146, Number 4, Page 893

KIEFER, E.; HELLER, W. e ERNST, D. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant. MolBiol Rep* (2000) 18: 33.

KOONJUL, P. K.; BRANDT, W. F.; FARRANT, J. M. e LINDSEY, G. G. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *NucleicAcids Res.* 27: 915-916, 1999.

KOOLEN, H. H. F; SILVA, F. M. A.; SILVA, V. M. A.; PAZ, W. H. P.; BATAGLION, G. A. Buriti fruit—*Mauritia flexuosa*. *Exotic Fruits Reference Guide*.

KOOLEN, H. H.F.; SILVA, F. M. A.; GOZZO, A. Q. L.; SOUZA, A. Q. L. e SOUZA A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51 (2), 467-473, 2013.

KUSTERS, K. Non timber forest product trade: a trade off between conservation and development. Assessing the outcomes of non-timber forest product trade on livelihoods and the environment, with special emphasis on the damaragroforests in Sumatra, Indonesia .Amsterdan, (DissertationPhD) - Universiteit van Amsterdan, 2009.

LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for isolation of RNA from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 163, n. 1, p. 16-20, May 1987.

LUZ, ACD, PRETTI, IR e BATITUCCI, MDCP (2016). COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNA PARA FOLHAS DE *Passiflora edulis* SIMS. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38 (1), 226-232. doi: 10.1590 / 0100-2945-278 / 15

LORENZI, H., NOBLICK, L.R.; KAHN, F; FERREIRA, E. 2010. *Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (Palmeiras)*. Plantarum, Nova Odessa.

LUZ JR, G. E.; SANTOS, A. G. D.; MELO, A. C. R.; OLIVEIRA, R. M.; ARAÚJO, A. S.; FERNANDES JR, V. J. 2011. Thermal catalytic cracking of buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) over LaSBA 15 mesoporous materials. *Fuel Process. Technol.* 92, 2099–2104

MAILLARD, P.; ALENCAR-SILVA, T. e CLAUSI, D. An Evaluation of Radarsat-1 and ASTER Data for Mapping Veredas (Palm Swamps). *Sensors*, 8 (9), 6055-6076, 2008.

MANNING, K. Isolation of nucleic acid from plants by differential solvent precipitation. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 195, n. 1, p. 45-50, May 1991.

MEHRA, M. (1996). Isolamento de RNA de células e tecidos. Em P. Krieg (Ed.), *Um guia de laboratório para RNA: isolamento, análise e síntese* (pp. 1-20). NY: Wiley-Liss

MEIRELLES, M. L.; GUIMARÃES, A. J. M.; OLIVEIRA, R. C.; ARAÚJO, G. M., e RIBEIRO, J. F. (2004). Impactos sobre o estrato herbáceo de áreas úmidas do Cerrado. In L. M. S. Aguiar e A. J. A. Camargo (Eds.), *Cerrado: ecologia e caracterização* (pp. 41–68). Brasília: EMBRAPA.

MENEZES, E. V.; SOUTO, W. F. S.; CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; VALÉRIO, H. M. e PIMENTA, M. A. S. Development and characterization of DNA microsatellite primers for buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.). *Genetics and Molecular Research*, 11 (4), 4058-4062, 2012.

MORANTE-CARRIEL, J.; SELLÉS-MARCHAT, S.; MARTÍNEZ-MARQUEZ, A.; MARTÍNEZ-ESTESO, M. J.; LUQUE, I. e BRU-MARTÍNEZ, R. RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. *Analytical Biochemistry*, 452, 46-53, 2014.

NEPSTAD, D. C. e SCHWARTZMAN, S. Non Timber Products from Tropical Forests: Evaluation of a Conservation and Development Strategy. 9 ed. New York. New York Botanical Garden, 1992 p 164.

NOBRE, C. B.; SOUZA, E. O.; LIMASILVA, J. M. F; MELO COUTUINHO, H. D. e MARTINS DA COSTA, J. G. Chemical composition and antibacterial activity of fixed oils *Mauritia flexuosa* and *Orbignia speciosa* associated with aminoglycosides. *Revista Européia de Medicina Integrativa*, 2018.

PANAYATOU, T. e ASHTON, P. S. Not by Timber Alone: Economics and Ecology for Sustaining Tropical Forests. Island Press, Washington, 1992. 282 p.

PAULA, M. F. B. de. Identificação e caracterização parcial dos genes *Sepallata* em café arábica. 2009. 102f.

Dissertação(Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PAULA, M. F. B.; SAGIO, S. A.; LAZARI, F.; BARRETO, H. G.; PAIVA, L. V.; CHALFUN-JUNIOR, A. Efficiency of RNA extraction protocols in different types of coffee plant tissues. *Coffee Science*, Lavras, v. 7, n. 3, p. 284-293, set./dez. 2012.

PIMENTA, M. e DE MARCO, P. Leaf Beetle (Chrysomelidae: Coleoptera) Assemblages in a Mosaic of Natural and Altered Areas in the Brazilian Cerrado. *Entomologia Neotropical*, 44 (3), 242-255, 2017.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann. Bot.* 1997, 80, 223–230.

RIGUEIRA, S.; BRINA, A. E.; FILHO, J. R.; COSTA e SILVA, L. V.; BEDÊ, L. C.; REZENDE, M. 2002. Projeto Buriti: artesanato, natureza e sociedade. Instituto Terra Brasilis de Desenvolvimento Sócio-Ambiental. Belo Horizonte, p 118.

SALZMAN, R.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K. An Improved RNA Isolation Method for Plant Tissues Containing High Levels of Phenolic Compounds or Carbohydrates. *Repórter de Biologia Molecular Vegetal* (1999) 17: 11. Março de 1999, Volume 17, edição 1, pp 11–17.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002. 2.700 p.

SHARMA, A. D.; GILL, P. K.; SINGH, P. 2003. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v.314, p.319-321.

STÅHLBERG, A e KUBISTA, M. (2018). Technical aspects and recommendations for single-cell qPCR. *Aspectos Moleculares da Medicina*, 59, 28-35.

SILVA, D.V.; BRANCO, S. M. J; HOLANDA, I. S. A.; ROYAERT, S.; MOTAMAYER, J. C.; MARELLI, J. P. e CORRÊA, R. X. Comparative evaluation of total RNA extraction methods in *Theobroma cacao* using shootapical meristems. *Genetics and Molecular Research*, 15 (1), 2016.

SCHERRER, K.; DARNELL, J. E. Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells. **Biochemistry and Biophysical Research Communication**, v. 7, p. 486-490, 1962.

SILVA JR., M.C. e FELFILI, J. M. A vegetação da Estação Ecológica de Águas Emendadas. SEMA, Brasília, 35 p., 1998.

SOUZA, A. O. Ecologia e etnoconhecimento da invasão de *Acacia mangium* nas terras indígenas, Região Serra da Lua, Roraima. 2016. 134 f. Tese (Biodiversidade e biotecnologia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

RESENDE, I. L. M.; SANTOS, F. P.; CHAVES, L. J.; NASCIMENTO, J. L. Estrutura etária de populações de *Mauritia flexuosa* L. F. (Arecaceae) de veredas da região central de Goiás, Brasil. Revista Árvore, Viçosa, v. 36, n. 1, p. 103-112, 2012.

RIBEIRO, J. F. e WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: Cerrado, Ambiente e flora (S.M. Sano e S.P. Almeida, eds.). Embrapa/CPAC, Planaltina, p.89- 166, 1998.

RODRIGUES, P. R.; ARAÚJO, M. F. L.; ROCHA, T L; VELOSO, R V S; PANTOJA, L. A.; SANTOS, A. S.. Evaluation of buriti endocarp as lignocellulosic substrate for second generation ethanol production. PeerJ 6:e 5275, 2018.

RUBIO – PIÑA, J. A. e VÁSQUEZ – FLOTA, F. A. Isolation of functional total RNA from *Argemone mexicana* tissues. Electron. J. Biotechnol. 11: 15-16, 2008.

RULL, V. e MONTROYA, E. *Mauritia flexuosa* palm swamp communities: natural or human-made? A palynological study of the Gran Sabana region (northern South America) within a neotropical context. Quaternary Science Reviews, 99, 17–33, 2014.

RUIZ, R. R. e ALENCAR, J. C. Comportamento fenológico da palmeira patauá (*Oenocarpus bataua*) na reserva florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amaz* 34: 553-558, 2004.

TONI, L. S.; GARCIA, A. M.; JEFFREY, D. A.; JIANG, X.; STAUFFER, B. L.; MIYAMOTO, S. D. E SUKHAROV, C. C. Optimization of Phenol-Chloroform RNA Extraction. *MethodsX*, 5, 599-608, 2018.

VIEIRA, I. C. G; TOLEDO, P. M; HIGUCHI, H. A Amazônia no antropoceno. *Cienc. Cult.* vol.70 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2018.

VASANTHAIAH, Hemanth KN; KATAM, Ramesh; SHEIKH, Mehboob B. Protocolo eficiente para isolamento de RNA funcional de diferentes tecidos

de uva ricas em polifenóis e polissacarídeos para estudos de expressão gênica. *Electron J. Biotechnol. Valparaíso*, v. 11, n. 3, p. 42-51, jul. 2008.

VIRANPOGSE, A.; ENDRESS, B. A.; GILMORE, M. P.; CHIFRE, C. e ROMULO, C. Ecology, livelihoods, and management of the *Mauritia flexuosa* palm in South America, *Global Ecology and Conservation* 10 (2017) 70–92.

VORREITER, F.; RICHTER, S.; PETER, M.; BAUMANN, S.; VON BERGEN, M. e TOMM, J. M. Comparison and Optimization of Methods for the Simultaneous Extraction of DNA, RNA, Proteins, and Metabolites . *Analytical Biochemistry*, 508, 25-33, 2016.

WANG, L. e STEGEMANN, J. P. “Extração de RNA de alta qualidade a partir de matrizes polissacarídicas utilizando brometo de cetiltrimetilamônio” *Biomaterials*. vol. 31,7 (2009): 1612-8.

WANG, X.; TIAN, W. and LI, Y. Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues. *Molecular Biotechnology*, January 2007, vol. 38, no. 1, p. 57-64.

ZAMBONI, A.; PIERANTONI, L.; FRANCESCHI, P. de. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. *Journal of Biogeosciences and Forestry*, Bologna, v. 1, n. 1, p. 122-125, 2008.

ZHANG, J. S.; DUNCAM, E. L.; CHANG, A. C. M.; REDDEL, R. R. Differential Display of mRNA. *Mol. Biotechnol.*, 10(2):155-165, 1998.