

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINA MALANCZYN DE OLIVEIRA

EFICIÊNCIA DE DOIS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM DIFERENTES
FRAÇÕES (TOTAL E BUFFY COAT) DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

CURITIBA

2023

Ana Carolina Malanczyn de Oliveira

EFICIÊNCIA DE DOIS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM DIFERENTES
FRAÇÕES (TOTAL E BUFFY COAT) DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

Monografia apresentada ao curso de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Holsbach Beltrame

CURITIBA

2023

TERMO DE APROVAÇÃO

ANA CAROLINA MALANCZYN DE OLIVEIRA

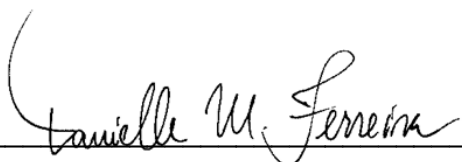
EFICIÊNCIA DE DOIS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM DIFERENTES
FRAÇÕES (TOTAL E BUFFY COAT) DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.



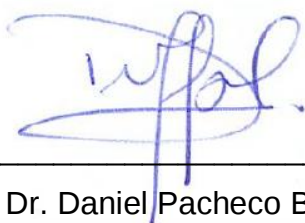
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Holsbach Beltrame

Departamento de Genética, UFPR



Prof^a. Dr^a. Danielle Malheiros Ferreira

Departamento de Genética, UFPR



Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi

Departamento de Genética, UFPR

Curitiba, 5 de Dezembro de 2023.

RESUMO

A extração de ácidos nucleicos é uma técnica da biologia molecular utilizada para obter amostras de alta qualidade passíveis de preservação por longos períodos. Diante da crescente demanda na obtenção de DNA genômico puro, e isento de contaminantes, para análises em diversos campos de estudo, diferentes metodologias foram desenvolvidas visando o aumento da eficiência, redução de custos e otimização do tempo. No presente trabalho, as variáveis do tempo e condição de preservação, e relação custo-benefício, foram analisadas baseadas em um banco de dados construído a partir de extrações de DNA executadas no período de novembro de 2021 a novembro de 2022 ($n = 537$). Para isso, foram realizadas, utilizando o software Jamovi e linguagem R, análises estatísticas e descritivas baseadas no tipo de protocolo adaptado empregado (sangue total = ST; camada leucocitária = BUFFY), sobre os valores de pureza (260 nm/280 nm), contaminação por componentes orgânicos (260 nm/230 nm) e concentração (DNA em ng/ μ L), obtidos em espectrofotômetro NanoDrop™. De forma complementar, as amostras foram classificadas, de acordo com os valores de quantificação, como grupo ESTOQUE (pureza entre 1,8 e 1,9 e contaminação entre 1,9 e 2,4), grupo AVALIAR (pureza ou contaminação diferente de ESTOQUE) e grupo CRÍTICO (concentração menor que 20 ng/ μ L). As amostras extraídas demonstraram ter boa qualidade (260/280 = 1,82; 260/230 = 2,11), apesar da grande variação entre pureza (de 0,530 a 5,41) e contaminação (de -26,620 a 33,44), possivelmente advindas de erros de manipulação entre os métodos de estudo. O protocolo BUFFY apresentou valores significativamente maiores (DNA = 195 ng/ μ L; 260/280 = 1,84; 260/230 = 2,27) comparados aos de ST (DNA = 112 ng/ μ L, 260/280 = 1,79; 260/230 = 1,80) (Mann-Whitney; $p < 0,001$). O grupo ESTOQUE foi o único a resultar em diferenças significativas entre os protocolos (BUFFY: DNA = 253 ng/ μ L, 260/280 = 1,84; 260/230 = 2,29; ST: DNA = 441 ng/ μ L, 260/280 = 1,83; 260/230 = 2,11) (Kruskal-Wallis; Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF); $p < 0,001$). O recongelamento das amostras em ST não mostrou associação significativa para a concentração (Kruskal-Wallis; DSCF; $p > 0,05$). A diferença de dias entre a coleta e a extração apresentou correlações negativas significativas (Spearman; $p < 0,001$) para a pureza (BUFFY: $\rho = -0,375$; ST = $\rho = -0,276$) e contaminação (BUFFY: $\rho = -0,333$; ST = $\rho = -0,373$) e não significativas para concentração em ST (Spearman; $p > 0,05$). Novas análises são necessárias em condições controladas com amostras pareadas para melhor avaliar essas associações em estudo. O protocolo de extração BUFFY apresentou a melhor relação custo-benefício comparado a de ST, visto a diminuição e padronização de etapas, aumento na capacidade de processamento e redução do tempo de execução. Nossos resultados destacam a viabilidade dos dois protocolos adaptados a partir de um mesmo kit comercial, com a escolha do melhor método influenciada pela capacidade de manter alta eficiência somada a otimização dos recursos disponíveis.

Palavras-chave: camada leucocitária; sangue total; congelamento; preservação; custo-benefício.

ABSTRACT

Nucleic acid extraction is a molecular biology technique used to obtain high-quality samples that can be preserved for long periods of time. Given the growing demand for pure, contaminant-free genomic DNA for analysis in various fields of study, different methodologies have been developed to increase efficiency, reduce costs and optimize time. In this study, the variables of preservation time and condition, and the cost-benefit ratio, were analyzed based on a database built from DNA extractions carried out between November 2021 and November 2022 ($n = 537$). To this end, statistical and descriptive analyses were carried out using the Jamovi software and the R language, based on the type of adapted protocol used (whole blood = ST; leukocyte layer = BUFFY), on the purity values (260 nm/280 nm), contamination by organic components (260 nm/230 nm) and concentration (DNA in ng/ μ L), obtained using a NanoDrop™ spectrophotometer. In addition, the samples were classified, according to the quantification values, as STOCK group (purity between 1.8 and 1.9 and contamination between 1.9 and 2.4), EVALUATE group (purity or contamination different from STOCK) and CRITICAL group (concentration less than 20 ng/ μ L). The extracted samples proved to be of good quality (260/280 = 1.82; 260/230 = 2.11), despite the wide variation between purity (from 0.530 to 5.41) and contamination (from -26.620 to 33.44), possibly due to handling errors between the study methods. The BUFFY protocol showed significantly higher values (DNA = 195 ng/ μ L; 260/280 = 1.84; 260/230 = 2.27) compared to ST (DNA = 112 ng/ μ L, 260/280 = 1.79; 260/230 = 1.80) (Mann-Whitney; $p < 0.001$). The STOCK group was the only one to result in significant differences between the protocols (BUFFY: DNA = 253 ng/ μ L, 260/280 = 1.84; 260/230 = 2.29; ST: DNA = 441 ng/ μ L, 260/280 = 1.83; 260/230 = 2.11) (Kruskal-Wallis; Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF); $p < 0.001$). Refreezing the samples in ST showed no significant association with concentration (Kruskal-Wallis; DSCF; $p > 0.05$). The difference in days between collection and extraction showed significant negative correlations (Spearman; $p < 0.001$) for purity (BUFFY: $\rho = -0.375$; ST: $\rho = -0.276$) and contamination (BUFFY: $\rho = -0.333$; ST: $\rho = -0.373$) and not significant for concentration in ST (Spearman; $p > 0.05$). New analyses are needed under controlled conditions with paired samples to better evaluate these associations under study. The BUFFY extraction protocol showed the best cost-benefit ratio compared to ST, given the reduction and standardization of steps, increased processing capacity and reduced execution time. Our results highlight the viability of the two protocols adapted from the same commercial kit, with the choice of the best method influenced by the ability to maintain high efficiency in addition to optimizing available resources.

Keywords: buffy coat; whole blood; freezing; preservation; cost-effectiveness.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – A ESTRUTURA DO DNA.....	12
FIGURA 2 – EXTRAÇÃO DE DNA POR MEIO DO KIT COMERCIAL NEOSCIENCE®.....	15
FIGURA 3 – PAINEL DE LEITURA DA QUANTIFICAÇÃO DO DNA EM NANODROP™	18

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA CONCENTRAÇÃO, PUREZA E CONTAMINAÇÃO	23
TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O PROTOCOLO.....	24
TABELA 3 – TEMPO, CUSTO, PROCESSAMENTO E VOLUMES POR PROTOCOLO.....	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1	O SANGUE PERIFÉRICO HUMANO COMO FONTE DE DNA	10
2.1.1	DNA: breve histórico e estrutura.....	10
2.1.2	Tecido sanguíneo: caracterização e qualidade do sangue periférico para extração do DNA	13
2.2	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO DNA DE SANGUE PERIFÉRICO	14
2.3	A ESPECTROFOTOMETRIA COMO INDICADOR DA QUANTIDADE E QUALIDADE DO DNA	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	CONSTRUÇÃO DO BANCO DE DADOS.....	19
3.2	PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO	19
3.2.1	Sangue total.....	19
3.2.2	Camada leucocitária (<i>buffy coat</i>)	20
3.3	ANÁLISES DE DADOS	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	AS VARIÁVEIS DO BANCO DE EXTRAÇÃO	23
4.2	O CUSTO-BENEFÍCIO POR PROTOCOLO	27
5	CONCLUSÕES	30
	REFERÊNCIAS	31
	APÊNDICE 1 – BANCO DE EXTRAÇÃO DE DNA	36

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por análises baseadas no genoma em pesquisas evolutivas e de doenças humanas aumentou a necessidade de se obter uma quantidade significativa de DNA genômico puro isento de contaminantes, como proteínas e nucleases. Para atender a essa demanda, a extração de DNA é uma técnica essencial da biologia molecular que permite a obtenção de amostras de alta qualidade que podem ser armazenadas por vários anos (STANZICK *et al.*, 2023; ROSINGER *et al.*, 2010; RIEMANN *et al.*, 2007).

O DNA pode ser isolado de quase todos os tecidos do corpo, incluindo fluidos e secreções. Devido à sua facilidade de obtenção, o sangue periférico é uma das fontes mais comuns de DNA para aplicações moleculares. Geralmente, protocolos de extração voltados a esse tipo de amostra requerem apenas a camada leucocitária (*buffy coat*), visível após centrifugação, ou o sangue total coletado em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (CHEN *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2015). De acordo com experimentos de Gail e colaboradores (2013), o *buffy coat* contém aproximadamente 39% da quantidade de DNA presente no sangue total fresco, valor correspondente a cerca da metade da quantidade observada em extrações envolvendo apenas a fração residual de células, obtida após centrifugação e descarte do plasma, para o mesmo volume inicial das amostras.

Para preservar as características celulares e diminuir o metabolismo celular, o congelamento é uma opção amplamente utilizada na conservação de amostras. No caso da preservação de ácidos nucleicos, normalmente utiliza-se a faixa de temperatura entre -20 °C a -80 °C, no entanto, foi observado que o congelamento induz quebras nas fitas de DNA, e consequentemente, a quantidade viável obtida em extrações também é reduzida em casos em que a mesma amostra de sangue é submetida a sucessivos processos de congelamento e descongelamento. Além disso, em amostras congeladas por longos períodos, foram verificadas modificações em genes e alterações nos níveis de expressão que pode comprometer a veracidade do resultado em uma análise de interesse. Dessa forma, entende-se que essas amostras podem ser afetadas, em certo grau, pelas condições de armazenamento e pelo intervalo de tempo entre a coleta do sangue e a extração do ácido nucleico (YAMAGATA *et al.*, 2021; GALLEGO *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2015).

Ao longo do tempo, houve um avanço significativo nas técnicas de extração de DNA desde sua descrição inicial, e a maioria delas segue um conjunto de passos básicos, envolvendo a utilização de reagentes orgânicos e inorgânicos, métodos de centrifugação e uma ampla variedade de kits disponíveis no mercado. No entanto, cada uma das opções disponíveis possui vantagens e desvantagens que devem ser consideradas antes de escolher uma técnica específica. Dentre elas, a relação tempo-custo necessária para a extração é fundamental no planejamento dos recursos humanos e a viabilidade do processo como um todo. A capacidade de processamento também é outro fator limitante, visto que a disponibilidade de equipamentos afeta diretamente a quantidade de amostras efetivamente extraídas. Em todo caso, a busca por um método simples, rápido e barato, que resulte em quantidades significativas de DNA genômico de alta qualidade, é de grande interesse para a comunidade científica (STANZICK *et al.*, 2023; TAGLIAFERRO *et al.*, 2021; CHACON-CORTES *et al.*, 2012).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto do tempo e da condição de preservação na quantidade e qualidade do DNA extraído, bem como a relação de custo-benefício, de dois protocolos adaptados para sangue periférico humano, visando fornecer informações relevantes sobre a eficiência dos métodos utilizados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O SANGUE PERIFÉRICO HUMANO COMO FONTE DE DNA

2.1.1 DNA: breve histórico e estrutura

O primeiro a extrair, o que mais tarde seria conhecido como ácido desoxirribonucleico (DNA), foi o bioquímico suíço Friedrich Miescher no ano de 1869. Miescher estava estudando sobre os componentes proteicos dos leucócitos no laboratório de Felix Hoppe-Seyler em Tübingen, Alemanha, quando isolou, de forma inesperada, uma substância rica em fósforo, diferente de qualquer proteína conhecida na época, presente no pus de curativos cirúrgicos descartados. Essa substância, que ele chamou de "nucleína", foi a primeira observação documentada do DNA (DAHLM, 2008; PRAY, 2008).

Em 1928, o bacteriologista britânico Frederick Griffith, no intuito de criar uma vacina contra a pneumonia, através de experimentos com infecção de ratos por duas cepas de *Streptococcus pneumoniae*, descobriu o que chamou de "princípio transformante". Posteriormente, em 1944, baseados pelo achado de Griffith, os pesquisadores Oswald Avery, Maclyn McCarty, e Colin MacLeod conseguiram obter pequenas quantidades do "princípio transformante" altamente purificado através de uma longa série de etapas bioquímicas sobre as células bacterianas, porém, Avery ainda levantava a possibilidade de contaminantes, como proteínas em pequenas quantidades, ainda serem os fatores determinantes observados por Griffith (O'CONNOR₁, 2008; O'CONNOR₂, 2008).

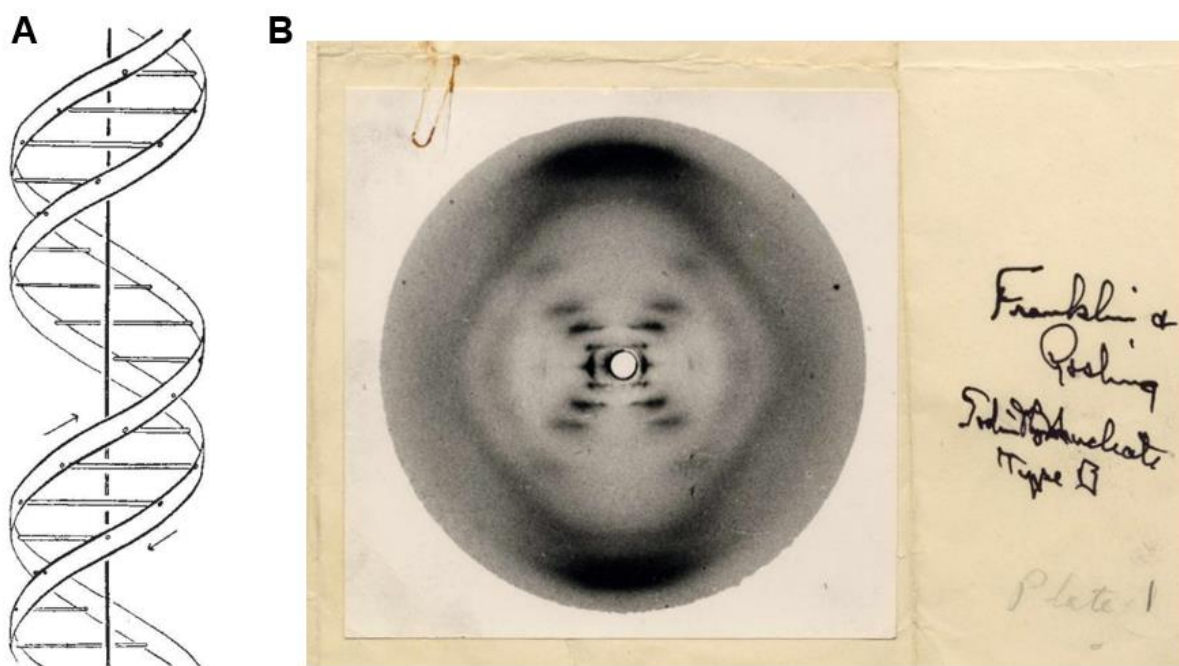
Nas décadas seguintes, em 1952, os pesquisadores Martha Chase e Alfred Hershey, utilizando bacteriófagos, demonstraram que o "princípio transformante" de Griffith era definitivamente o DNA, um composto totalmente diferente das proteínas, as mais cotadas à época pra ser o material genético. Já em 1953, o biólogo James Watson e o físico Francis Crick publicaram sobre sua estrutura (FIGURA 1A), baseada principalmente na fotografia de difração de raios-X anteriormente obtida pela química Rosalind Franklin (FIGURA 1B), que por sua vez, trabalhava no laboratório do físico Maurice Wilkins. Nesta estrutura, duas cadeias polinucleotídicas são enroladas uma em torno da outra, formando uma dupla hélice dextrógira, onde, baseada pela suposição inicial do pesquisador russo Phoebus Levene em 1919, cada cadeia é formada por uma sequência de nucleotídeos, compostos por uma base nitrogenada, um açúcar de cinco carbonos (desoxirribose) e um grupo fosfato (COBB; COMFORT, 2023; O'CONNOR₂, 2008; PRAY, 2008).

A dupla hélice é mantida por ligações de hidrogênio entre pares de bases nitrogenadas (FIGURA 1A). O pesquisador Erwin Chargaff, em 1950, inspirado pelas descobertas de 1944 feitas por Avery, McCarty e MacLeod, concluiu em seus estudos que, independentemente da origem do DNA, seja organismo ou tecido, a quantidade total de purinas, compostas por adenina (A) e guanina (G), geralmente são quase iguais a quantidade total de pirimidinas, formadas por citosina (C) e timina (T). Além disso, a quantidade de A se igualava a quantidade de T, e a quantidade de C a G, porém, as quantidades isoladas de cada base não eram iguais, variando entre espécies e se mantendo semelhantes nos indivíduos de cada grupo. Dessa forma, na estrutura proposta por Watson e Crick, as bases A e T formam um par através de duas ligações, enquanto as bases C e G formam outro par por três

ligações. A complementaridade de bases e o sentido da torsão da dupla hélice criam o sulco maior e o sulco menor, que, somados à exposição do hidrogênio das bordas externas para ligação com outras moléculas, são fundamentais para o empacotamento do DNA em cromossomos e regulação da expressão gênica (DHAR *et al.*, 2021; O'CONNOR₁, 2008; PRAY, 2008).

Por fim, outra característica é a orientação antiparalela das cadeias, o que significa que cada cadeia está arranjada em direções opostas (FIGURA 1A), onde uma fita possui sua extremidade 5' (carbono 5 do açúcar com fosfato livre) emparelhada com a extremidade 3' (carbono 3 do açúcar com hidroxila livre) da outra fita complementar, e vice-versa. Essa orientação constitui a forma como o ácido desoxirribonucleico é replicado e transcrito em ácido ribonucleico (RNA), que por sua vez, é responsável pela codificação, armazenamento e transmissão de informações genéticas nos organismos vivos (DHAR *et al.*, 2021; PRAY, 2008).

FIGURA 1 - A ESTRUTURA DO DNA



FONTE: A = WATSON; CRICK (1953); B = COBB; COMFORT (2023).

LEGENDA: A = estrutura proposta por James Watson e o Francis Crick; B = registro fotográfico feito por Rosalind Franklin.

2.1.2 Tecido Sanguíneo: caracterização e qualidade do sangue periférico para extração do DNA

O tecido sanguíneo é um dos quatro tipos fundamentais de tecidos do corpo humano, realizando funções fisiológicas como o transporte de substâncias, regulação térmica, defesa imunológica e homeostase. Na extração de ácidos nucleicos, o sangue periférico é frequentemente considerado o material mais adequado, principalmente por sua alta abundância e modo de coleta relativamente simples e amplamente aceito em contextos clínicos e de pesquisa (TIVEY *et al.*, 2022; KIM *et al.*, 2021).

O sangue periférico é extraído do sangue circulante que flui por meio do sistema vascular periférico (sistema arterial, sistema venoso e sistema linfático), composto por veias e artérias que se estendem além do coração e dos pulmões. Este sangue é uma mistura de células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) suspensas em plasma, que consiste em uma solução aquosa contendo sais, proteínas e outros solutos, constituindo aproximadamente 55% do volume total (KIM *et al.*, 2021; FERREIRA, 2020).

Quimicamente, o plasma sanguíneo é uma solução coloidal que contém uma variedade de substâncias dissolvidas, incluindo íons como sódio e potássio, bem como proteínas plasmáticas como albumina e globulinas. O pH do sangue periférico é rigorosamente regulado para manter-se entre 7,35 e 7,45, uma faixa ideal para a função celular e enzimática (KIM *et al.*, 2021; FERREIRA, 2020).

Biologicamente, o sangue periférico é rico em diferentes tipos de células sanguíneas. As plaquetas estão envolvidas na coagulação, os eritrócitos são responsáveis pelo transporte de oxigênio e os leucócitos desempenham funções imunológicas. Cada tipo celular tem seu próprio ciclo de vida e funções específicas, reguladas por uma série de sinais bioquímicos e fatores de crescimento (KIM *et al.*, 2021; ABDULRAZZAK *et al.*, 2010).

As plaquetas constituem-se de fragmentos celulares anucleados derivados de células da medula óssea (megacariócitos) que atuam na coagulação sanguínea, através da adesão às áreas de lesão vascular e liberação de fatores que promovem a formação de coágulos. A coagulação sanguínea é desencadeada devido aos mecanismos da hemostasia, que é o processo de prevenção e interrupção de hemorragias, sendo mediada por uma série de reações químicas envolvendo

plaquetas e proteínas plasmáticas para resultar na formação de um coágulo estável (GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014; ABDULRAZZAK *et al.*, 2010).

Os eritrócitos, ou glóbulos vermelhos, são células anucleadas que contêm grandes quantidades de hemoglobina, uma proteína rica em ferro que facilita a ligação e transporte de oxigênio, sendo o elemento mais abundante do tecido sanguíneo. Sua principal função é o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos periféricos e o retorno de dióxido de carbono para excreção pulmonar. Já os leucócitos, ou glóbulos brancos, são células nucleadas e principais efetores do sistema imunológico, sendo classificados em categorias, como os neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Cada uma dessas categorias confere aos leucócitos a capacidade de sair da circulação sanguínea e migrar para tecidos onde exercem suas funções de defesa, como a fagocitose e a liberação de citocinas no corpo (PRETINI *et al.*, 2019; ABDULRAZZAK *et al.*, 2010).

A coleta de sangue periférico é comumente realizada por meio da venopunção, um procedimento minimamente invasivo que envolve a inserção de uma agulha em uma veia, geralmente no antebraço. A técnica é padronizada e requer assepsia do local de retirada para minimizar o risco de contaminação ou infecção no paciente, e em alguns casos, pode-se utilizar métodos como a punção arterial ou a coleta capilar, dependendo da análise requerida (BIERER; STROBER, 2017).

Considera-se que o DNA extraído do sangue periférico possui alta qualidade e integridade molecular. Esse fator decorre, porque os leucócitos presentes no sangue são uma fonte rica de DNA genômico, o que é fundamental para as análises que requerem alta precisão, como o sequenciamento de nova geração e a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) (KIM *et al.*, 2021; BIERER; STROBER, 2017).

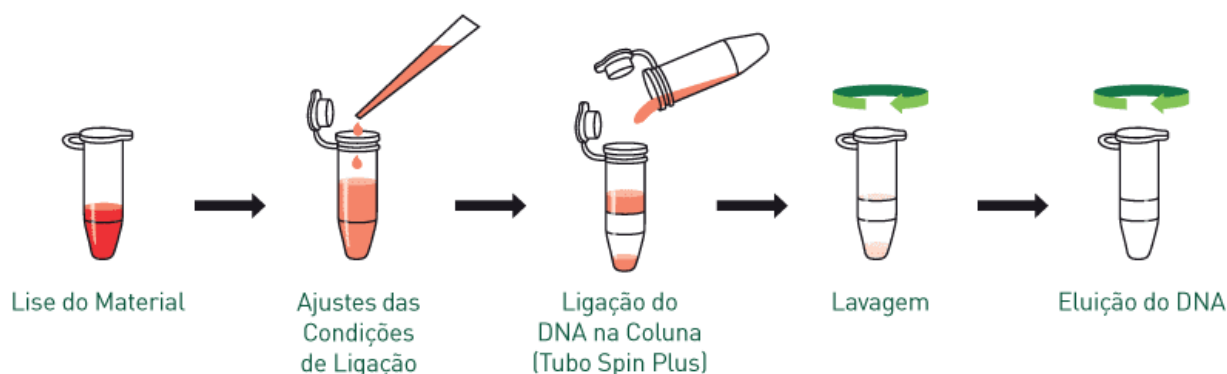
2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO DNA DE SANGUE PERIFÉRICO

A extração de DNA a partir de amostras biológicas, como o sangue periférico, é uma etapa realizada em diversos campos da biologia molecular e da genética. O primeiro isolamento do DNA humano conhecido foi realizado por Friedrich Miescher em 1869, através da lise, com solução alcalina, e precipitação do ácido nucleico, com solução salina, de leucócitos encontrados em pus de feridas.

Desde então, diversos métodos foram desenvolvidos para otimizar a qualidade e a quantidade do DNA extraído desse material, cada um com suas próprias vantagens e limitações (WANG; YU, 2014; ARIAS, 2004).

O processo de extração consiste em duas etapas principais: rompimento das membranas celulares e isolamento do DNA do restante das substâncias. Para sangue periférico, a primeira etapa pode ser realizada com a adição de detergentes, como o SDS (Dodecil sulfato de sódio), enquanto a segunda, pode envolver solventes orgânicos, como o fenol ou álcoois. O Kit comercial EZ-DNA®, desenvolvido pela Biological Industries, utiliza o detergente isotiocianato de guanidina junto com incubação em altas temperaturas para lise celular em amostras coaguladas. Já o kit comercial NeoScience®, desenvolvido pela One Lambda Inc., além da ação do detergente SDS, também se adiciona a proteinase K para lise proteica e inativação de DNAses durante o período de incubação. Outro diferencial do kit é a utilização de colunas de sílica que reterão o lisado presente em soluções tamponadas, sendo o DNA, após lavagem com etanol gelado, eluído da coluna com adição de água ou solução de reidratação específica. A FIGURA 2 esquematiza esse processo de forma simbólica (WANG; YU, 2014; CARDOZO *et al.*, 2009; ARIAS, 2004).

FIGURA 2 - EXTRAÇÃO DE DNA POR MEIO DO KIT COMERCIAL NEOSCIENCE®



FONTE: ARIAS (2004).

Assim como realizado por Miescher em 1869, o Método de *Salting Out*, consiste na adição de altas concentrações salinas, como o cloreto de sódio, para a redução da solubilidade das moléculas orgânicas, principalmente proteínas, durante a etapa de isolamento do DNA. Nesse caso, as células sanguíneas são lisadas pela

ação do SDS e da proteinase K, depois, as proteínas expostas são precipitadas pela adição do sal, e em seguida, o DNA é isolado com a adição de etanol ou isopropanol. Existem protocolos modificados de *Salting Out* que substituem a digestão da proteinase K e outros solventes visando a otimização das etapas, como a utilização de octilfenoxipolietoxietanol ou até mesmo sabão em pó para lavagem de roupas (CHACON-CORTES; GRIFFITHS, 2014; CARDOZO *et al.*, 2009; NASIRI *et al.*, 2005).

Existem métodos que utilizam resinas de troca aniônica ou esferas magnéticas. No caso das resinas, substâncias carregadas positivamente, como a dietilaminoetil celulose, são capazes de ligar os fosfatos de carga negativa dos ácidos nucleicos, além de enzimas e contaminantes, e dessa forma, podem ser usadas para separar essas moléculas baseadas na força de ligação mediante alterações nas concentrações de sais e pH dos tampões utilizados. As esferas, por sua vez, são nanopartículas magnéticas, a exemplo da magnetita, revestidas por polímeros que permitem a ligação reversível com o DNA, como a sílica ou a hidroxiapatita. Através do uso de um ímã externo, o DNA ligado às esferas é isolado do lisado celular, que após a desidratação e concentração com etanol, é eluído durante incubação com solução tamponada em altas temperaturas (KALENDAR; BORONNIKOVA; SEPPÄNEN, 2021; SAIYED; RAMCHAND; TELANG, 2008).

Na perspectiva de Barbosa e colaboradores (2016), a seleção do método de extração de DNA mais apropriado deve ser baseada nas necessidades da pesquisa ou diagnóstico que se necessita realizar, onde cada método possui vantagens e desvantagens em termos de eficiência na obtenção e qualidade do DNA, facilidade de uso e relações de custo-benefício.

2.3 A ESPECTROFOTOMETRIA COMO INDICADOR DA QUANTIDADE E QUALIDADE DO DNA

A espectrofotometria é uma técnica analítica que se baseia na interação entre a matéria e a radiação eletromagnética, em que se quantifica a forma como uma substância absorve ou emite luz, permitindo determinar uma variedade de propriedades, incluindo concentração, contaminação, pureza e características estruturais da substância avaliada. O princípio fundamental da técnica envolve a passagem de um feixe de luz através de uma amostra de interesse, e a medição da

intensidade da luz antes e depois da interação com a amostra. A quantidade de luz que é absorvida ou transmitida pela amostra é utilizada para determinar as propriedades da matéria em estudo (ANSARI *et al.*, 2023; SHIM *et al.*, 2010).

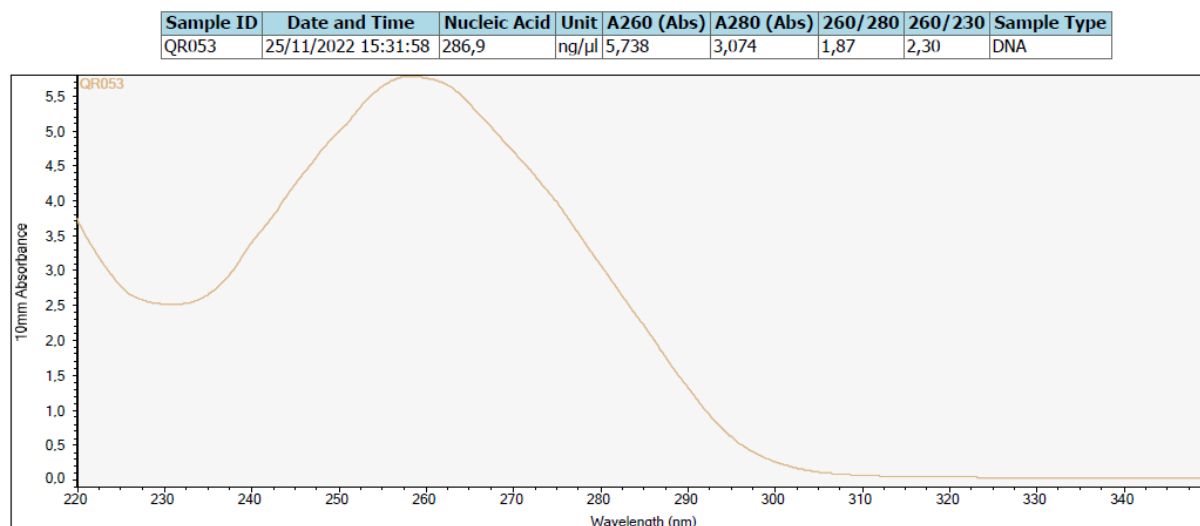
No contexto da biologia molecular, a espectrofotometria atua na quantificação e qualificação de ácidos nucleicos. O DNA é capaz de absorver luz ultravioleta a um comprimento de onda de 260 nm, com 1 OD_{260 nm} (densidade ótica) equivalente a 50 ng/μL na sua forma em dupla-hélice, enquanto as proteínas, por sua vez, exibem pico de absorção em torno de 280 nm. Dessa forma, a razão entre as absorbâncias 260 nm e 280 nm é utilizada como um indicador da pureza do DNA, facilitando a discriminação entre contaminações advindas de proteínas ou de outros compostos orgânicos, que absorvem a luz a 230 nm (GALLAGHER, 2017; SHIM *et al.*, 2010).

A aquisição de uma razão numérica inferior ou superior ao valor predefinido das razões de pureza (260 nm / 280 nm) ou contaminação (260 nm / 230 nm), sinaliza a presença de impurezas, que são oriundas de proteínas, compostos fenólicos, polissacarídeos, nucleotídeos livres ou outros elementos que possuem o potencial de comprometer a acurácia da interpretação espectral. Isso pode levar a leituras não fidedignas dos resultados reais da concentração e qualidade do DNA, em aplicações que requerem alta pureza do DNA, como sequenciamento genômico ou reações de PCR quantitativas. Além disso, a presença de compostos orgânicos e outros reagentes químicos residuais também podem comprometer a integridade estrutural dos ácidos nucleicos, uma vez que intervêm em reações enzimáticas subsequentes ou na eficiência de processos de amplificação (ANSARI *et al.*, 2023; SHIM *et al.*, 2010).

Para realização dessa análise, utiliza-se o equipamento chamado de espectrofotômetro, que examina a absorção ou emissão de radiação eletromagnética em função do comprimento de onda. As múltiplas utilizações deste dispositivo podem ser categorizadas em três segmentos: pode ser usado como um equipamento de investigação das características de substâncias, ou recurso para as avaliações químicas expeditas de soluções e outros compostos, ou como um instrumento para análise, normalização e determinação calorimétrica. Um exemplo de espectrofotômetro é o NanoDrop™ da empresa Thermo Fisher Scientific, que é capaz de analisar amostras altamente concentradas de 0,5 a 2 μL com alta precisão e reprodutibilidade através do uso da tensão superficial em seu sistema de retenção

entre duas fibras ópticas (GALLAGHER, 2017; DESJARDINS; HANSEN; ALLEN, 2009). A FIGURA 3 evidencia o resultado de uma análise de quantificação de DNA obtido com esse aparelho.

FIGURA 3 – PAINEL DE LEITURA DA QUANTIFICAÇÃO DO DNA EM NANODROP™



FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: A tabela superior da imagem mostra os valores de absorvância do DNA (A260 (Abs)) e proteínas (A280 (Abs)), bem como as razões de pureza (260/280) e contaminação (260/230), e a concentração de DNA em ng/μL (Nucleic Acid). O gráfico evidencia o resultado esperado para amostras com DNA de boa qualidade, contendo um sulco inicial a 230 nm para resquícios de contaminantes orgânicos e pico de absorvância do DNA em 260 nm que decresce até 300 nm.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSTRUÇÃO DO BANCO DE DADOS

A construção do banco de dados foi baseada em planilhas Microsoft Excel® de extrações de DNA, efetuadas por mim e outros pesquisadores, provenientes de coletas de sangue realizadas em 229 participantes do projeto do intitulado “Genes, ancestralidade e saúde: traçando um perfil de populações afro-brasileiras do Paraná” (LGMH-UFPR), no período de outubro de 2021 a novembro de 2022.

As informações utilizadas foram: código da amostra, data de coleta, data de extração, protocolo de extração utilizado (sangue total ou camada leucocitária (*buffy coat*)), condição de preservação (congelada ou re congelada), volume inicial (em mL), volume final (em μL), e valores de quantificação (concentração de DNA em $\text{ng}/\mu\text{L}$ e razões de absorbância 260/280 nm (pureza) e 260/230 nm (contaminação)) obtidos por espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific).

Os valores de quantificação foram classificados de acordo com o seguinte critério:

- 260/280 nm entre 1,8 e 1,9 e 260/230 nm entre 1,9 e 2,4 = ESTOQUE;
- 260/280 nm ou 260/230 nm fora do intervalo descrito acima = AVALIAR;
- Concentração de DNA $< 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ = CRÍTICO.

3.2 PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO

Os dois protocolos abordados neste trabalho, para sangue total e *buffy coat*, são adaptações que utilizaram o Kit comercial de Purificação de DNA Genômico Wizard® (Promega).

3.2.1 Sangue total

O sangue total descongelado dos tubos com anticoagulante EDTA foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL, onde foram adicionados 3 vezes o volume inicial (da amostra) de Solução de Lise Celular. Posteriormente, foram deixados em repouso, a temperatura ambiente, por 10 minutos, sendo homogeneizados por inversão de 2 a 3 vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g

por 10 minutos. Após, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o sobrenadante foi descartado, e os tubos submetidos a homogeneização em vórtex por 20 segundos. Esse procedimento foi repetido de 2 a 3 vezes conforme o tempo de congelamento das amostras.

O próximo passo foi a adição de 1 vez o volume inicial (da amostra) de Solução de Lise Nuclear, e a homogeneização realizada vigorosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur até a formação de camadas de espuma. Os tubos foram posteriormente incubados a 37° C em banho-maria por 45 minutos, sendo homogeneizados por inversão de 2 a 3 vezes durante esse período. Após a incubação, foram adicionados 1 mL de Solução de Precipitação de Proteínas para cada 3 mL de volume inicial (da amostra) nos tubos, sendo então, submetidos a homogeneização em vórtex por 20 segundos, seguido de centrifugação a 20.000 g por 10 minutos.

Em tubos Falcon de 15 mL, foram adicionados 1 vez o volume inicial (da amostra) de isopropanol, onde o sobrenadante, após centrifugação, foi transferido com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Os novos tubos então foram homogeneizados delicadamente por inversão até o aparecimento de um aglomerado de filamentos de DNA (“medusa”), e em seguida, centrifugados por 2 minutos a 20.000 g. O sobrenadante foi posteriormente descartado, seguido da adição de 1 vez o volume inicial (da amostra) de etanol 70%, onde a homogeneização por inversão ocorreu até a desfixação do pellet de DNA do fundo dos tubos. Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação por 2 minutos a 20.000 g, e o sobrenadante foi descartado. Após, os tubos foram colocados abertos dentro de uma estufa a 37 °C para a secagem do DNA por um período de 15 a 35 minutos. Posterior a secagem, foram adicionados de 50 a 400 µL de Solução de Reidratação baseados no tamanho da “medusa”, seguido de incubação a 65 °C em banho-maria por 1 hora. Por fim, as amostras foram armazenadas a 4 °C para posterior quantificação em NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific).

3.2.2 Camada leucocitária (*buffy coat*)

O sangue total descongelado dos tubos com anticoagulante EDTA foi submetido a centrifugação por 15 minutos a 3.500 rpm em temperatura ambiente. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o plasma foi descartado, e no

máximo 500 µL da camada leucocitária (buffy coat) foi transferida para microtubos de 2 mL.

Nos microtubos contendo o buffy coat, foram adicionados 3 vezes o volume inicial (da amostra) de Solução de Lise Celular, sendo homogeneizados por inversão de 5 a 6 vezes. Posteriormente, foram deixados em repouso, a temperatura ambiente, por 10 minutos, e homogeneizados por inversão de 2 a 3 vezes durante o período. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 g por 20 segundos. Após, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o sobrenadante foi descartado, e os microtubos submetidos a homogeneização em vórtex por 15 segundos. Esse procedimento foi repetido de 2 a 3 vezes conforme o tempo de congelamento das amostras.

O próximo passo foi a adição de 1 vez o volume inicial (da amostra) de Solução de Lise Nuclear, seguida da homogeneização realizada vigorosamente com os dedos batendo nas laterais dos microtubos até a formação de camadas de espuma. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 37° C em banho-maria com agitação por 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 100 µL de Solução de Precipitação de Proteínas para cada 300 µL de volume inicial (da amostra), sendo os microtubos então, submetidos a homogeneização em vórtex por 20 segundos, seguido de centrifugação a 13.000 g por 3 minutos.

Em microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 1 vez o volume inicial (da amostra) de isopropanol, onde o sobrenadante, após centrifugação, foi transferido com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Os novos microtubos então foram homogeneizados delicadamente por inversão até o aparecimento da “medusa” de DNA, e em seguida, centrifugados por 1 minuto a 13.000 g. O sobrenadante foi posteriormente descartado, seguido da adição de 1 vez o volume inicial (da amostra) de etanol 70%, onde a homogeneização por inversão ocorreu até a desfixação do pellet de DNA do fundo dos microtubos. Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação por 1 minuto a 20.000 g, e o sobrenadante foi descartado. Após, os microtubos foram deixados abertos, virados com a tampa para baixo, em um papel absorvente sob a bancada, para a secagem do DNA por 15 minutos. Por fim, após a secagem, foram adicionados 100 µL de Solução de Reidratação, seguido de armazenamento a 4 °C até a quantificação das amostras em NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific).

3.3 ANÁLISES DE DADOS

As estatísticas utilizadas nos valores de quantificação (concentração de DNA e absorbâncias 260/280 nm e 260/230 nm) do banco de dados foram os cálculos de mediana, mínimo e máximo, Teste de Shapiro-Wilk (GHASEMI; ZAHEDIASL, 2012) para normalidade, Teste de Mann-Whitney (HART, 2001) entre protocolos e com a condição de preservação, Correlação de Spearman (MIOT, 2018) para o tempo de preservação, que por sua vez foi baseado no cálculo da diferença de dias entre a data da coleta e data de extração, e análise de comparação múltipla de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF) pós Teste de Kruskal-Wallis (PONTES, 2000) para condição de preservação no protocolo ST e entre os grupos pós classificação do ITEM 3.1. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas em linguagem de programação R (2021) utilizando o software livre Jamovi (2022). As porcentagens dos grupos ESTOQUE, AVALIAR e CRÍTICO foram calculadas utilizando planilhas Microsoft Excel®.

Para a análise da relação custo-benefício, foram avaliados os volumes amostrais iniciais e finais, a capacidade de processamento, o tempo de execução, o volume de reagentes utilizados e o custo amostral de cada protocolo em estudo. A capacidade de processamento foi baseada na quantidade máxima de amostras que poderiam ser centrifugadas. O tempo de execução aproximado foi calculado baseado apenas nas etapas metodológicas que possuíam períodos de tempo pré-definidos, excluindo a inferência subjetiva. O volume de reagentes foi previsto baseando-se no volume inicial máximo permitido por amostra. O custo amostral foi calculado levando em consideração o valor obtido na capacidade máxima de processamento, e os valores em reais (R\$) foram obtidos através de pesquisas em sites de venda de produtos laboratoriais, para os tubos plásticos, reagentes e kit comercial da Promega. Todos os cálculos foram realizados em planilhas Microsoft Excel®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AS VARIÁVEIS DO BANCO DE EXTRAÇÃO

Após a construção do banco de dados (APÊNDICE 1), observamos que foram extraídas 537 amostras de DNA de 229 participantes, das quais 59,40% ($n = 319$) foram classificadas como ESTOQUE, 18,25% ($n = 98$) como CRÍTICO e 22,35% ($n = 120$) como AVALIAR de acordo com os critérios estabelecidos no ITEM 3.1. Devido a não-normalidade dos dados (Shapiro-Wilk $p < 0,001$), a TABELA 1 evidencia os valores de mediana, máximo e mínimo obtidos para a concentração de DNA ([DNA] ng/μL), e razões de pureza (260/280 nm) e contaminação (260/230 nm).

TABELA 1 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA CONCENTRAÇÃO, PUREZA E CONTAMINAÇÃO

Variável	Mediana	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk
[DNA] ng/μL	157,80	0,700	2134	$p < 0,001$
260/280 nm	1,82	0,530	5,41	$p < 0,001$
260/230 nm	2,11	-26,620	33,44	$p < 0,001$

FONTE: A autora (2023).

NOTA: Análises realizadas em linguagem R com o *software* Jamovi (2022).

De acordo com os valores de mediana obtidos na TABELA 1, verificamos que o DNA extraído, de maneira geral, se enquadra dentro dos critérios de classificação estabelecidos no ITEM 3.1. para amostras de boa qualidade da classe ESTOQUE ([DNA] = 157,80 ng/μL; 260/280 = 1,82; 260/230 = 2,11), apesar da grande variação dos valores mínimos e máximos de absorbância das razões de pureza (mín = 0,530; máx = 5,41) e contaminação (mín = -26,620; máx = 33,44).

Posteriormente a análise geral, avaliamos o DNA extraído de acordo com o protocolo de extração empregado, sangue total (ST) ou *buffy coat* (Buffy), sendo a distribuição das amostras descrita na TABELA 2.

TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O PROTOCOLO

Protocolo	Amostras	Período de coleta	Período de extração	Diferença de dias*	Condição de preservação
ST	262	Out-Dez de 2021	Nov/2021 - Abr/2022	15 a 177	congelada e recongelada
Buffy	275	Set-Nov de 2022	Set/2022 - Nov/2022	1 a 40	congelada

FONTE: A autora (2023).

NOTA: ST = sangue total; Buffy = *buffy coat* (camada leucocitária); * = diferença de dias entre a data da coleta de sangue para a data da extração do DNA

De acordo com os critérios estabelecidos no ITEM 3.1., verificamos que, das 262 amostras extraídas pelo protocolo ST, 35,88% ($n = 94$) foram classificadas como ESTOQUE, 36,64% ($n = 96$) como AVALIAR e 27,48% ($n = 72$) como CRÍTICO. Por outro lado, dentre as 275 amostras extraídas com o protocolo Buffy, 81,82% ($n = 225$) foram classificadas como ESTOQUE, 8,73% ($n = 24$) como AVALIAR e 9,45% ($n = 26$) como CRÍTICO. Após aplicação do Teste de Kruskal-Wallis e análise de comparação múltipla de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF), foram observadas diferenças significativas ($p < 0,001$) apenas na classe ESTOQUE entre os protocolos para as três variáveis em estudo (BUFFY: concentração = 253 ng/ μ L, pureza = 1,84; contaminação = 2,29; ST: concentração = 441 ng/ μ L, pureza = 1,83; contaminação = 2,11).

Através do Teste de Mann-Whitney entre os dois protocolos, verificamos diferenças significativas na mediana dos valores de concentração de DNA (Buffy = 195 ng/ μ L; ST = 112 ng/ μ L; $p < 0,01$), pureza (Buffy = 1,84; ST = 1,79; $p < 0,001$) e contaminação (Buffy = 2,27; ST = 1,80; $p < 0,001$), sendo as obtidas pelo método Buffy significativamente maiores para as três variáveis ($p < 0,001$).

A condição (congelada e recongelada) e tempo (diferença de dias entre a coleta e a extração) de preservação também foram avaliadas. Na análise da condição, o Teste de Mann-Whitney mostrou que a mediana das amostras congeladas (concentração = 157 ng/ μ L; pureza = 1,83; contaminação = 2,24), independente do protocolo, foi significativamente maior que a das recongeladas (concentração = 169 ng/ μ L; pureza = 1,74; contaminação = 1,36) para as três variáveis ($p < 0,001$), no entanto, na análise DSCF pós Kuskal-Wallis, os valores de

concentração de DNA não foram significativos entre re congeladas (78,8 ng/ μ L) *versus* congeladas (169 ng/ μ L) dentro de ST ($p > 0,05$). Já para análise do tempo de preservação independente do protocolo, o Coeficiente de Spearman indicou correlação negativa fraca para a concentração de DNA ($p < 0,001$; $\rho = -0,215$) e negativa moderada para as razões de pureza ($p < 0,001$; $\rho = -0,496$) e contaminação ($p < 0,001$; $\rho = -0,480$) (BABA; VAZ; COSTA, 2014). Para o grupo da extração por ST, obtivemos correlação negativa moderada para razão de contaminação ($p < 0,001$; $\rho = -0,373$) e negativa fraca para pureza ($p < 0,001$; $\rho = -0,276$). Não foi observado correlação significativa para a concentração ([DNA]: $p > 0,05$). Por fim, para as amostras extraídas do *buffy coat*, a correlação negativa moderada foi significativa ($p < 0,001$) para as três variáveis em estudo ([DNA]: $\rho = -0,363$; 260/230: $\rho = -0,333$; 260/280: $\rho = -0,375$).

Muitos fatores pré-analíticos podem influenciar os resultados das análises. Pensando nos ácidos nucleicos, fatores biológicos como sexo, idade, índice de massa corporal (IMC) e problemas de saúde, são frequentemente associados à qualidade e quantidade de DNA (maior rendimento em mulheres do que em homens; correlação negativa com a idade; correlação positiva com IMC) (ELLERVIK; VAUGHT, 2015), mas não foram avaliados neste estudo e podem ser analisadas no futuro.

Pensando em fatores ambientais, a condição e tempo de preservação são as primeiras a serem levadas em consideração, visto que estão envolvidas durante todo o processo analítico. Estudos de estabilidade de exemplares após o armazenamento em comparação com o valor da amostra fresca, são importantes para determinar os efeitos da preservação de longo prazo (ELLERVIK; VAUGHT, 2015). Amostras de sangue armazenadas a 4 °C entre 4 e 6 horas ainda produzirão DNA de qualidade aceitável, enquanto a preservação a -20 °C seria de caráter intermediário e a -80 °C a ideal para períodos maiores. No entanto, o armazenamento de longo prazo próximos a temperatura ambiente e os ciclos repetidos de congelamento e descongelamento devem ser evitados a fim de garantir a integridade da amostra (TAGLIAFERRO *et al.*, 2021; YAMAGATA *et al.*, 2021). Para células congeladas, tanto o descongelamento quanto o congelamento rápido são estressantes e podem resultar em lise celular. A formação dos cristais de gelo pode pressionar as membranas celulares, enquanto o resfriamento lento, pode promover o desequilíbrio da pressão osmótica, através da modificação das

concentrações de proteínas e sais nas soluções plasmáticas, que também gera a ruptura das células. Além disso, com a ruptura celular e exposição do conteúdo nuclear, o DNA fica vulnerável para ação de DNases livres circulantes (LEE; KIM; SHIN, 2015).

Chen e colaboradores (2018), ao investigarem o impacto da preservação a -30 °C, durante diferentes períodos para 2758 amostras, demonstraram que essa temperatura não teve influência negativa significativa sobre a quantidade e qualidade do DNA extraído. Tagliaferro e pesquisadores (2021) também obtiveram resultados semelhantes de concentração ao analisarem amostras congeladas a -20 °C preservadas no intervalo de 5 a 18 anos, apesar do pequeno número amostral ($n = 10$). Nossos resultados obtidos demonstram uma tendência a correlação negativa para a quantidade de DNA extraído (Spearman $p < 0,001$), porém, ao analisarmos separadamente as amostras do protocolo baseado em ST, as únicas submetidas ao evento de descongelamento devido à queda de energia e desligamento dos freezers (TABELA 2), essa correlação acabou não sendo significativa (Spearman $p > 0,05$). Somado a isso, o mesmo cenário foi observado para a análise do ciclo de congelamento e descongelamento, com resultado significativo independente dos protocolos (Mann-Whitney $p < 0,001$) e não significativo para ST (Kuskal-Wallis; DSCF; $p > 0,05$). Esses resultados indicam que esses dois fatores podem não estar associados com os valores de concentração obtidos após quantificação. Por outro lado, apesar das razões 260/280 nm e 260/230 nm mostraram tendências significativas a correlação negativa fraca e moderada (Spearman $p < 0,001$) e associação com o recongelamento (Mann-Whitney $p < 0,001$), de acordo com Chen e colaboradores (2018), esses resultados de variações fora do esperado estariam mais voltados a presença de proteínas e solventes orgânicos resultantes da remoção inadequada dos produtos utilizados nas extrações, que por sua vez, poderia explicar a ausência de diferenças significativas observadas entre as amostras classificadas como AVALIAR e CRÍTICO dos dois protocolos (Kuskal-Wallis; DSCF; $p > 0,05$).

A diferença significativa observada para quantidade, pureza e contaminação do DNA entre os dois protocolos (Mann-Whitney $p < 0,001$) também pode explicar as diferenças significativas voltadas às amostras classificadas como ESTOQUE para as mesmas variáveis (DSCF pós Kruskal-Wallis $p < 0,001$), sendo os melhores resultados obtidos para o Buffy (Mann-Whitney $p < 0,001$). Kumar e colaboradores

(2023), ao avaliarem a extração entre sangue total e *buffy coat* em condições experimentais controladas, também observaram que os parâmetros obtidos pelo Buffy foram significativamente maiores que ST. Assim como o obtido por Kamangu (2018), o *buffy coat* produziu maiores quantidades de DNA por ser um composto concentrado das células nucleadas, ou seja, os glóbulos brancos do sangue total. Por outro lado, Gallego e pesquisadores (2019) encontraram um rendimento relativamente maior para as extrações realizadas com o sangue total em amostras frescas, que se manteve ao analisar amostras congeladas há 12 meses, atribuindo esses resultados a melhor dispersão das células dentro do plasma. Apesar disso, os trabalhos dos três autores mantêm o consenso das diferenças entre ST e Buffy nas razões de pureza e contaminação serem provenientes de resquícios químicos dos próprios protocolos. Outro ponto importante a ser destacado é que, diferente desses autores, nosso trabalho não realizou comparações baseadas em amostras coletadas do mesmo participante, o que é altamente recomendado para análises entre diferentes protocolos de extrações. Em todo caso, essas condições ideais de pesquisa podem ser exploradas no futuro, junto com a avaliação de outros fatores pré-analíticos que não foram abordados, mas que não invalidam a viabilidade dos dois protocolos adaptados para uso em análises genéticas, mantendo a melhor eficiência para as amostras extraídas com o Buffy.

4.2 O CUSTO-BENEFÍCIO POR PROTOCOLO

Na segunda parte do trabalho foram calculados o tempo de execução, o custo e o volume de reagentes, além da capacidade de processamento de cada protocolo (TABELA 3).

TABELA 3 – TEMPO, CUSTO, PROCESSAMENTO E VOLUMES POR PROTOCOLO

Protocolo	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	Capacidade de processamento	Tempo de execução*	Volume de reagentes**	Custo***
ST	1 - 5	30 - 500	12 amostras	3 h e 40 min	32,07 mL	R\$ 632,10
Buffy	0,100 - 0,500	100	30 amostras	2 h e 10 min	3,267 mL	R\$ 151,87

FONTE: A autora (2023).

NOTA: ST = sangue total; Buffy = *buffy coat* (camada leucocitária); * = cálculo baseado nas etapas que possuem períodos de duração pré-definidos; ** = cálculo baseado para 1 amostra com volume inicial máximo; *** = cálculo baseado na capacidade de processamento máximo.

Como mostrado na TABELA 3, o protocolo de extração com o *buffy coat* teve a melhor relação dos fatores avaliados: maior capacidade de extração (30 amostras) com os menores valores de tempo (aproximado em 2 horas e 10 minutos), custo (R\$ 151,87 para 30 amostras, equivalente a R\$ 5,06 por amostra comparado a R\$ 52,68 para ST) e volume (inicial máximo de 500 µL e final fixado em 100 µL por amostra). A soma de todos esses fatores estabelece uma relação de custo-benefício, que por sua vez, tem sido alvo de vários estudos que tentam estabelecer protocolos mais rápidos e com alta eficiência em suas extrações de ácidos nucleicos (YAMAGATA *et al.*, 2021; GUHA *et al.*, 2018; KOSHY *et al.*, 2017; CHACON-CORTES *et al.*, 2012).

No nosso trabalho, foram avaliados dois protocolos modificados para o mesmo kit comercial, onde a mudança no volume inicial para obtenção do DNA foi o ponto chave na otimização dessas condições. A redução do volume inicial utilizado, de 5 mL em ST para 500 µL no Buffy, permitiu tanto o aumento na capacidade de processamento por centrífuga quanto a redução dos volumes de reagentes que já estavam em uso. Além disso, a modificação do protocolo para *buffy coat* trouxe mais estabilidade em etapas específicas, a exemplo da adição de solução de reidratação fixada em 100 µL (TABELA 4) de forma independente ao tamanho do aglomerado de DNA visível obtido após adição de isopropanol (ITEM 3.2.1), da retirada da incubação a 65 °C por 1 hora para solubilização antes da quantificação (ITEM 3.2.1), e da padronização do tempo de secagem em 15 minutos a temperatura ambiente (ITEM 3.2.2), que por sua vez, exclui o uso da estufa e evita a possibilidade da

desidratação irreversível do DNA observada em algumas amostras extraídas do sangue total.

Outro ponto relevante está na análise do tempo envolvido durante os dois processos de extração, visto que é um fator variável, dependente da forma de trabalho de cada pesquisador e influenciado pela disponibilidade de equipamentos para cada etapa (ELLERVIK; VAUGHT, 2015), sendo assim, é importante destacar que os valores apresentados na TABELA 4 são uma pequena fração do tempo realmente consumido na rotina laboratorial.

Por fim, escolha de um método mais prático e barato, que ao mesmo tempo produza quantidades significativas de DNA de boa qualidade para as análises de interesse, pode permitir o investimento na aquisição de novos equipamentos e em treinamentos dos pesquisadores, o que é crucial em ambientes que possuem orçamentos mais limitados (CHACON-CORTES *et al.*, 2012).

5 CONCLUSÕES

- São necessárias novas análises em ambiente controlado com amostras pareadas para avaliar a influência da condição e tempo de preservação sobre os valores de pureza, contaminação e concentração do DNA dos dois protocolos.
- As razões de pureza e contaminação parecem ser mais suscetíveis aos erros de manipulação em cada método de extração.
- O protocolo com o *buffy coat* foi o mais eficiente para a extração de DNA de boa qualidade e na relação custo-benefício comparado com o sangue total.

REFERÊNCIAS

- ABDULRAZZAK, H. *et al.* Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 6, p. 689-706, 2010.
- ANSARI, M.T.L. *et al.* Application of spectrophotometry to detect the urea in milk sample. **Plasmonics in Biology and Medicine XX**, v. 12396, p. 53-58. 2023.
- ARIAS, G. **Em 1953 foi descoberta a estrutura do DNA: etapas de um grande avanço científico**. Passo Fundo: Embrapa TRIGO, 2004. 38 p. (Embrapa. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ISSN 1518-6512).
- BABA, R. K.; VAZ, M. S. M. G.; COSTA, J. Correção de dados agrometeorológicos utilizando métodos estatísticos. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 29, n. 4, p. 515–526. 2014.
- BARBOSA, C. *et al.* DNA extraction: finding the most suitable method. **Molecular microbial diagnostic methods**, n. 7, p. 135-154. 2016.
- BIERER, B. E.; STROBER, W. Venipuncture procedures: Sources of human peripheral blood cells, serum, and plasma. **Current Protocols in Immunology**, v. 118, n. 1, p. 1-5. 2017.
- CARDOZO, D.M. *et al.* Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 651-656, 2009.
- CHACON-CORTES, D; GRIFFITHS, L. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. **Journal of Biorepository Science for Applied Medicine**, v. 2, p. 1-9. 2014.
- CHACON-CORTES, D. *et al.* Comparison of genomic DNA extraction techniques from Whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 5, p. 5961–5966. 2012.

CHEN, W. C. *et al.* The Integrity and Yield of Genomic DNA Isolated from Whole Blood Following Long-Term Storage at -30°C . **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 2, p. 106–113. 2018.

COBB, M.; COMFORT, N. What Watson and Crick really took from Franklin. **Nature**, v. 616, p. 657–660. 2023.

DAHLM, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. **Human genetics**, v. 122, p. 565–581. 2008.

DHAR, G. A. *et al.* DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. **The Nucleus**, v. 64, n. 3, p. 259–270. 2021.

DESJARDINS, P.; HANSEN, J. B.; ALLEN, M. Microvolume Protein Concentration Determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. **Journal of Visualized Experiments**, v. 33, p. 3. 2009.

ELLERVIK, C; VAUGHT, J. Preanalytical Variables Affecting the Integrity of Human Biospecimens in Biobanking. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 7, p. 914–934. 2015.

FERREIRA, O. D. Radiomarcacão de células do sangue periférico com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Tecnécio- 99m) para estudos de sangramentos gastrointestinais e cardiopatias. 2020. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, Recife, 2020.

GALLAGHER, S. R. Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. **Current Protocols in Immunology**, v. 116, p. 14. 2017

GALLEGO, P. F. *et al.* On the Use of Buffy or Whole Blood for Obtaining DNA of High Quality and Functionality: What Is the Best Option? **Biopreservation and Biobanking**, v. 17, n. 6, p. 577-582. 2019.

GAIL, M. H. *et al.* Maximizing DNA yield for epidemiologic studies: no more buffy coats? **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 7, p. 1170-1176. 2013.

GHASEMI, A.; ZAHEDIASL, S. Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 2, p. 486–489. 2012.

GHOSHAL, K.; BHATTACHARYYA, M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 781857, p. 16. 2014.

GUHA, P. *et al.* A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 32, n.1, p. 1–7. 2018.

HART, A. Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important. **The BMJ**, v. 323, n. 7309, p. 391–393. 2001.

KALENDAR, R.; BORONNIKOVA, S.; SEPPÄNEN, M. Isolation and Purification of DNA from Complicated Biological Samples. **Methods in Molecular Biology**, v. 2222, p. 57-67. 2021.

KIM, M. *et al.* Characteristics of Human Peripheral Blood $\gamma\delta$ T Cells Expanded With Zoledronate. **Anticancer Research**, v. 41, n. 12, p. 6031-6038, 2021.

KOSHY, L. *et al.* Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays. **Molecular Biology Reports**, v. 44, n. 1, p. 97–108. 2017.

LEE, J. E.; KIM, S. Y.; SHIN, S. Y. Effect of Repeated Freezing and Thawing on Biomarker Stability in Plasma and Serum Samples. **Osong Public Health Perspect**, v. 6, n. 6, p. 357–362. 2015

MIOT, H. A. Análise de correlação em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 17, n. 4, p. 275-279. 2018.

NASIRI, H. *et al.* Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 19, n. 6, p. 229–232. 2005.

O'CONNOR₁, C. Discovery of DNA as the hereditary material using *Streptococcus pneumoniae*. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 104. 2008.

O'CONNOR₂, C. Isolating hereditary material: Frederick Griffith, Oswald Avery, Personal Hershey, and Martha Chase. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 105, 2008.

PONTES, A. C. F. **Obtenção dos Níveis de Significância para os testes de Kruskal-Wallis, Friedman e comparações múltiplas não paramétricas**. 140 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

PRAY, L. A. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 100. 2008.

PRETINI, V. *et al.* Red Blood Cells: Chasing Interactions. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 945, p. 17. 2019.

R. **R: A Language and environment for statistical computing**. R Core Team, 2021. *Software* Versão 4.1. Disponível em: <https://cran.r-project.org>. Acesso em: 14 set. 2023.

RIEMANN, K. *et al.* Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 21, n. 4, p. 2047–253. 2007.

ROSINGER, S. *et al.* Collection and processing of whole blood for transformation of peripheral blood mononuclear cells and extraction of DNA: the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. **Clinical Trials**, v. 7, p. 65–74. 2010.

SAIYED, Z. M.; RAMCHAND, C. N.; TELANG, S. D. Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 20, n. 20, p. 204153. 2008.

SHIM, S. *et al.* Multilaboratory assessment of variations in spectrophotometry-based DNA quantity and purity indexes. **Biopreservation and Biobanking**, v. 8, n. 4, p. 187-192, 2010.

STANZICK, K. J. *et al.* DNA extraction from clotted blood in genotyping quality. **Biotechniques**, v. 74, n. 1, p. 23–29. 2023.

TAGLIAFERRO, S. S. *et al.* Comparison of DNA extraction methods for samples from old blood collections. **Biotechniques**, v. 70, n. 5, p. 7. 2021.

JAMOVI. The Jamovi Project, 2022. *Software* Versão 2.3. Disponível em: <https://www.jamovi.org>. Acesso em: 14 set. 2023.

TIVEY, A. *et al.* Circulating tumour DNA: Looking beyond the blood. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 19, n. 9, p. 600-612, 2022.

WANG, X.; YU, C. Research advances on DNA extraction methods from peripheral blood mononuclear cells. **Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi**, v. 22, n. 5, p. 1495-1498, 2014.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–738. 1953.

YAMAGATA, H. *et al.* Optimized protocol for the extraction of RNA and DNA from frozen whole blood sample stored in a single EDTA tube. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 17075. 2021.

ZHOU, J. *et al.* Biostorage and Quality Control for Human Peripheral Blood Leukocytes. **Biopreservation and Biobanking**, v. 13, n. 1, p. 13–19. 2015.

APÊNDICE 1 – BANCO DE EXTRAÇÃO DE DNA

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF001.1	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	8,1	1,61	0,54	CRÍTICO
QF001.2	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,450	100	944,1	1,87	2,35	ESTOQUE
QF001.3	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	NA	100	149,8	1,8	2,26	ESTOQUE
QF001.4	29/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	169,5	1,82	2,02	ESTOQUE
QF002	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	5,1	1,63	0,82	CRÍTICO
QF003	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	6,9	1,43	0,78	CRÍTICO
QF004.1	15/11/2021	31/03/2022	ST	congelada	3	150	355,3	1,84	2,24	ESTOQUE
QF004.2	15/11/2021	01/12/2021	ST	congelada	2,5	100	750,9	1,79	2,33	ESTOQUE
QF005.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	0,200	100	199,1	1,81	2,17	ESTOQUE
QF005.2	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	54,7	1,81	1,67	ESTOQUE
QF005.3	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,450	100	172	1,81	1,96	ESTOQUE
QF006.1	15/11/2021	31/03/2022	ST	congelada	3,5	150	319,1	1,83	2,26	ESTOQUE
QF006.2	15/11/2021	01/12/2021	ST	congelada	2,5	150	165,5	1,8	2,13	ESTOQUE
QF007.1	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	1587,5	1,85	2,33	ESTOQUE
QF007.2	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	59,4	1,79	2,38	ESTOQUE
QF007.3	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	NA	100	569,7	1,73	2,15	ESTOQUE
QF007.4	29/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	44,3	1,8	2,16	ESTOQUE
QF008.1	29/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	4,2	0,88	0,23	CRÍTICO
QF008.2	29/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	17,2	1,85	1,65	CRÍTICO
QF008.3	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	253,2	1,87	2,4	ESTOQUE
QF008.4	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	NA	100	115,2	1,83	2,47	ESTOQUE
QF009.1	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	611,4	1,85	2,36	ESTOQUE
QF009.2	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	910	1,83	2,14	ESTOQUE
QF009.3	29/10/2022	31/10/2022	Buffy	congelada	0,250	100	156,8	1,82	2,19	ESTOQUE
QF009.4	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	4	50	36,3	1,28	0,51	AVALIAR
QF009.5	15/11/2021	15/12/2021	ST	congelada	1,5	50	1415,8	1,82	2,01	ESTOQUE

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF010.1	05/12/2021	18/03/2022	ST	congelada	4	100	23,8	1,85	4,6	AVALIAR
QF010.2	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	4	100	3	1,39	0,25	CRÍTICO
QF011	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	2,5	50	355,2	1,22	0,44	AVALIAR
QF012.1	15/11/2021	14/02/2022	ST	congelada	2	NA	864,1	1,84	2,3	ESTOQUE
QF012.2	15/11/2021	01/04/2022	ST	congelada	4	300	1066,7	1,85	2,34	ESTOQUE
QF013.1	15/11/2021	30/11/2021	ST	congelada	4	100	71	1,75	3,4	AVALIAR
QF013.2	15/11/2021	31/03/2022	ST	congelada	4	50	9,6	1,86	2,21	CRÍTICO
QF014	17/10/2021	11/04/2022	ST	recongelada	1,5	100	110,2	1,22	0,34	AVALIAR
QF015.1	15/11/2021	14/02/2022	ST	congelada	1	NA	31,2	2,14	1,12	AVALIAR
QF015.2	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	4	50	10,6	1,31	0,5	CRÍTICO
QF016.1	29/10/2022	31/10/2022	Buffy	congelada	0,500	100	335	1,86	2,36	ESTOQUE
QF016.2	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	365,2	1,88	2,29	ESTOQUE
QF016.3	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	574,2	1,85	2,34	ESTOQUE
QF016.4	15/11/2021	10/12/2021	ST	congelada	1,5	50	114,6	1,32	0,82	AVALIAR
QF016.5	15/11/2021	01/04/2022	ST	congelada	4,5	30	130,4	1,53	0,5	AVALIAR
QF018.1	25/09/2022	21/10/2022	Buffy	congelada	0,500	100	64,9	1,75	1,29	AVALIAR
QF018.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	150,3	1,85	2,09	ESTOQUE
QF018.3	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	421,8	1,86	2,3	ESTOQUE
QF019..4	25/09/2022	26/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	507,3	1,83	2,16	ESTOQUE
QF019.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	273,1	1,85	2,21	ESTOQUE
QF019.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	74,6	1,85	2,23	ESTOQUE
QF019.3	25/09/2022	26/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	785,4	1,81	2,11	ESTOQUE
QF020.1	30/10/2022	31/10/2022	Buffy	congelada	0,500	100	64,8	1,81	2,24	ESTOQUE
QF020.2	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	327,7	1,87	2,32	ESTOQUE
QF020.3	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	159,8	1,83	2,34	ESTOQUE
QF020.4	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	7	1,31	0,37	CRÍTICO
QF021.1	15/11/2021	31/03/2022	ST	congelada	4	100	451,1	1,83	2,26	ESTOQUE
QF021.2	15/11/2021	10/12/2021	ST	congelada	2	50	533	1,82	1,88	ESTOQUE
QF022.1	05/12/2021	31/03/2022	ST	congelada	4	50	12	1,55	5,53	CRÍTICO

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF022.2	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	4	100	623,1	1,82	2,02	ESTOQUE
QF023.1	15/11/2021	15/12/2021	ST	congelada	2	50	57	1,78	0,93	AVALIAR
QF023.2	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	4	300	660,8	1,83	2,11	ESTOQUE
QF024.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	0,200	100	199,5	1,82	2,2	ESTOQUE
QF024.2	25/09/2022	25/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	225,2	1,81	2,02	ESTOQUE
QF024.3	25/09/2022	25/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	574,5	1,83	2,21	ESTOQUE
QF025	15/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	5	100	11,1	1,38	0,67	CRÍTICO
QF026.1	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	28	1,61	0,92	AVALIAR
QF026.2	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	1,5	3,19	0,7	CRÍTICO
QF026.3	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	199,6	1,84	2,41	ESTOQUE
QF026.4	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	306,4	1,85	2,35	ESTOQUE
QF027.1	25/09/2022	22/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	34,5	1,63	1,17	AVALIAR
QF027.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	149,5	1,84	2,21	ESTOQUE
QF027.3	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	730,9	1,81	2	ESTOQUE
QF027.4	25/09/2022	22/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	97	1,8	2,33	ESTOQUE
QF028.1	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	150	803,2	1,73	1,41	AVALIAR
QF028.2	05/12/2021	14/02/2022	ST	congelada	1	NA	184,3	1,83	1,88	ESTOQUE
QF029.1	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	NA	100	21,8	1,87	1,19	AVALIAR
QF029.2	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	NA	100	81,8	1,63	1,34	AVALIAR
QF029.3	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	10,6	1,85	2,26	ESTOQUE
QF029.4	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	53,5	1,85	2,35	ESTOQUE
QF030	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	5	100	5,7	1,44	0,72	CRÍTICO
QF032.1	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	344,1	1,87	2,3	ESTOQUE
QF032.2	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	3,5	300	674,1	1,82	2,06	ESTOQUE
QF033.1	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,150	100	365,5	1,88	2,27	ESTOQUE
QF033.2	29/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	85,9	1,8	1,99	ESTOQUE
QF033.3	05/12/2021	14/02/2022	ST	congelada	1	NA	164,6	1,77	1,71	AVALIAR
QF033.4	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	100	522,7	1,84	2,1	ESTOQUE
QF034	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	5	100	5,7	1,84	0,41	CRÍTICO

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF036	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4,5	100	20,7	1,28	0,31	AVALIAR
QF037	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	5	100	4,7	1,89	1	CRÍTICO
QF038	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	5	100	6,9	1,36	0,53	CRÍTICO
QF039.1	15/11/2021	01/04/2022	ST	congelada	3,5	200	418,8	1,83	2,25	ESTOQUE
QF039.2	15/11/2021	15/12/2021	ST	congelada	2	100	448,1	1,83	1,8	ESTOQUE
QF040.1	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	31,8	1,65	1,2	AVALIAR
QF040.2	05/12/2021	14/02/2022	ST	congelada	1	NA	150,8	1,85	1,52	AVALIAR
QF040.3	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	2	300	434,7	1,83	2,11	ESTOQUE
QF041.1	15/11/2021	01/04/2022	ST	congelada	2	50	25,7	1,85	3,95	AVALIAR
QF041.2	15/11/2021	04/12/2021	ST	congelada	2,5	50	51,4	1,67	1,8	AVALIAR
QF042	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4,5	100	6,4	1,77	1,37	CRÍTICO
QF043.1	15/11/2021	14/02/2022	ST	congelada	1,5	100	14	2,01	5,13	CRÍTICO
QF043.2	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	3	200	256,5	1,81	2,14	ESTOQUE
QF044.1	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	4,1	2,55	0,97	CRÍTICO
QF044.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	248,3	1,82	2	ESTOQUE
QF044.3	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	665	1,82	2,08	ESTOQUE
QF044.4	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	80,9	1,84	1,8	ESTOQUE
QF046.1	05/12/2021	17/03/2022	ST	congelada	NA	NA	32,6	1,74	1,15	AVALIAR
QF046.2	05/12/2021	08/04/2022	ST	congelada	2	100	8,2	1,34	-2,76	CRÍTICO
QF046.3	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	200	616,8	1,83	2,23	ESTOQUE
QF047.1	05/12/2021	17/03/2022	ST	congelada	NA	NA	963,5	1,87	2,32	ESTOQUE
QF047.2	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	400	179	1,81	2,37	ESTOQUE
QF048.1	30/10/2022	31/10/2022	Buffy	congelada	0,250	100	157,9	1,83	2,3	ESTOQUE
QF048.2	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	301	1,85	2,35	ESTOQUE
QF048.3	30/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	64,4	1,79	2,38	ESTOQUE
QF048.4	30/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	188,5	1,82	2,11	ESTOQUE
QF049.1	05/12/2021	17/03/2022	ST	congelada	NA	NA	183,3	1,8	2,02	ESTOQUE
QF049.2	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	100	1257,7	1,86	2,1	ESTOQUE
QF050.1	15/11/2021	15/12/2021	ST	congelada	2	50	27,4	1,69	0,73	AVALIAR

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF050.2	15/11/2021	01/04/2022	ST	congelada	3,5	100	736,8	1,86	2,31	ESTOQUE
QF051	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	100	13,6	1,64	10,77	CRÍTICO
QF052.1	15/11/2021	14/02/2022	ST	congelada	2	80	266,9	1,75	1,62	AVALIAR
QF052.2	15/11/2021	01/04/2022	ST	congelada	3	200	786,6	1,86	2,25	ESTOQUE
QF053.1	15/11/2021	15/12/2021	ST	congelada	2	100	163,6	1,81	1,72	AVALIAR
QF053.2	15/11/2021	01/04/2022	ST	congelada	3	200	866	1,84	2,19	ESTOQUE
QF054.1	15/11/2021	14/02/2022	ST	congelada	1	40	64,9	1,82	2,9	AVALIAR
QF054.2	15/11/2021	01/04/2022	ST	congelada	3	200	386	1,83	1,94	ESTOQUE
QF056.1	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	21,4	1,9	2,46	AVALIAR
QF056.2	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	323,3	1,86	2,36	ESTOQUE
QF056.3	29/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	42,1	1,8	2,17	ESTOQUE
QF056.4	29/10/2022	31/10/2022	Buffy	congelada	0,250	100	173,7	1,85	2,33	ESTOQUE
QF057.1	15/11/2021	30/11/2021	ST	congelada	3	100	20,04	1,68	3,6	AVALIAR
QF057.2	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	3	50	99,8	1,54	0,79	AVALIAR
QF058.1	15/11/2021	15/12/2021	ST	congelada	2	50	15,5	1,71	0,47	CRÍTICO
QF058.2	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	4	50	394,2	1,81	2,18	ESTOQUE
QF060.1	15/11/2021	08/04/2022	ST	congelada	5	100	179,1	1,33	0,51	AVALIAR
QF060.2	15/11/2021	10/12/2021	ST	congelada	5	50	250	1,83	2,25	ESTOQUE
QF061	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	6,1	1,48	0,54	CRÍTICO
QF062.1	15/11/2021	08/04/2022	ST	congelada	3	150	1204,4	1,85	2,34	ESTOQUE
QF062.2	15/11/2021	04/12/2021	ST	congelada	2	150	490,4	1,81	2,1	ESTOQUE
QF063.1	25/09/2022	25/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	54,6	1,75	1,48	AVALIAR
QF063.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	195,8	1,83	2,07	ESTOQUE
QF063.3	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	647,4	1,8	2,09	ESTOQUE
QF064.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	125,7	1,82	1,68	AVALIAR
QF064.2	25/09/2022	26/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	84,4	1,7	1,21	AVALIAR
QF064.3	25/09/2022	26/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	87,7	1,7	1,27	AVALIAR
QF064.4	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	83,7	1,81	2,05	ESTOQUE
QF065	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	9,4	1,25	0,62	CRÍTICO

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF066	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	2,5	100	67,9	1,22	0,41	AVALIAR
QF067	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3,5	100	9,5	1,24	0,56	CRÍTICO
QF068.1	05/12/2021	18/03/2022	ST	congelada	3	150	71,3	1,77	2,58	AVALIAR
QF068.2	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	200	860,5	1,81	2,18	ESTOQUE
QF069.1	15/11/2021	08/04/2022	ST	congelada	5	200	730,6	1,8	1,54	AVALIAR
QF069.2	15/11/2021	10/12/2021	ST	congelada	1,5	100	113,9	1,3	0,53	AVALIAR
QF070	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	7,5	1,34	0,59	CRÍTICO
QF071.1	15/11/2021	08/04/2022	ST	congelada	5	100	71,8	0,86	1,17	AVALIAR
QF071.2	15/11/2021	14/02/2022	ST	congelada	1,5	100	228,4	1,85	2,34	ESTOQUE
QF072	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	5	100	4,3	1,33	0,29	CRÍTICO
QF074.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	316,2	1,84	2,21	ESTOQUE
QF074.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	359,7	1,83	1,93	ESTOQUE
QF074.3	25/09/2022	22/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	612,4	1,84	2,29	ESTOQUE
QF074.4	25/09/2022	22/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	301,5	1,85	2,39	ESTOQUE
QF075.1	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	NA	100	64,7	1,81	1,59	AVALIAR
QF075.2	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	NA	100	1,4	2,26	0,53	CRÍTICO
QF075.3	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	132,9	1,84	2,33	ESTOQUE
QF075.4	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	94,2	1,83	2,2	ESTOQUE
QF076.1	05/12/2021	18/03/2022	ST	congelada	NA	NA	9,2	1,85	-26,62	CRÍTICO
QF076.2	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	100	510,2	1,85	2,34	ESTOQUE
QF077.1	29/10/2022	31/10/2022	Buffy	congelada	0,250	100	199,1	1,85	2,08	ESTOQUE
QF077.1	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,450	100	934,9	1,83	2,29	ESTOQUE
QF077.2	15/11/2021	04/12/2021	ST	congelada	2,5	50	32,5	1,66	2,6	AVALIAR
QF077.2	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	720,2	1,84	1,96	ESTOQUE
QF077.3	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	4	100	119,2	1,43	0,48	AVALIAR
QF078	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	7,5	1,34	0,7	CRÍTICO
QF079.1	30/10/2022	31/10/2022	Buffy	congelada	0,250	100	815,5	1,84	2,24	ESTOQUE
QF079.2	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	249,8	1,86	2,38	ESTOQUE
QF079.3	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	391,9	1,87	2,29	ESTOQUE
QF080	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	11	1,31	0,68	CRÍTICO

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF081	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	7,9	1,43	0,86	CRÍTICO
QF082	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	8,5	1,29	0,3	CRÍTICO
QF083	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4,5	100	5,7	1,51	0,64	CRÍTICO
QF084	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3,5	100	5,3	1,7	0,69	CRÍTICO
QF085	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	13,5	1,24	0,4	CRÍTICO
QF086	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	5	100	4,2	1,61	0,39	CRÍTICO
QF087	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	5	100	5,9	1,52	1,09	CRÍTICO
QF088	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	118,8	1,22	0,37	AVALIAR
QF089	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4,5	100	5,6	1,8	1,13	CRÍTICO
QF091	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4,5	100	6,5	1,54	0,9	CRÍTICO
QF092	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	48,7	1,36	0,61	AVALIAR
QF093	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	7,7	1,5	0,41	CRÍTICO
QF094	15/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	8	1,33	0,48	CRÍTICO
QF095	17/10/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	7,5	1,22	0,46	CRÍTICO
QF096	17/10/2021	11/04/2022	ST	recongelada	4	100	15	1,36	0,47	CRÍTICO
QF097	17/10/2021	11/04/2022	ST	recongelada	4	100	15,1	1,34	0,51	CRÍTICO
QF100.1	30/10/2022	31/10/2022	Buffy	congelada	0,300	100	1032,5	1,83	2,32	ESTOQUE
QF100.2	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	145,6	1,83	2,32	ESTOQUE
QF100.3	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,450	100	713,1	1,83	2,23	ESTOQUE
QF100.4	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	322,8	1,86	2,37	ESTOQUE
QF100.5	30/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	122,7	1,83	2,27	ESTOQUE
QF100.6	17/10/2021	11/04/2022	ST	recongelada	4	100	10,8	1,32	0,35	CRÍTICO
QF101.1	15/11/2021	15/12/2021	ST	congelada	2	50	61,7	1,74	1,06	AVALIAR
QF101.2	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	4	50	5,6	1,31	0,33	CRÍTICO
QF102.1	05/12/2021	18/03/2022	ST	congelada	NA	NA	10,1	2,12	33,44	CRÍTICO
QF102.2	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	4	50	229,7	1,82	2,06	ESTOQUE
QF103.1	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	4	100	2,4	1,66	-1,35	CRÍTICO
QF103.2	05/12/2021	18/03/2022	ST	congelada	NA	NA	26,5	1,89	1,95	ESTOQUE
QF104.1	15/11/2021	18/03/2022	ST	congelada	NA	NA	276	1,61	1,2	AVALIAR
QF104.2	15/11/2021	14/04/2022	ST	recongelada	4	100	124,6	1,41	0,43	AVALIAR

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF104.3	15/11/2021	30/11/2021	ST	congelada	2	200	49,1	1,84	2,43	ESTOQUE
QF105.1	29/10/2022	31/10/2022	Buffy	congelada	0,300	100	264,8	1,86	2,37	ESTOQUE
QF105.2	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	439,5	1,87	2,38	ESTOQUE
QF105.3	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	522,5	1,82	2,03	ESTOQUE
QF105.4	29/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	50,8	1,75	2,1	ESTOQUE
QF106.1	29/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	1,7	1,23	1,08	CRÍTICO
QF106.2	29/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	6,2	1,87	0,95	CRÍTICO
QF106.3	29/10/2022	01/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	514,5	1,85	2,29	ESTOQUE
QF106.4	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	236,9	1,84	2,3	ESTOQUE
QF110.1	29/10/2022	01/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	937,1	1,84	2,23	ESTOQUE
QF110.2	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	106,8	1,84	2,4	ESTOQUE
QF110.3	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	406	1,86	2,3	ESTOQUE
QF110.4	29/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,150	100	111,9	1,81	2,14	ESTOQUE
QF111.1	30/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	39	1,76	1,47	AVALIAR
QF111.2	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	0,8	2,07	0,41	CRÍTICO
QF111.3	30/10/2022	31/10/2022	Buffy	congelada	0,250	100	157,8	1,83	2,31	ESTOQUE
QF111.4	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,150	100	195,3	1,85	2,35	ESTOQUE
QF113.1	29/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	0,7	5,41	0,61	CRÍTICO
QF113.2	29/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	3,9	2,55	1,74	CRÍTICO
QF113.3	29/10/2022	31/10/2022	Buffy	congelada	0,300	100	1227,6	1,85	2,35	ESTOQUE
QF113.4	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	488,4	1,83	2,29	ESTOQUE
QF114.1	29/10/2022	01/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	757	1,85	2,27	ESTOQUE
QF114.2	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	1855,7	1,86	2,32	ESTOQUE
QF114.3	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	216,2	1,86	2,37	ESTOQUE
QF114.4	29/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	321,1	1,86	2,29	ESTOQUE
QF115.1	30/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	14,2	1,79	1,7	CRÍTICO
QF115.2	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	397,9	1,86	2,27	ESTOQUE
QF115.3	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,100	100	114,3	1,86	2,37	ESTOQUE
QF115.4	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	228,9	1,84	2,41	ESTOQUE
QF116.1	30/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,150	100	54,8	1,76	2,67	AVALIAR

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF116.2	30/10/2022	01/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	334,5	1,86	2,27	ESTOQUE
QF116.3	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	131,5	1,86	2,3	ESTOQUE
QF116.4	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	164,4	1,82	2,42	ESTOQUE
QF117.1	30/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	15,2	1,79	1,18	CRÍTICO
QF117.2	30/10/2022	01/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	317,2	1,86	2,33	ESTOQUE
QF117.3	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,150	100	229,4	1,85	2,35	ESTOQUE
QF117.4	30/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	116,6	1,84	2,28	ESTOQUE
QF118.1	30/10/2022	01/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	107,9	1,85	2,26	ESTOQUE
QF118.2	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	317	1,86	2,33	ESTOQUE
QF118.3	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	153,3	1,83	2,45	ESTOQUE
QF118.4	30/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,100	100	47,4	1,8	2,1	ESTOQUE
QF119.1	15/11/2021	10/12/2021	ST	congelada	2	100	430,5	1,83	2,26	ESTOQUE
QF119.2	15/11/2021	08/04/2022	ST	congelada	4	100	233,2	1,81	2,31	ESTOQUE
QF120.1	15/11/2021	08/04/2022	ST	congelada	5	100	14,7	1,29	0,49	CRÍTICO
QF120.2	15/11/2021	04/12/2021	ST	congelada	2	50	188,6	1,81	2,15	ESTOQUE
QF121.1	15/11/2021	08/04/2022	ST	congelada	4,5	100	28,9	1,27	0,52	AVALIAR
QF121.2	15/11/2021	10/12/2021	ST	congelada	2	100	379	1,79	1,93	ESTOQUE
QF122.1	05/12/2021	18/03/2022	ST	congelada	NA	NA	8,6	1,73	-1,81	CRÍTICO
QF122.2	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	2	100	9,8	1,53	0,82	CRÍTICO
QF123.1	05/12/2021	18/03/2022	ST	congelada	3	50	12,6	1,8	7,22	CRÍTICO
QF123.2	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	100	28,6	1,76	1,86	ESTOQUE
QF124.1	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	4,5	100	56,4	1,51	0,54	AVALIAR
QF124.2	15/11/2021	30/11/2021	ST	congelada	2	100	10,4	1,25	2,55	CRÍTICO
QF125	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	4	300	610,4	1,85	2,36	ESTOQUE
QF127.1	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	37,7	1,76	2,5	AVALIAR
QF127.2	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	469	1,86	2,34	ESTOQUE
QF127.3	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	928,1	1,85	2,39	ESTOQUE
QF127.4	29/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	62,1	1,8	2,05	ESTOQUE
QF128.1	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3,5	100	59,6	1,71	1,35	AVALIAR
QF128.2	05/12/2021	18/03/2022	ST	congelada	NA	NA	15,1	1,93	3,77	CRÍTICO

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF129.1	15/11/2021	15/12/2021	ST	congelada	2	50	72,9	1,72	1,02	AVALIAR
QF129.2	15/11/2021	08/04/2022	ST	congelada	5	100	1036,2	1,84	2,11	ESTOQUE
QF130.1	05/12/2021	18/03/2022	ST	congelada	3	150	25	1,84	2,99	AVALIAR
QF130.2	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	250	551,6	1,83	2,25	ESTOQUE
QF131.1	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	3	100	827,3	1,76	1,5	AVALIAR
QF131.2	15/11/2021	10/12/2021	ST	congelada	3	200	291,5	1,81	1,91	ESTOQUE
QF132	15/11/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	300	523,3	1,81	1,95	ESTOQUE
QF135.1	15/11/2021	10/12/2021	ST	congelada	2	50	37,3	1,84	2,72	AVALIAR
QF135.2	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	3	300	617,6	1,78	1,8	ESTOQUE
QF137.1	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	4,5	100	257,1	1,38	0,6	AVALIAR
QF137.2	05/12/2021	18/03/2022	ST	congelada	NA	NA	10,3	2,13	-5,62	CRÍTICO
QF138.1	05/12/2021	31/03/2022	ST	congelada	3	100	9,5	1,58	-4,8	CRÍTICO
QF138.1	05/12/2021	14/04/2022	ST	recongelada	3	200	760,5	1,83	2,27	ESTOQUE
QF139.1	05/12/2021	31/03/2022	ST	congelada	4	50	17,3	1,84	1,37	CRÍTICO
QF139.2	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	4	100	18,3	1,56	1,78	CRÍTICO
QF141	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	4	100	303,5	1,81	1,91	ESTOQUE
QF142.1	05/12/2021	17/03/2022	ST	congelada	1	450	140,3	1,8	1,77	AVALIAR
QF142.2	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	4,5	100	52,7	1,74	3,27	AVALIAR
QF142.3	05/12/2021	08/04/2022	ST	congelada	2	200	150,1	1,8	1,85	ESTOQUE
QF143.1	05/12/2021	17/03/2022	ST	congelada	1	50	114,6	1,6	0,73	AVALIAR
QF143.2	05/12/2021	08/04/2022	ST	congelada	2	NA	122,2	1,58	0,75	AVALIAR
QF143.3	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	4	100	4	1,24	2,58	CRÍTICO
QF145.1	30/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,100	100	83,9	1,82	2,09	ESTOQUE
QF145.1	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	532,4	1,86	2,26	ESTOQUE
QF145.2	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,450	100	528,7	1,83	1,91	ESTOQUE
QF145.3	30/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	103	1,83	2,47	ESTOQUE
QF146.1	15/11/2021	15/12/2021	ST	congelada	2,5	50	15,6	1,82	0,56	CRÍTICO
QF146.2	15/11/2021	11/04/2022	ST	recongelada	3	100	563,7	1,81	1,84	ESTOQUE
QF147.1	15/11/2021	15/12/2021	ST	congelada	2	100	1430,4	1,8	1,35	AVALIAR

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF147.2	15/11/2021	14/04/2022	ST	recongelada	4	200	290,9	2,07	2,91	AVALIAR
QF148.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	66,5	1,8	2,02	ESTOQUE
QF148.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	241,9	1,83	2,27	ESTOQUE
QF148.3	25/09/2022	21/10/2022	Buffy	congelada	0,500	100	24,2	1,85	2,01	ESTOQUE
QF150.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	127,8	1,81	1,81	ESTOQUE
QF150.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	331,7	1,86	2,32	ESTOQUE
QF150.3	25/09/2022	25/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	551,3	1,84	2,31	ESTOQUE
QF150.4	25/09/2022	25/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	206,4	1,83	2,33	ESTOQUE
QF151.1	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,450	100	140,3	1,82	2,64	AVALIAR
QF151.2	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	NA	100	6,6	1,65	1,81	CRÍTICO
QF151.3	30/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	3	1,51	0,47	CRÍTICO
QF151.4	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	456,4	1,83	2,3	ESTOQUE
QF152.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	12,6	1,97	1,21	CRÍTICO
QF152.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	16,4	1,98	1,41	CRÍTICO
QF152.3	25/09/2022	25/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	152,3	1,83	2,17	ESTOQUE
QF153.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	352,9	1,82	1,99	ESTOQUE
QF153.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	271,5	1,82	1,85	ESTOQUE
QF153.3	25/09/2022	26/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	300,1	1,82	2,16	ESTOQUE
QF153.4	25/09/2022	26/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	171,8	1,81	2,24	ESTOQUE
QF154.1	05/12/2021	17/03/2022	ST	congelada	1	200	29,2	1,82	1,47	AVALIAR
QF154.2	05/12/2021	08/04/2022	ST	congelada	2	NA	29,2	1,74	1,86	ESTOQUE
QF154.3	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	4	200	504,3	1,84	2,23	ESTOQUE
QF155.1	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	12,2	1,85	5,3	CRÍTICO
QF155.2	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	310,2	1,86	2,38	ESTOQUE
QF155.3	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,150	100	303,3	1,86	2,34	ESTOQUE
QF155.4	30/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,100	100	197,2	1,84	2,3	ESTOQUE
QF156.1	05/12/2021	17/03/2022	ST	congelada	1	250	89,9	1,8	1,77	AVALIAR
QF156.2	05/12/2021	01/04/2022	ST	congelada	3	50	84,8	1,76	1,9	ESTOQUE
QF156.3	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	3	100	549,1	1,82	2,03	ESTOQUE

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF157.1	30/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	4,9	1,66	0,6	CRÍTICO
QF157.2	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	464,3	1,85	2,36	ESTOQUE
QF157.3	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	188,8	1,84	2,32	ESTOQUE
QF157.4	30/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	44,8	1,8	2,28	ESTOQUE
QF158.1	30/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	9,6	1,85	1,74	CRÍTICO
QF158.2	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	324,5	1,86	2,35	ESTOQUE
QF158.3	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	232,4	1,84	2,35	ESTOQUE
QF158.4	30/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	165,6	1,84	2,3	ESTOQUE
QF160.1	05/12/2021	17/03/2022	ST	congelada	1	50	46	1,77	2,8	AVALIAR
QF160.2	05/12/2021	01/04/2022	ST	congelada	2	50	45,1	1,7	3,64	AVALIAR
QF160.3	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	4	150	733,9	1,83	2,14	ESTOQUE
QF161.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	311,4	1,8	1,71	AVALIAR
QF161.2	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	52	1,78	1,42	AVALIAR
QF161.3	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	117,9	1,72	1,53	AVALIAR
QF161.4	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	513,8	1,83	2,16	ESTOQUE
QF162.1	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	672	1,84	2,37	ESTOQUE
QF162.2	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	576,8	1,85	2,33	ESTOQUE
QF162.3	30/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	141,8	1,82	2,23	ESTOQUE
QF162.4	30/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	112,6	1,81	2,06	ESTOQUE
QF163.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	59,8	1,83	2,28	ESTOQUE
QF163.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	58,5	1,85	2,15	ESTOQUE
QF163.3	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	42,8	1,9	2,38	ESTOQUE
QF163.4	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	224,4	1,85	2,02	ESTOQUE
QF164.1	05/12/2021	17/03/2022	ST	congelada	NA	NA	125,3	1,85	1,8	AVALIAR
QF164.2	05/12/2021	01/04/2022	ST	congelada	1	50	182	1,77	1,81	AVALIAR
QF164.3	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	3	300	403	1,83	2,1	ESTOQUE
QF166.1	05/12/2021	31/03/2022	ST	congelada	4	50	18,1	1,93	0,74	CRÍTICO
QF166.2	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	3	100	2,4	1,16	1,84	CRÍTICO
QF167.1	29/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	15,6	1,87	1,77	CRÍTICO

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF167.2	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	452,9	1,86	2,34	ESTOQUE
QF167.3	29/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	63,2	1,83	2,32	ESTOQUE
QF167.3	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	158,8	1,83	2,46	ESTOQUE
QF168.1	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	2,5	100	4,2	1,11	0,29	CRÍTICO
QF168.2	05/12/2021	17/03/2022	ST	congelada	NA	NA	150	1,82	1,94	ESTOQUE
QF168.3	05/12/2021	01/04/2022	ST	congelada	1	100	147,9	1,78	2,19	ESTOQUE
QF169	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	2,5	100	23,4	1,11	-3,79	AVALIAR
QF171	05/12/2021	13/04/2022	ST	recongelada	2,5	100	1,4	1,93	0,32	CRÍTICO
QF172.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	301,2	1,84	2,3	ESTOQUE
QF172.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	1043,8	1,84	2,3	ESTOQUE
QF172.3	25/09/2022	26/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	382,4	1,84	2,3	ESTOQUE
QF172.4	25/09/2022	26/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	304,1	1,82	2,06	ESTOQUE
QF173.1	25/09/2022	25/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	4,5	0,99	0,23	CRÍTICO
QF173.2	25/09/2022	25/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	9	1,55	1,48	CRÍTICO
QF173.3	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	331,5	1,83	2,32	ESTOQUE
QF173.4	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	461,8	1,84	2,26	ESTOQUE
QF176	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	158,6	1,85	2,37	ESTOQUE
QF177.1	25/09/2022	25/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	35,6	1,07	0,28	AVALIAR
QF177.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	443,9	1,86	2,26	ESTOQUE
QF177.3	25/09/2022	22/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	270,6	1,84	2,32	ESTOQUE
QF178.1	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	40	1,83	2,04	ESTOQUE
QF178.2	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	89,4	1,84	2,36	ESTOQUE
QF178.3	25/09/2022	26/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	179,4	1,81	2,27	ESTOQUE
QF178.4	25/09/2022	26/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	92,5	1,82	2,25	ESTOQUE
QF179.1	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	NA	100	25	1,83	1,12	AVALIAR
QF179.2	25/09/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	NA	100	90,3	1,8	1,63	AVALIAR
QF179.3	25/09/2022	26/09/2022	Buffy	congelada	NA	100	375,9	1,84	2,06	ESTOQUE
QF179.4	25/09/2022	22/10/2022	Buffy	congelada	NA	100	123,3	1,83	2,31	ESTOQUE
QF180.1	29/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	183,7	1,83	2,37	ESTOQUE

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QF180.2	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	734,8	1,85	2,34	ESTOQUE
QF180.3	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	170,5	1,83	2,44	ESTOQUE
QF180.4	29/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	154,6	1,82	2,11	ESTOQUE
QF181.1	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	18,2	1,91	2,04	ESTOQUE
QF181.2	29/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	361	1,85	2,18	ESTOQUE
QF181.3	29/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	106,9	1,79	2,05	ESTOQUE
QF181.4	29/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	117,6	1,81	2,17	ESTOQUE
QF182.1	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	156,7	1,85	2,37	ESTOQUE
QF182.2	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	237	1,86	2,32	ESTOQUE
QF182.3	30/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	98	1,84	2,27	ESTOQUE
QF182.4	30/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	26,3	1,82	1,82	ESTOQUE
QF183.1	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,100	100	74,9	1,8	1,63	AVALIAR
QF183.2	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	NA	100	38,6	1,81	1,62	AVALIAR
QF183.3	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	101,9	1,82	2,39	ESTOQUE
QF183.4	30/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	42,3	1,84	2,05	ESTOQUE
QF184.1	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	832,1	1,82	2,09	ESTOQUE
QF184.2	30/10/2022	14/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	1	0,53	0,36	CRÍTICO
QF184.3	30/10/2022	03/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	1059,5	1,85	2,27	ESTOQUE
QF184.4	30/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	257,2	1,82	2,02	ESTOQUE
QF185.1	30/10/2022	10/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	11,4	1,78	1,92	CRÍTICO
QF185.2	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	245,8	1,86	2,34	ESTOQUE
QF185.3	30/10/2022	04/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	271,1	1,85	2,33	ESTOQUE
QF185.4	30/10/2022	16/11/2022	Buffy	congelada	0,185	100	70	1,81	2,15	ESTOQUE
QR001.1	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	2	100	54,2	1,23	0,18	AVALIAR
QR001.2	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	2,5	100	182,8	1,82	2,52	ESTOQUE
QR002.1	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	2,5	50	5,9	1,91	-0,72	CRÍTICO
QR002.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	2	100	7,6	1,49	0,62	CRÍTICO
QR003.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	650,7	1,85	2,17	ESTOQUE
QR003.1	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	2	200	677,6	1,82	1,77	AVALIAR

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QR003.2	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	2,5	100	96,7	1,81	2,88	AVALIAR
QR005.1	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	2	50	20,3	1,91	3,83	AVALIAR
QR005.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	1320,2	1,83	1,7	AVALIAR
QR006.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,450	100	350,3	1,87	2,32	ESTOQUE
QR006.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	600,7	1,85	2,24	ESTOQUE
QR006.3	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	167,2	1,82	2,4	ESTOQUE
QR008.1	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	308,7	1,33	0,51	AVALIAR
QR008.2	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	2	200	126,1	1,79	2,07	ESTOQUE
QR009.1	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	159	1,76	1,3	AVALIAR
QR009.2	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	2	50	6,4	2,04	-1,34	CRÍTICO
QR010.1	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	3	200	14,4	1,85	1,69	CRÍTICO
QR010.1	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	50	168,2	1,73	1,52	AVALIAR
QR011.1	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	50	170,1	1,74	1,58	AVALIAR
QR011.2	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	2,5	100	50,6	1,8	2,3	ESTOQUE
QR012.1	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	56,4	1,36	0,72	AVALIAR
QR012.2	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	2,5	200	37,7	1,81	2	ESTOQUE
QR013.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	534,7	1,88	2,34	ESTOQUE
QR013.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	207,3	1,85	2,19	ESTOQUE
QR013.3	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	690	1,84	2,44	ESTOQUE
QR013.4	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	4	NA	602,2	1,85	2,34	ESTOQUE
QR013.5	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	NA	NA	602,8	1,84	2,31	ESTOQUE
QR014.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	522,5	1,87	2,34	ESTOQUE
QR014.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	583,1	1,86	2,28	ESTOQUE
QR014.3	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	412,3	1,88	2,34	ESTOQUE
QR014.4	28/11/2021	16/02/2022	ST	congelada	2	100	22,1	1,76	3,03	AVALIAR
QR014.5	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	50	1,43	0,45	AVALIAR
QR015.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	614,5	1,85	2,3	ESTOQUE
QR015.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	658,8	1,84	2,28	ESTOQUE
QR015.3	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	1124	1,85	2,38	ESTOQUE

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QR015.4	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	200	877,7	1,81	1,71	AVALIAR
QR015.5	28/11/2021	18/02/2022	ST	congelada	NA	NA	45,5	1,78	1,87	ESTOQUE
QR015.6	28/11/2021	04/03/2022	ST	congelada	1	100	97,5	1,76	1,98	ESTOQUE
QR016.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	414,4	1,87	2,3	ESTOQUE
QR016.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	2,5	100	241,4	1,75	1,28	AVALIAR
QR017.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	649,9	1,82	2,26	ESTOQUE
QR017.2	28/11/2021	25/02/2022	ST	congelada	2	300	708,6	1,79	1,47	AVALIAR
QR017.3	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	200	1810,7	1,83	1,82	ESTOQUE
QR020.1	28/11/2021	25/02/2022	ST	congelada	1,5	100	538	1,77	1,19	AVALIAR
QR020.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	400	1221,6	1,81	1,64	AVALIAR
QR021.1	28/11/2021	04/03/2022	ST	congelada	1	100	11,2	1,88	1,12	CRÍTICO
QR021.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	200	388,6	1,81	1,92	ESTOQUE
QR022.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	95,9	1,82	1,62	ESTOQUE
QR022.2	28/11/2021	04/03/2022	ST	congelada	1	200	40,7	1,64	1,22	AVALIAR
QR022.3	28/11/2021	18/02/2022	ST	congelada	1	150	72,2	1,72	1,64	AVALIAR
QR022.4	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	300	490,5	1,78	1,45	AVALIAR
QR023	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	400	546	1,73	1,12	AVALIAR
QR024.1	28/11/2021	24/02/2022	ST	congelada	NA	NA	8,5	1,69	-3,19	CRÍTICO
QR024.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	200	931,2	1,86	2,41	ESTOQUE
QR025.1	28/11/2021	04/03/2022	ST	congelada	1	50	21,25	1,65	1,17	AVALIAR
QR025.2	28/11/2021	18/02/2022	ST	congelada	1	50	63,7	1,83	1,97	ESTOQUE
QR025.3	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	223,1	1,81	1,99	ESTOQUE
QR026.1	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	301,9	1,73	1,14	AVALIAR
QR026.2	28/11/2021	24/02/2022	ST	congelada	NA	NA	10,5	2,13	3,78	CRÍTICO
QR026.3	28/11/2021	04/03/2022	ST	congelada	1,5	50	9,9	1,51	2,11	CRÍTICO
QR027.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	102,9	1,8	1,65	ESTOQUE
QR027.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	613	1,75	1,13	AVALIAR
QR027.3	28/11/2021	18/02/2022	ST	congelada	NA	NA	17,9	1,59	1,27	CRÍTICO
QR027.4	28/11/2021	04/03/2022	ST	congelada	1	50	18,2	1,61	3,06	CRÍTICO

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QR028.1	28/11/2021	04/03/2022	ST	congelada	1,5	300	178,7	1,77	1,86	AVALIAR
QR028.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	300	1314,9	1,85	2,26	ESTOQUE
QR030	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	200	526,2	1,82	2	ESTOQUE
QR031.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	237,6	1,86	2,29	ESTOQUE
QR031.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	303,8	1,87	2,18	ESTOQUE
QR031.3	28/11/2021	18/02/2022	ST	congelada	1	50	92,6	1,78	1,89	ESTOQUE
QR031.4	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	300	386,7	1,82	1,93	ESTOQUE
QR032.1	28/11/2021	04/03/2022	ST	congelada	2	NA	541,1	1,79	1,67	AVALIAR
QR032.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	100	1374,3	1,85	2,16	ESTOQUE
QR033.1	28/11/2021	18/02/2022	ST	congelada	1	75	46,2	1,73	1,7	AVALIAR
QR033.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	206,8	1,77	1,49	AVALIAR
QR033.3	28/11/2021	07/03/2022	ST	congelada	NA	NA	132,3	1,84	1,95	ESTOQUE
QR034.1	28/11/2021	25/02/2022	ST	congelada	2	200	164,6	1,79	2,43	ESTOQUE
QR034.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	4	200	765,5	1,84	2,23	ESTOQUE
QR035.1	28/11/2021	18/02/2022	ST	congelada	1	100	36,6	1,72	3,16	AVALIAR
QR035.2	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	1210,8	1,72	0,95	AVALIAR
QR035.3	28/11/2021	07/03/2022	ST	congelada	NA	NA	464,3	1,85	2,16	ESTOQUE
QR036.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,150	100	41,3	1,86	2,28	ESTOQUE
QR036.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,100	100	438,7	1,88	2,34	ESTOQUE
QR036.3	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	643,6	1,86	2,41	ESTOQUE
QR036.4	28/11/2021	07/03/2022	ST	congelada	NA	NA	1192,4	1,83	1,73	AVALIAR
QR036.5	28/11/2021	18/02/2022	ST	congelada	1	150	38	1,73	2,31	ESTOQUE
QR036.6	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	200	414,8	1,82	1,8	ESTOQUE
QR037.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	54,5	1,85	2,38	ESTOQUE
QR037.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	369,9	1,86	2,31	ESTOQUE
QR037.3	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	113,9	1,81	2,39	ESTOQUE
QR037.4	28/11/2021	25/02/2022	ST	congelada	1,5	100	34,9	1,79	8,25	AVALIAR
QR037.5	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	1173,2	1,81	1,7	AVALIAR
QR038.1	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	19,8	1,73	2,55	CRÍTICO

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QR038.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	366,1	1,87	2,36	ESTOQUE
QR038.3	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	889	1,83	2,29	ESTOQUE
QR038.4	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	100	2134	1,79	1,47	AVALIAR
QR038.5	28/11/2021	07/03/2022	ST	congelada	1	100	563,8	1,8	1,82	ESTOQUE
QR039.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	581,8	1,86	2,33	ESTOQUE
QR039.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	718,6	1,86	2,24	ESTOQUE
QR039.3	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	215,4	1,84	2,39	ESTOQUE
QR039.4	28/11/2021	25/02/2022	ST	congelada	2	100	141,9	1,77	2,4	ESTOQUE
QR039.5	28/11/2021	12/04/2022	ST	recongelada	3	200	799,5	1,87	2,25	ESTOQUE
QR040.1	28/11/2021	24/02/2022	ST	congelada	NA	NA	35,5	1,84	3,47	AVALIAR
QR040.2	28/11/2021	13/04/2022	ST	recongelada	4	300	21,7	1,77	1,59	AVALIAR
QR040.3	28/11/2021	07/03/2022	ST	congelada	1	100	6	1,27	2,1	CRÍTICO
QR041.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	586,9	1,87	2,26	ESTOQUE
QR041.2	28/11/2021	13/04/2022	ST	recongelada	3,5	400	346,3	1,82	1,99	ESTOQUE
QR042.1	28/11/2021	13/04/2022	ST	recongelada	1,5	100	465,2	1,58	0,69	AVALIAR
QR042.2	28/11/2021	07/03/2022	ST	congelada	1	50	17,5	1,55	1,87	CRÍTICO
QR043.1	28/11/2021	13/04/2022	ST	recongelada	3	200	486	1,8	1,72	AVALIAR
QR043.2	28/11/2021	25/02/2022	ST	congelada	2	200	536,5	1,82	2	ESTOQUE
QR044.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	185,6	1,86	2,34	ESTOQUE
QR044.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	368,2	1,87	2,32	ESTOQUE
QR044.3	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	115,6	1,81	2,3	ESTOQUE
QR045.1	28/11/2021	25/02/2022	ST	congelada	2	100	8,6	1,41	-1,29	CRÍTICO
QR045.2	28/11/2021	13/04/2022	ST	recongelada	3	100	1439,4	1,87	1,94	ESTOQUE
QR046.1	28/11/2021	25/02/2022	ST	congelada	2	50	22	1,65	5,63	AVALIAR
QR046.1	28/11/2021	13/04/2022	ST	recongelada	3	150	480,8	1,84	2,15	ESTOQUE
QR047	28/11/2021	13/04/2022	ST	recongelada	4	200	711,1	1,85	2,32	ESTOQUE
QR048	28/11/2021	13/04/2022	ST	recongelada	2	400	401,4	1,82	1,9	ESTOQUE
QR049.1	28/11/2021	07/03/2022	ST	congelada	1	100	144,3	1,8	1,72	AVALIAR
QR049.2	28/11/2021	13/04/2022	ST	recongelada	3	300	691,6	1,83	2,05	ESTOQUE

Amostra	Coleta	Extração	Protocolo	Condição	Volume inicial (mL)	Volume final (µL)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	260/230 nm	Classe
QR050.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	358,5	1,87	2,34	ESTOQUE
QR050.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	613,3	1,86	2,19	ESTOQUE
QR050.3	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	276,9	1,87	2,33	ESTOQUE
QR050.4	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	137,2	1,86	2,27	ESTOQUE
QR050.5	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,300	100	151,1	1,83	2,43	ESTOQUE
QR051.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	612,8	1,87	2,36	ESTOQUE
QR051.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,400	100	446,5	1,86	2,12	ESTOQUE
QR051.3	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	517,2	1,84	2,33	ESTOQUE
QR052.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	272,1	1,87	2,33	ESTOQUE
QR052.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,450	100	39,4	1,85	1,73	ESTOQUE
QR052.3	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,250	100	114,6	1,82	2,35	ESTOQUE
QR053.1	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,350	100	286,9	1,87	2,3	ESTOQUE
QR053.2	20/11/2022	21/11/2022	Buffy	congelada	0,200	100	239,6	1,85	2,31	ESTOQUE
QR053.3	20/11/2022	24/11/2022	Buffy	congelada	0,500	100	95,2	1,81	2,39	ESTOQUE

FONTE: A autora (2023).

NOTA: ST = sangue total; Buffy = *buffy coat* (camada leucocitária); NA = valor ausente.