

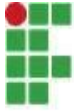
INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO PALOTE DA SILVA MARTINS

**CONTRIBUIÇÕES DA MATEMÁTICA PARA O ESTUDO DE
BIOTECNOLOGIA**

LONDRINA

2018



INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

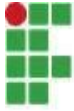
GUSTAVO PALOTE DA SILVA MARTINS

**CONTRIBUIÇÕES DA MATEMÁTICA PARA O ESTUDO DE
BIOTECNOLOGIA**

Trabalho de Conclusão de Curso,
modalidade Revisão Bibliográfica,
apresentado ao curso Técnico em
Biotecnologia Integrado ao Ensino
Médio do Instituto Federal do
Paraná.

LONDRINA

2018



FOLHA DE APROVAÇÃO

GUSTAVO PALOTE DA SILVA MARTINS

CONTRIBUIÇÕES DA MATEMÁTICA PARA O ESTUDO DE BIOTECNOLOGIA

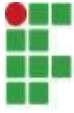
Trabalho de Conclusão de Curso, modalidade Revisão Bibliográfica, apresentado ao Curso Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio do Instituto Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Técnico em Biotecnologia.

Profa. Dra. Kátia Socorro Bertolazi
Orientadora

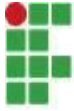
Profa. Dra. Fernanda de Oliveira Martins

Profa. Dra. Angela Meneghello Passos

Londrina, 23 de novembro de 2018.



Ministério da Educação



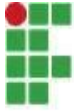
AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Dulcinéia da Silva Martins e Vicente Palote Martins, obrigado pelo amor incondicional e pelo exemplo de vida. Também sou grato a minha querida irmã Larissa da Silva Martins Amorim e meu cunhado Luis Henrique Cardoso Amorim, que me ensinaram valores importantes e contribuíram com a minha educação.

Não posso deixar de agradecer a técnica de laboratório Daniele Albuquerque, e a professora Fernanda de Oliveira Martins que estiveram ao meu lado durante todos os meses de elaboração deste trabalho.

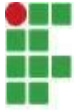
Sou imensamente grato à minha orientadora Kátia Socorro Bertolazi, que além de me orientar me impressiona a cada dia com o seu amor pela docência, transformando a minha vida e a de todos que já tiveram a oportunidade de serem seus alunos.

Obrigado!



Na medida em que as leis matemáticas se referem à realidade, elas não são exatas e na medida em que são exatas, elas não se referem à realidade.

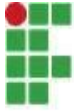
Albert Einstein



RESUMO

O presente trabalho explora relações entre Matemática e Biotecnologia. A investigação de formas de se fazer a articulação interdisciplinar entre Biotecnologia e Matemática torna-se relevante para auxiliar no estudo e desenvolvimento dessas áreas. O objetivo geral deste trabalho visa compreender formas de contribuição Matemática para o estudo de Biotecnologia. Este estudo baseou-se em um levantamento bibliográfico, e foi realizada a busca dessas informações em artigos, livros e outros materiais acadêmicos, tanto nacionais quanto internacionais. Um exemplo de relação interdisciplinar entre conhecimentos biotecnológicos e matemáticos se refere ao modelo algébrico para calcular a quantidade de moléculas de uma amplificação por PCR, o qual assume que as células dobrariam de quantidade por ciclo com 100% de eficiência. Porém, na prática isso não acontece, e para uma representação que expresse a melhor realidade, é necessário considerar a eficiência para calcular a quantidade final de células. A técnica de DNA recombinante, que se baseia na utilização de materiais genéticos de diferentes origens biológicas para se obter características de interesse, também demonstra a necessidade do uso da Matemática no contexto da Biotecnologia para que se obtenha as características devidas de condicionamento da técnica com o objetivo de otimizar o processo.

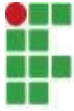
Palavras-chave: Biotecnologia. Matemática. Fenômenos biológicos. PCR. DNA recombinante.



ABSTRACT

The present work explores relationships between Mathematics and Biotechnology. The investigation of ways of making the interdisciplinary articulation between Biotechnology and Mathematics becomes relevant to assist in the study and development of these areas. The main purpose of this work is to understand the mathematical contributions for the study of Biotechnology. This study was based on a bibliographical survey, and the research was based in articles, books and other academic materials, both national and international. An example of an interdisciplinary relationship between biotechnology and mathematical knowledge refers to the algebraic model for calculating the amount of molecules after a PCR amplification, which assumes that the cells would double its quantity per cycle with 100% efficiency. However, in practice this does not happen, and for a representation that expresses the best reality, it is necessary to consider the efficiency to calculate the final quantity of cells. The recombinant DNA technique, which is based on the use of genetic materials of different biological origins to obtain characteristics of interest, also demonstrates the necessity of the use of Mathematics in the context of Biotechnology in order to obtain the necessary characteristics of conditioning of the technique with the aim to optimize the process.

Key-words: *Biotechnology. Mathematics. Biological processes. PCR. Recombinant DNA.*



LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação do crescimento celular de microrganismos dada pelo logaritmo do número de células em função do tempo.

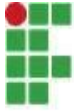
FIGURA 2 – Comparação entre as curvas de mutação espontânea e induzida dadas pela frequência de observação em função da quantidade de células observadas.

FIGURA 3 – Comparação entre mutações induzidas e espontâneas pelo teste de flutuação.

FIGURA 4 – Esquema das etapas de um ciclo da técnica de PCR.

FIGURA 5 – Esquema da técnica de hibridização para sondar um gene específico pelo uso de cDNA.

FIGURA 6 – Quadro com o código genético que apresenta os códons com seus respectivos aminoácidos.



LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

E. coli - *Escherichia coli*

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

nts - Nucleotídeo

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

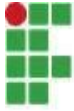
PL - Projeto de Lei

RNA - Ácido ribonucleico

Taq - *Thermus aquaticus*

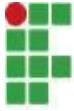
T_m - Temperatura de *melting*

UV - Ultravioleta



SUMÁRIO

2 DESENVOLVIMENTO	13
2.1 BIOTECNOLOGIA E MATEMÁTICA	13
2.2 NOTAÇÃO CIENTÍFICA	15
2.3 CRESCIMENTO CELULAR	16
2.3.1 Fases do crescimento	16
2.3.2 Distribuição de Poisson	19
2.3.3 Experiência de Luria-Delbruck	22
2.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	24
2.4.1 A técnica	24
2.4.2 Cálculo da eficiência de amplificação	27
2.4.3 Temperatura de melting	28
2.4.4 Eficiência da DNA polimerase	29
2.5 DNA RECOMBINANTE	30
2.5.1 A técnica	30
2.5.2 Quantidade de clones	31
2.5.3 Hibridização molecular	32
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS	38

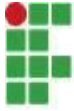


1 INTRODUÇÃO

Mata-Alvarez e Mitchell (2009), afirmam que os modelos matemáticos são ferramentas que podem contribuir com o desenvolvimento da Biotecnologia, assim como processos biológicos também auxiliam o desenvolvimento de novas técnicas matemáticas.

Os profissionais habilitados para fazer a ponte entre as áreas de Matemática e Biotecnologia são muito raros, pois, durante os cursos de formação inicial, faltam disciplinas que fazem a interação entre esses conhecimentos. Assim, emerge a dificuldade de que muitos professores se sentem inseguros de inserir atividades interdisciplinares em sala de aula. Porém, para que haja aprendizagem significativa, é relevante que se façam contextualizações e interações interdisciplinares. Dessa forma, a interação de diferentes objetos cognitivos para compreender a complexidade da natureza de conhecimentos científicos torna-se uma possibilidade a ser utilizada em sala de aula, uma vez que promovem e estimulam o pensamento crítico e reflexivo (SAMPAIO; SILVA, 2012).

Desse modo, a investigação de formas de se fazer a articulação interdisciplinar entre Biotecnologia e Matemática torna-se relevante para auxiliar no estudo e desenvolvimento dessas áreas. E portanto, este trabalho tem como objetivo identificar relações interdisciplinares entre Biotecnologia e Matemática partindo da hipótese de que a Matemática e a Biotecnologia possuem uma ampla diversidade de relações, visando a aplicabilidade de instrumentos matemáticos para descrever e prever fenômenos.



2 DESENVOLVIMENTO

2.1 BIOTECNOLOGIA E MATEMÁTICA

A definição nítida de uma área do conhecimento é sempre uma tarefa difícil, visto que mudanças epistemológicas acontecem a todo momento e os limites dos campos de atuação de qualquer ramo do conhecimento variam. Porém, a compreensão de diversos olhares auxilia a elucidar o que se entende por determinada área do conhecimento. Dessa forma, para tentar compreender o que se entende por Biotecnologia, é relevante apresentar pelo menos algumas tentativas de definições.

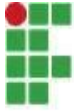
De acordo com o Art. 2º. do Projeto de Lei (PL) nº 3747/2015, responsável por regulamentar o exercício da profissão de Biotecnologia e criar Conselhos Federais e Regionais de Biotecnologia:

A Biotecnologia é o conjunto de tecnologias que utilizam sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para a produção ou modificação de produtos e processos para uso específico, bem como para gerar novos serviços de alto impacto em diversos segmentos industriais.

Aquarone *et al.* (2007) apresentam algumas formas de definir o que é Biotecnologia no intuito de posteriormente entender o que vem a ser a área de Biotecnologia Industrial. Dentre as diversas propostas contempla-se a do Prof. Antonio Paes de Carvalho em seu trabalho intitulado “Patentes para a Biotecnologia”, em que explica o seguinte:

Entende-se por Biotecnologia o conjunto de conhecimentos técnicos e métodos, de base científica ou prática, que permite a utilização de seres vivos como parte integrante e ativa do processo de produção industrial de bens e serviços (p. VI).

Além disso, Aquarone *et al.* (2007) apresenta outras definições igualmente relevantes, como a feita pelo *Office of Technology Assesment*, que define a



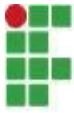
Biotecnologia como sendo “o conjunto de processos industriais que englobam processos biológicos” (p.VI), e a definição do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), entendendo Biotecnologia como “a utilização de sistemas celulares para a obtenção de produtos ou desenvolvimento de processos industriais” (p.VI). Porém, uma outra definição apresentada por Aquarone *et al.* (2007) possui uma peculiaridade por ser a partir da aplicação de outras áreas, é a da *Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée*, a qual conceitua Biotecnologia como:

Aplicação da Bioquímica, da Biologia, da Microbiologia e da Engenharia Química aos processos e produtos industriais (incluindo os produtos relativos a saúde, energia e agricultura) e ao meio ambiente (p. VI)

Por outro lado, com o objetivo de definir Matemática, Devlin (2002) propõe que “a Matemática, a ciência dos padrões, é uma forma de contemplar o mundo em que vivemos, tanto a nível físico, como biológico e sociológico, bem como o mundo oculto das nossas mentes e pensamentos”, e assim possibilitando uma visão mais diversificada das aplicações matemáticas.

A partir de problemas epistemológicos e do desenvolvimento da Biologia os modelos matemáticos se tornam necessários para construir hipóteses e entender determinados fenômenos biológicos (SAMPAIO; SILVA, 2012). Conforme pesquisas de Mata-Alvarez e Mitchell (2009), os modelos matemáticos são instrumentos que podem ser usados para descrever os acontecimentos passados e prever o estado futuro de processos biotecnológicos. Tais modelos podem ser aplicados em processos que operam em muitos níveis diferentes, desde a ação enzimática de uma célula ao crescimento dessa célula dentro de um biorreator à escala comercial.

A Matemática contribui com o desenvolvimento de áreas diversas relacionadas a Biotecnologia, como Biologia, Bioquímica, Pecuária e Farmácia (SAMPAIO; SILVA, 2012). Além disso, é relevante destacar que vários processos biológicos também inspiraram novos métodos, teorias e técnicas matemáticas a exemplos de algoritmos matemáticos desenvolvidos a partir de relações genéticas de seleção, mutação e recombinação, assim como de modelos matemáticos de redes neurais que posteriormente poderão ser utilizados para imitar o funcionamento



das redes de neurônios humanas. E, assim, essa articulação tem sido uma forma de desenvolvimento tanto para a área da Matemática quanto para a da Biotecnologia.

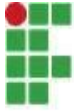
2.2 NOTAÇÃO CIENTÍFICA

Técnicos em Biotecnologia trabalham com números de diferentes magnitudes, e, para simplificar os cálculos envolvendo esses valores, existem métodos que fazem com que quantidades enormes e infinitesimais se tornem mais facilmente manipuláveis. Um desses métodos é a utilização da notação científica e dos prefixos métricos, que fazem, por definição, uso de expoentes (STEPHENSON, 2010).

Existem cerca de 3000000000 pares de bases (pb) que compõem o DNA genômico humano dentro de uma célula haplóide. Se esse DNA for isolado pesará aproximadamente 0,000000000003 5 gramas (g). Para amplificar um segmento específico desse DNA purificado usando a reação em cadeia da polimerase (PCR), 0,00000000001 mol (M) de primers pode ser adicionado a uma reação que pode produzir, após cerca de 30 ciclos da PCR, mais de 1000000000 cópias do gene alvo (STEPHENSON, p.1, 2010).

A notação científica é um método de escrever números de grande escala, tanto números demasiadamente grandes, como também os números com escalas infinitesimais. Se baseia em reduzir o número a um valor de referência “r”, maior ou igual a 1 e menor que 10, multiplicado por uma potência de 10 que regula a equivalência, tendo sua forma geral como sendo $r \times 10^x$, onde “x” pode assumir qualquer valor inteiro. Exemplos possíveis seriam escrever o número 0,0000015 em notação científica, que é representado como $1,5 \times 10^{-6}$, ou o número 5760000000, que é escrito como $5,76 \times 10^9$ (HALLIDAY *et al.*, 2009).

A utilização de prefixos métricos é uma outra forma de escrever números muitos grandes ou muito pequenos de uma certa unidade, se baseiam na utilização de prefixos que denotam uma certa potência de 10 para facilitar a comparação de diferentes magnitudes de uma mesma unidade, dentre as mais comuns pode-se



observar o uso do prefixo mili- em mililitros, ou o prefixo quilo- em quilogramas. Porém, na Biotecnologia ou qualquer outra área relacionada, o uso de outros prefixos se torna mais frequentes, os mais comuns são apresentados no Quadro 1 a seguir junto com suas potências equivalentes e símbolos utilizados (HALLIDAY *et al.*, 2009).

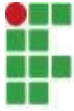
Prefixo	Símbolo	Potência equivalente
giga-	G	10^9
mega-	M	10^6
quilo-	k	10^3
hecto-	h	10^2
deca-	da	10^1
deci-	d	10^{-1}
centi-	c	10^{-2}
mili-	m	10^{-3}
micro-	μ	10^{-6}
nano-	n	10^{-9}
pico-	p	10^{-12}

Quadro 1 - Notação científica: Prefixos, símbolos e potências equivalente.
Fonte: organização própria.

2.3 CRESCIMENTO CELULAR

2.3.1 Fases do crescimento

O crescimento celular de bactérias ou outros organismos unicelulares se refere à divisão celular e o crescimento do número de células ao invés do tamanho de uma célula individual. A divisão celular é influenciada por vários fatores, incluindo



o nível de nutrientes disponíveis, a temperatura na qual as células são incubadas, o grau de aeração e até mesmo pelo genótipo do microrganismo. Compreender o desenvolvimento do crescimento celular é relevante para várias aplicações em Biotecnologia (LEVINSON, 2016).

Para obter as células mais eficientes e reprodutíveis de *Escherichia coli*, por exemplo, é importante que sejam colhidas e preparadas em um ponto particular de seu crescimento e em uma determinada concentração celular. Um dos fatores importantes para justificar o estudo do crescimento celular é o rendimento e a otimização do processo que podem ser alcançados sabendo como e quanto atuar durante o crescimento celular (LEVINSON, 2016).

O ciclo de crescimento celular se baseia principalmente na forma de reprodução bacteriana por fissão binária, que consiste num crescimento exponencial que dobra a quantidade de bactérias a cada geração, onde, num sistema perfeito, uma bactéria após 4 gerações originaria uma colônia de 16 bactérias. Esse ciclo de crescimento apresenta quatro fases principais. Quando as células de uma cultura são inoculadas, essas entram em um período (a) de adaptação onde poucas divisões ocorrem, enquanto observa-se imensa atividade metabólica. Contudo esse período é chamado "*lag phase*" (fase do atraso), e pode durar de minutos a horas, dependendo das condições do microrganismo e da riqueza do meio. Depois desse período as células entram em uma fase de rápida divisão celular, e cada célula da população dá origem a duas células por fissão binária. Por conta da duplicação contínua no número de células, esse período (b) de crescimento é chamado de fase exponencial ou "*log phase*" (partindo da ideia logarítmica), pois segue essa ideia do crescimento exponencial de células. Quando o suprimento de nutrientes começa a diminuir e os produtos tóxicos se acumulam, a cultura entra na fase estacionária (c), pois a morte celular e o crescimento celular ocorrem em taxas equivalentes, e assim o número de células viáveis permanece constante. No ponto em que ocorre o esgotamento adicional de nutrientes há aumento da morte celular, que leva a última fase de desenvolvimento da cultura que é a morte (d) (LEVINSON, 2016).

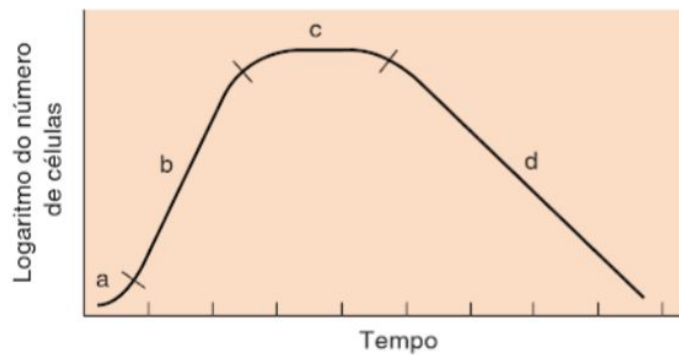
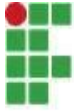
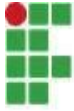


Figura 1 – Representação do crescimento celular de microrganismos dada pelo logaritmo do número de células em função do tempo.
Fonte: LEVINSON, 2016.

O cálculo do tempo necessário para que dobre a quantidade de células em certa cultura revela o intervalo entre gerações. O tempo geração (**g**) pode ser calculado como a razão entre um certo intervalo de tempo (**t**) e o número de gerações (**n**). Uma forma de encontrar o número de gerações envolve a ideia da fissão binária, processo fundamental no crescimento celular de bactérias, pois a cada geração o número de células dobra. Assim é possível estabelecer a relação $X_0 \times 2^n = X$, onde X representa a quantidade de células em um determinado tempo, X_0 representa a quantidade inicial e n representa a quantidade de gerações. Para isolar o n podemos utilizar algumas ferramentas logarítmicas como as seguintes:

$$\begin{aligned}X_0 \times 2^n &= X \\ \log(X_0 \times 2^n) &= \log(X) \\ \log(X_0) + \log(2^n) &= \log(X) \\ \log(X_0) + n \times \log(2) &= \log(X) \\ n \times \log(2) &= \log(X) - \log(X_0) \\ n &= \frac{\log(X) - \log(X_0)}{\log(2)}\end{aligned}$$

Stephenson (2010) demonstra que quando se utiliza o logaritmo da quantidade de células como parâmetro das ordenadas para construção da curva de



crescimento celular obtém-se uma melhor representação de suas fases, e assim a simplificação dos logaritmos encontrados não se demonstra relevante, pois na maioria das curvas a informação do logaritmo da quantidade de células será mais frequente, e então as informações de $\log(X)$ e $\log(X_0)$ serão obtidas diretamente do valor das ordenadas da curva.

Maier (2009) apresenta uma modelagem matemática para descrever o crescimento celular durante a fase exponencial que pode ser compreendida pela equação $\ln(X) = \ln(X_0) + Ct$, em que C é uma constante que exprime o valor da inclinação entre dois pontos da curva durante a fase exponencial e \ln representa o logaritmo neperiano, ou logaritmo natural, que é uma notação especial para o logaritmo de base e , onde e é um número irracional de valor aproximado a 2,718281828..., conhecido como número de Euler.

Utilizando a modelagem de Maier (2009) pode-se chegar em uma expressão para calcular o tempo de geração de uma curva, basta utilizar a ideia de que o tempo de geração é o tempo necessário para que dobre a quantidade de células, e assim a expressão pode ser equivalente a seguinte equação:

$$\ln(X) = \ln(X_0) + Ct$$

$$\ln(X) - \ln(X_0) = Ct$$

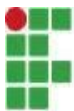
$$\ln(X/X_0) = Ct$$

$$\ln(2) = Ct$$

$$\frac{\ln(2)}{C} = t$$

2.3.2 Distribuição de Poisson

A distribuição de Poisson é usada para descrever a distribuição de eventos raros em uma grande população, como a probabilidade de que uma determinada célula adquirir uma mutação. Se a grande população de células é dividida em culturas menores, a distribuição de Poisson pode ser usada para determinar a probabilidade de qualquer cultura pequena conter uma célula mutada. Calcular uma



probabilidade, utilizando-se da distribuição de Poisson, necessita do uso do número de Euler (**e**), e também da compreensão de fatorial, que é representado pelo símbolo “!”. O fatorial é o produto de um inteiro positivo pelos inteiros antecedentes a ele até chegar ao número 1, conforme o exemplo: $4! = 4 \times 3 \times 2 \times 1 = 24$. A probabilidade de k eventos ocorrerem em uma distribuição de Poisson com um parâmetro h pode ser descrita pela seguinte equação (HOFFMAN, 2015):

$$P(X = k) = \frac{e^{-h} h^k}{k!}$$

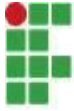
Para exemplificar, os dados apresentados por Bortkiewicz (citado por HOFFMAN, 2015) sobre as chances de um cavaleiro Prussiano ser morto por chutes de mula, que foram obtidos de 14 corporações durante um período de 20 anos, totalizaram 200 coletas que foram relevantes, pois foi a primeira utilização da função de distribuição de Poisson na prática. Os dados foram organizados em um quadro apresentando as frequências de uma quantidade específica de mortes por corporação a cada ano:

Mortes por corporação por ano (k)	Frequência (f)	valor de fk
0	109	0
1	65	65
2	22	44
3	3	9
4	1	4
5	0	0
SOMA	200	122

Quadro 2 - Dados coletados para cálculo de distribuição de Poisson

Fonte: HOFFMAN, 2015

Existem variações, como o exemplo no qual nenhuma corporação teve 5



mortos, mas uma corporação em um determinado ano teve 4 mortes, outra observação relevante é a de que 109 vezes alguma corporação não teve mortes. Houveram, no total, 122 mortes dentro das 200 observações, resultando em uma média de 0,61 mortes por corporação no ano. O parâmetro h na distribuição de Poisson é definido como a média dos valores, portanto é possível utilizar o valor encontrado para calcular as seguintes probabilidades (HOFFMAN, 2015):

$$P(X = 0) = \frac{e^{-0.61}0,61^0}{0!} = 0,543351$$

$$P(X = 1) = \frac{e^{-0.61}0,61^1}{1!} = 0,331444$$

$$P(X = 2) = \frac{e^{-0.61}0,61^2}{2!} = 0,101090$$

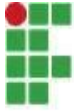
$$P(X = 3) = \frac{e^{-0.61}0,61^3}{3!} = 0,020555$$

$$P(X = 4) = \frac{e^{-0.61}0,61^4}{4!} = 0,003135$$

$$P(X = 5) = \frac{e^{-0.61}0,61^5}{5!} = 0,000382$$

Colocando em um quadro pode-se observar a proximidade dos dados coletados com os obtidos pela aplicação do modelo matemático da distribuição de Poisson:

Mortes por corporação por ano (k)	Frequência (f)	P(X=k)	Frequência esperada (200P)
0	109	0,543351	108.67
1	65	0,331444	66.29
2	22	0,101090	20.22
3	3	0,020555	4.11
4	1	0,003135	0.63
5	0	0,000382	0.08
SOMA	200	0,999957	200.01



Quadro 3 - Cálculos baseados na distribuição de Poisson

Fonte: HOFFMAN, 2015

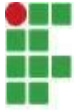
A soma das 5 probabilidades encontradas resulta em 0,999957, pois o restante, para que totalize 1, se encontra na soma dos valores de probabilidade de se obter mais de 5 mortes, porém são valores extremamente pequenos. Para encontrar a frequência esperada pelo modelo de Poisson basta multiplicar a probabilidade encontrada pelo valor total de ocorrências, que é de 200. Ao comparar as frequências esperadas com as frequências observadas pode-se concluir que os valores são realmente bem próximos e então demonstram estarem de acordo com a distribuição de Poisson.

2.3.3 Experiência de Luria-Delbruck

No começo do século 20, enquanto muitas mutações começaram a ser identificadas, cientistas começaram a se questionar sobre a natureza dessas variações genéticas. Duas possibilidades eram discutidas, a de mutações induzidas pelo ambiente e a ideia de mutações espontâneas. Luria e Delbruck (1943) foram os pioneiros a aplicar o modelo de Poisson para diferenciar as hipóteses de mutações adquiridas, como a resistência de uma bactéria pela exposição a um vírus bacteriófago, das hipóteses de mutações espontâneas durante as replicações (FRY, 2016).

O método utilizado por eles para fazer a primeira estimativa quantitativa de taxas de mutações se chamava “teste de flutuação”, e se baseava em montar diversas placas com bactérias *Escherichia coli* em suas fases *log* de crescimento junto com vírus bacteriófagos do tipo T1. Esses vírus interagem com receptores das *E. coli* para entrarem e posteriormente matarem a bactéria, porém colônias resistentes podem surgir de mutações que alteram o receptor que interagem com os vírus T1, fazendo com que não sejam infectadas e permaneçam vivas (FRY, 2016).

Após a introdução dos vírus T1, é feita a quantificação de células resistentes em cada placa para construir um gráfico e conseguir comparar. Luria e Delbruck



(1943) conseguiram perceber que as duas teorias de origem de mutações originam dois padrões estatísticos distintos.

Mutações espontâneas que ocorreram durante alguma fase do crescimento celular antes da exposição ao vírus fazem com que exista variações do número de bactérias resistentes por colônia, dependendo do ponto do crescimento em que ocorreu a mutação. Dessa forma, se obtém maior quantidade de bactérias resistentes em colônias nas quais a mutação aconteceu em gerações mais anteriores. Dessa maneira, mesmo que tenha igual probabilidade de uma mutação ocorrer por divisão celular, o número de bactérias resistentes por cultura depende de quando a mutação ocorre durante o crescimento, se é entre as primeiras ou entre as últimas gerações, como mostrado na Figura 3 (FRY, 2016).

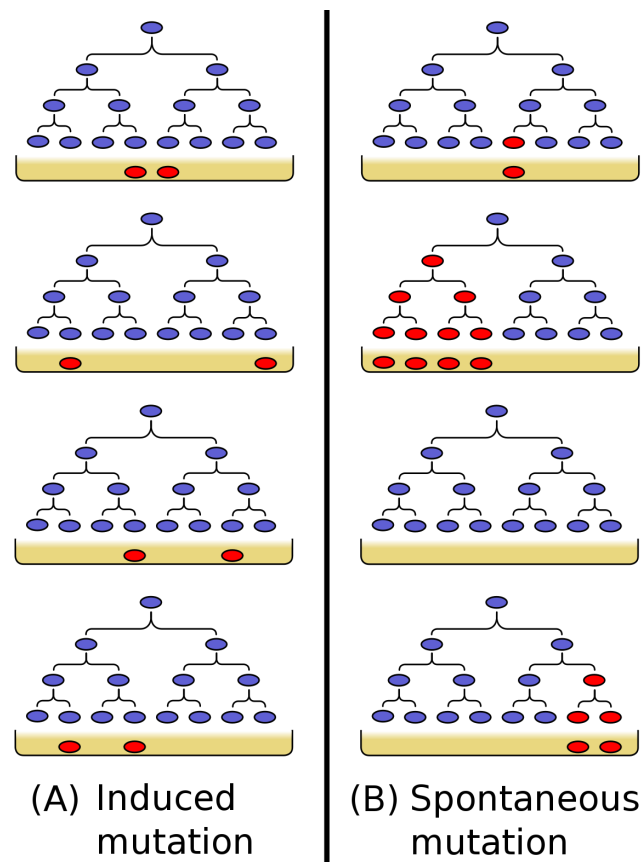
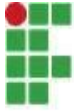


Figura 3 – Comparação entre mutações induzidas e espontâneas pelo teste de flutuação.
Fonte: FRY, 2016

Por outro lado, mutações induzidas pela exposição aos vírus tendem a ter placas com uma menor variação nos números de *E. coli*, pois como a probabilidade



de desenvolver resistências é a mesma por células e elas só começam a partir do momento da exposição, então se a probabilidade da exposição ao vírus T1 causar uma mutação for 10^{-8} , então aproximadamente 10 bactérias resistentes surgiriam de cada placa contendo 10^9 bactérias. Luria e Delbruck (1943) utilizaram dessa ideia para concluir que se a resistência surgiu a partir da exposição das células de *E. coli* aos vírus bacteriófagos do tipo T1, então os números de células resistentes seguiriam a distribuição de Poisson.

Portanto, quando comparado o número de células resistentes com a frequência de incidência, esperava-se uma relação exponencial para mutações espontâneas, enquanto para mutações induzidas pela inserção de vírus bacteriófagos do tipo T1 era esperado uma distribuição de Poisson, como na Figura 2:

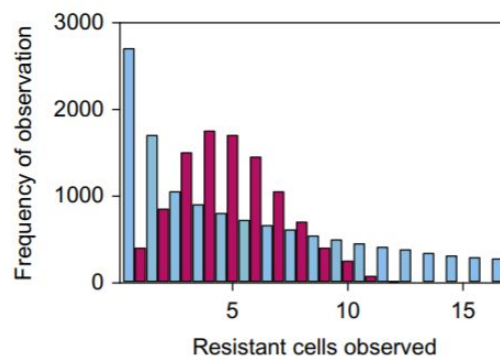
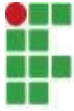


Figura 2 – Comparação entre as curvas de mutação espontânea e induzida dadas pela frequência de observação em função da quantidade de células observadas.
Fonte: FRY, 2016

2.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

2.4.1 A técnica

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método para a amplificação de um segmento específico de ácido nucléico. Para que ocorra a PCR, é necessário que seja feita uma solução com um molde de DNA, uma DNA polimerase termicamente estável, os quatro trifosfatos de desoxirribonucleosídeo (dNTP), primers, uma solução tampão, íons magnésio e outros sais necessários para a



reação. Três etapas estão envolvidas no processo de amplificação, a primeira é a etapa de desnaturação, o molde de ácido nucléico é exposto a uma temperatura entre 90°C e 100°C por um minuto ou dois para que rompa com as interações de hidrogênio e produza moldes de fita única.

A DNA polimerase de *E. coli* que era utilizada desnaturava a 90°C, e, portanto, não era eficiente e atrasava o processo, já que era preciso adicionar enzimas novas a cada ciclo. Posteriormente foi isolado uma DNA polimerase muito estável a altas temperaturas na bactéria *Thermus aquaticus*, bactéria que vive em água termais no Parque Nacional de Yellowstone, e essa enzima, chamada *Taq polimerase*, se tornou uma alternativa mais eficiente, pois quando adicionada a mistura reacional permite que continue funcionando sem necessidade de intervenção por vários ciclos. A segunda etapa inicia no rápido resfriamento a uma temperatura entre 30°C e 65°C, mantendo-se nessa temperatura por um minuto ou menos, para que os dois primers sejam capazes de se ligar as fitas molde. Na etapa final, chamada extensão, uma DNA polimerase termicamente estável adiciona os dNTPs, para então sintetizar novas fitas de DNA, de forma que de cada DNA molde originam-se duas novas moléculas de DNA. Estes passos formam um ciclo e são repetidos, dependendo da aplicação específica, de 25 a 40 vezes. Essa é uma técnica muito utilizada, e se encontra em uma ampla gama de aplicações, como para examinar evidências biológicas em casos forenses, identificar microrganismos contaminantes em alimentos, diagnosticar doenças genéticas e mapear genes para segmentos cromossômicos específicos (PIERCE, 2016).

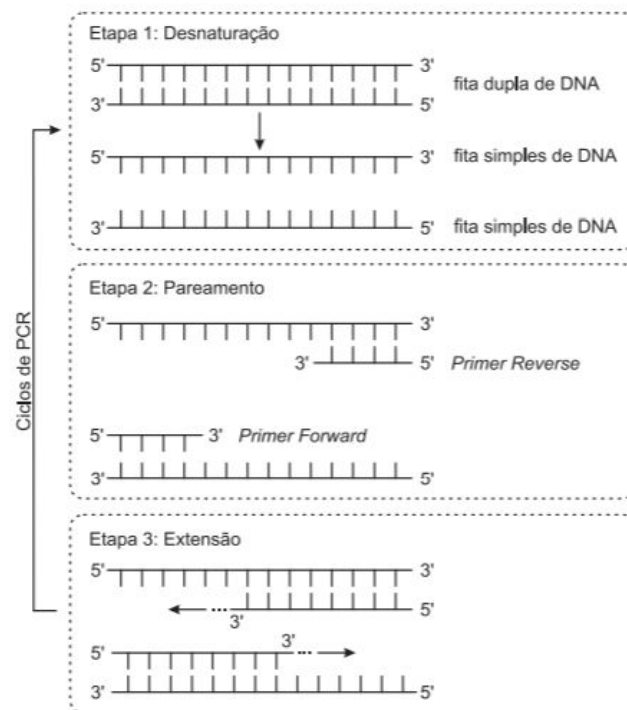
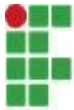
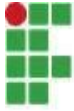


Figura 4 – Esquema das etapas de um ciclo da técnica de PCR.
Fonte: ARRUDA JUNIOR, 2010, p.10

Uma das vantagens da técnica de PCR é a necessidade de pouca quantidade de DNA molde para a amplificação, como por exemplo em aplicações forenses, onde apenas um fio de cabelo ou resíduos em saliva podem ser utilizados como substratos para se obter o DNA molde necessário, desde que contenham pelo menos vestígios de células. PCRs em materiais forenses utilizam normalmente de 0,5 a 10 ng de material genético, mas a razão pela qual essa quantidade é tão pequena é explicada pela aspecto da técnica que a caracteriza como “em cadeia”, pois durante o processo da PCR o produto de um ciclo serve de molde para o próximo ciclo, obtendo um crescimento exponencial, e assim é possível que uma única molécula origine milhões (ARRUDA JUNIOR, 2010).

A amplificação forma uma progressão geométrica de razão 2, pois a cada ciclo a quantidade de moléculas dobra, e então se começa com uma quantidade Q de moléculas se espera possuir $Q \times 2^n$ moléculas após n ciclos. Por exemplo, se uma mistura conter inicialmente 600 moléculas e forem feitos 25 ciclos, espera-se obter 600×2^{25} moléculas no final da reação.



2.4.2 Cálculo da eficiência de amplificação

O modelo que apresenta $Q \times 2^n$ como a fórmula para calcular a quantidade de moléculas de uma amplificação por PCR assume que as células dobrariam de quantidade por ciclo com 100% de eficiência, porém na realidade isso não acontece, e para uma representação que representa melhor a realidade, é necessário considerar a eficiência para calcular a quantidade final de células, e para isso se utiliza o seguinte modelo:

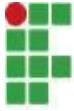
$$Y = Q(1 + E)^n$$

Em que Y representa a quantidade final de moléculas, E indica a eficiência, porcentagem de produto de um ciclo que servirá de molde para o próximo, e n o número de ciclos realizados. As razões para que ocorra a perda de eficiência são diversas, podendo incluir perda de atividade das enzimas, perda de reagente ou até desnaturação incompleta da fita molde (STEPHENSON, 2010).

Dessa forma, se forem pegadas amostras entre ciclos e estimado uma eficiência de 50%, com uma quantidade inicial de 600 moléculas pode-se estimar uma quantidade de aproximadamente $Y = 600(1,5)^5 \approx 4556$ moléculas após 5 ciclos da técnica de PCR.

Para fins de manipulação do modelo, calcular n pode demandar conhecimentos da ferramenta matemática denominada logaritmo. Iezzi (2013) apresenta a seguinte definição de logaritmo “sendo a e b números reais e positivos, com $a \neq 1$, chama-se logaritmo de b na base a o expoente que se deve dar à base a de modo que a potência obtida seja igual a b ”. De outra forma, sabendo que a é denominado base do logaritmo, b é o logaritmando, e x denominado logaritmo, pode-se entender o seguinte:

$$\log_a b = x$$



$$a^x = b$$

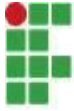
A equação então pode ser escrita em uma forma que pode facilitar cálculos mais diretos durante a aplicação da PCR. Basta aplicar a função logaritmo na equação $Y = Q(1 + E)^n$, sabendo que quando não explicitada a base do logaritmo se assume valor 10, e obter a fórmula $\log Y = \log Q + n \log(1 + E)$. Esse modelo se torna mais eficiente em situações onde se busca a quantidade de ciclos necessários para uma determinada quantidade final de moléculas (STEPHENSON, 2010).

2.4.3 Temperatura de *melting*

A temperatura de *melting* (T_m), também chamada de temperatura de pareamento, é definida como a temperatura na qual metade das moléculas de DNA estão pareadas. É importante saber a temperatura de *melting* para que se assegure uma desnaturação adequada na primeira etapa da PCR, precisa-se saber a temperatura que proporciona a reação de amplificação mais eficiente (STEPHENSON, 2010).

Como a molécula de DNA é um ânion de múltiplas cargas negativas ao longo de seus fosfatos e possui duas fitas de cargas semelhantes, elas tendem a se repelir, e em solução aquosa livre de íons o DNA pode se desnaturar facilmente. Íons salinos como sódio (Na) e magnésio (Mg) podem complexar com as cargas negativas dos grupos fosfatos e minimizar a repulsão entre as duas fitas, podendo até, em condições de alta concentração salinas, fazer com que duas fitas de DNA se interajam mesmo contendo bases nitrogenadas sem correspondência, e por isso a maioria das aplicações da PCR utilizam algum tipo de sal, como cloretos de potássio e magnésio, que auxiliam também na atividade da enzima polimerase (STEPHENSON, 2010).

A temperatura de *melting* também pode ser afetada pela proporção de Guaninas e Citosinas na molécula de DNA, visto que possuem três interações de hidrogênio entre elas, diferente das interações entre Adenina e Timina, que possuem



duas, desse modo quanto maior a proporção de Guaninas e Citosinas, maior deverá ser a temperatura para desnaturar. O tamanho da molécula em pares de bases também é relevante, pois quanto mais longas, mais energia para desnaturá-las. Wetmur e Sninsky (1995) utilizaram dessas ideias para desenvolverem uma fórmula que expressa a temperatura de *melting*:

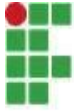
$$Tm = 81,5 + 16,6 \log \left[\frac{[SAL]}{1+0,7[SAL]} \right] + 0,41(\%G + C) - \frac{500}{L}$$

Em que se obtém a temperatura de *melting* em função do tamanho da molécula em pares de base (L), da porcentagem de Guaninas e Citosinas ao longo da molécula multiplicada por 100 (%G+C) e da concentração de sais dado por [SAL] = [K⁺] + 4[Mg²⁺]^{0,5}, podendo substituir K⁺ por outro sal monovalente como sódio (Na). É relevante ressaltar o fato de que para assegurar a desnaturação, a temperatura precisa estar entre 3°C e 4°C mais alta que a temperatura de *melting*.

2.4.4 Eficiência da DNA polimerase

A enzima DNA polimerase pode produzir erros na amplificação do DNA, ocasionados pela condição da enzima, da preparação prévia a PCR ou até mesmo da sequência. A enzima *Taq polimerase* normalmente causa erros em bases nitrogenadas isoladas, porém a técnica de PCR tem a característica de utilizar cada produto da amplificação para servir de molde para o próximo ciclo, fazendo com que mudanças iniciais cresçam em grande escala após vários ciclos, e assim acumulando posteriormente diversas moléculas com essas mudanças na sequência (HAYASHI, 1994).

Hayashi (1994) apresenta um modelo matemático para estimar a porcentagem de fragmentos com a sequência correta de bases após a aplicação da técnica de PCR. Assumindo uma distribuição aleatória de erros e que a eficiência de amplificação para fragmentos contendo alguma mutação se equivale a de fragmentos que não a contêm, então o modelo para calcular a porcentagem de



fragmentos com a sequência correta após a aplicação da PCR ($F(n)$) pode ser representado por:

$$F(n) = \frac{(1+k \times P)^n}{(1+k)^n}$$

Em que k representa a eficiência de replicação, n o número de ciclos de P a probabilidade de produzir zero erros em um ciclo da PCR, calculado por Hayashi (1994) utilizando o modelo de Poisson, que nessas condições equivale ao caso de $P(X=0)$:

$$P(X = k) = \frac{e^{-h} h^k}{k!}$$

$$P(X = 0) = \frac{e^{-h} h^0}{0!}$$

$$P(X = 0) = \frac{e^{-h} \times 1}{1}$$

$$P(X = 0) = e^{-h}$$

Desse modo pode-se reescrever a equação para $F(n)$ da seguinte forma:

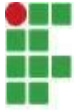
$$F(n) = \frac{(1+k \times e^{-h})^n}{(1+k)^n}$$

Em que h representa a taxa de erro da polimerase por nucleotídeo multiplicado pelo tamanho do fragmento em nts (quantidade de nucleotídeos).

2.5 DNA RECOMBINANTE

2.5.1 A técnica

A tecnologia de DNA recombinante se baseia na utilização de materiais genéticos de diferentes origens biológicas para obter características desejadas em



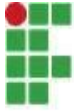
determinados seres vivos e seus produtos. Essa manipulação genética envolve a inserção de um ou vários genes e elementos regulatórios em uma recombinação de materiais genéticos. A primeira etapa envolve a clivagem enzimática feita por endonucleases de restrição, enzimas que reconhecem sequências nucleotídicas específicas e fragmentam o material genético, e posteriormente esses fragmentos podem ser multiplicados pela técnica de PCR, e a segunda etapa é a inserção do gene clivado em um outro material genético denominado vetor pela atividade da enzima DNA ligase, para poder ser inserido em uma célula hospedeira que pode se multiplicar e produzir diversas cópias do gene alvo (KHAN et al., 2016).

2.5.2 Quantidade de clones

O genoma haploide de um mamífero é formado por aproximadamente 3×10^9 pares de nucleotídeos, um dos desafios proporcionados por essa extensão é conseguir criar clones suficientes para se obter uma probabilidade adequada de encontrar o segmento de DNA contendo o gene de interesse, e com esse propósito é importante levar em conta o tamanho do genoma e o tamanho médio do gene desejado (STEPHENSON, 2010; KHAN, 2016). Para resolver esse problema, Clark e Carbon (1976) propõem uma expressão para se estimar a quantidade de clones necessários (N) para se obter uma determinada probabilidade (P) de isolar um gene (g) de um genoma (G):

$$1 - \left[1 - \left(\frac{g}{G}\right)\right]^N = P$$
$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln\left[1 - \left(\frac{g}{G}\right)\right]}$$

Stephenson (2010) apresenta um exemplo de uso para esse modelo, onde λ EMBL3 é usado como vetor para clonar um gene específico de 20000 pares de nucleotídeos originário do genoma humano, que possui 3×10^9 pares de bases, e com o intuito de se obter uma probabilidade de 99% de conseguir isolar esse gene é calculado a quantidade de clones que precisam ser examinados:



$$N = \frac{\ln(1-0,99)}{\ln[1-(\frac{2 \times 10^4}{3 \times 10^9})]}$$

$$N = \frac{\ln(0,01)}{\ln[1-6,7 \times 10^{-6}]}$$

$$N = 687337$$

Portanto, com 687337 clones se obtém uma probabilidade de 99% de se isolar o gene citado pelas endonucleases de restrição para inserir no vetor λ EMBL3 e posteriormente produzir múltiplas células com o DNA recombinante.

2.5.3 Hibridização molecular

O princípio da hibridação molecular é fundamental para caracterizar DNAs recombinantes quando o gene de interesse não é expresso. Colônias podem ser rastreadas para verificar a presença de clones que carregam o fragmento de material genético desejado pela utilização de uma sonda de cDNA marcada radioativamente por ^{32}P e originada de um mRNA pela transcriptase reversa. A técnica começa pela transferência de colônias que contêm o material genético recombinante com o gene alvo para uma membrana de náilon. Esse processo permite a transferência das colônias objetivando manter o padrão da placa de petri original nas placas de lise. As células são tratadas com alta temperatura ou radiação UV para expor e desnaturar o DNA das colônias ali presentes e então podem receber a sonda de cDNA marcada radioativamente, que fora projetada para ocorrer a hibridação especificamente com o gene de interesse. Posteriormente a membrana de náilon é enxaguada para retirar o cDNA que não anelou e a placa é submetida a um filme radiográfico para identificar quais células possuem o plasmídeo recombinante com o gene de interesse (SNUSTAD e SIMMSON, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2003).

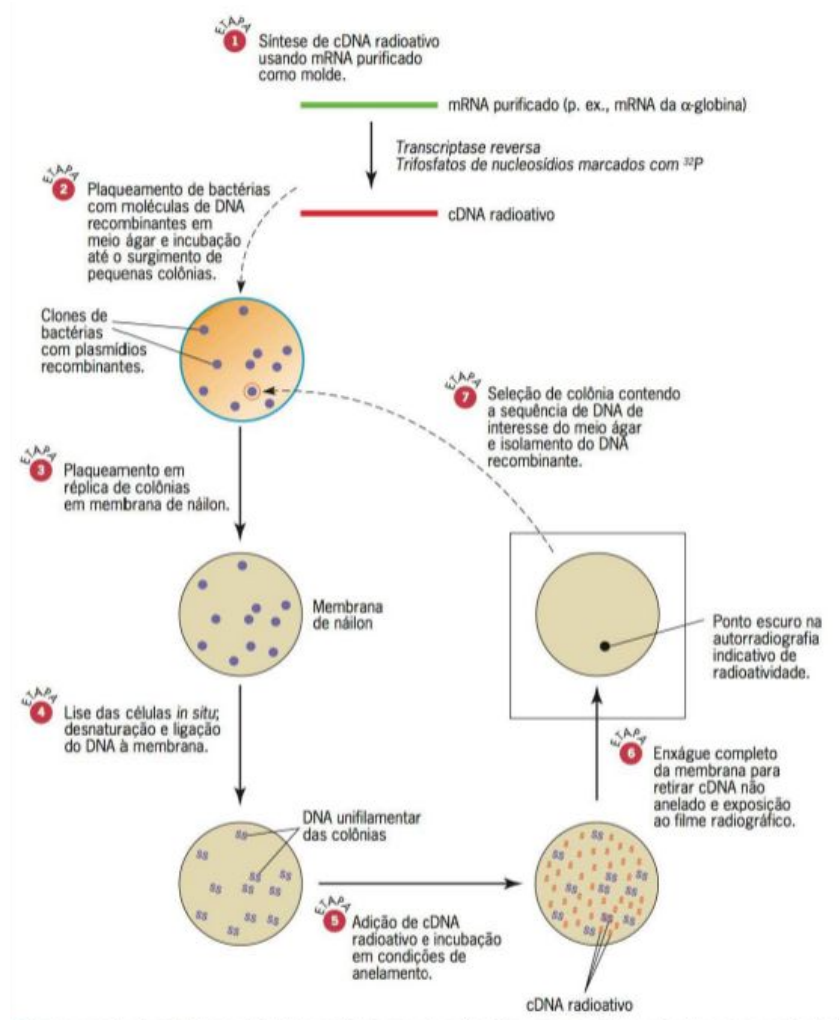
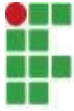
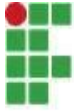


Figura 5 – Esquema da técnica de hibridização para sondar um gene específico pelo uso de cDNA.
Fonte: SNUSTAD e SIMMSON, 2013

A estabilidade da interação entre a sonda e o gene alvo pode ser influenciada pelo tamanho da sonda, pela proporção de Guaninas e Citosinas, pela temperatura, concentração de sal, etc. Levando essas características em consideração, Devis et al. citado por Stephenson (2010) utiliza da medição da temperatura de *melting* (T_m) da sonda, por conseguir considerar os efeitos dessas variáveis no cálculo da temperatura, para otimizar o processo, e recomendando que a temperatura de hibridização (T_h) seja de 10°C a 15°C menor que a temperatura de *melting* da sonda, torna-se possível estabelecer a seguinte equação:

$$T_h = T_m - (12,5 \pm 2,5)$$

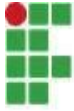


$$Th = \{81,5 + 16,6 \log \left[\frac{[SAL]}{1+0,7[SAL]} \right] + 0,41(\%G + C) - \frac{500}{L}\} - (12,5 \pm 2,5)$$

A determinação da temperatura de *melting* (T_m) auxilia no condicionamento da reação de hibridização, porém não basta apenas que se mantenha na temperatura adequada, mas também pelo tempo apropriado, e por isso Wallace e Miyada (1987) descrevem o tempo para que ocorra metade da reação de hibridização pelo modelo:

$$t_{1/2} = \frac{4 \times \ln 2}{kC}$$
$$k = \frac{3 \times 10^5 \times \sqrt{L}}{N}$$

Em que C representa a concentração molar da sonda de cDNA, L o comprimento em nts (nucleotídeos) e N é denominado complexidade da sonda. A complexidade de um oligonucleotídeo é o número de oligonucleotídeos diferentes em uma mistura (WALLACE e MIYADA, 1987). A complexidade nesse caso se torna relevante para oligonucleotídeos construídos a partir de uma tradução reversa da sequência de aminoácidos de uma proteína, pois a característica degenerada do código genético permite que várias sequências diferentes de nucleotídeos produzam a mesma sequência de aminoácidos (SNUSTAD e SIMMONS, 2013).

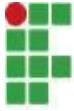


		Segunda letra				
		U	C	A	G	
Primeira letra (5')	U	UUU } Phe (F) UUC } UUA } Leu (L) UUG }	UCU } UCC } Ser (S) UCA } UCG }	UAU } Tyr (Y) UAC } UAA Parada (terminador) UAG Parada (terminador)	UGU } Cys (C) UGC } UGA Parada (terminador) UGG Trp (W)	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu (L) CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro (P) CCA } CCG }	CAU } His (H) CAC } CAA } Gln (Q) CAG }	CGU } CGC } Arg (R) CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile (I) AUA } AUG Met (M) (iniciador)	ACU } ACC } Thr (T) ACA } ACG }	AAU } Asn (N) AAC } AAA } Lys (K) AAG }	AGU } Ser (S) AGC } AGA } Arg (R) AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val (V) GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala (A) GCA } GCG }	GAU } Asp (D) GAC } GAA } Glu (E) GAG }	GGU } GGC } Gly (G) GGA } GGG }	U C A G
						Terceira letra (3')

Figura 6 – Quadro com o código genético que apresenta os códons com seus respectivos aminoácidos.

Fonte: SNUSTAD e SIMMSON, 2013

Para calcular o número de oligonucleotídeos diferentes, e conseqüentemente a complexidade, basta calcular as possibilidades pela multiplicação dos números de códons possíveis para cada aminoácido, como no exemplo da sequência MetArgProLysPheTrpIleCysAla, que possui $1 \times 6 \times 4 \times 2 \times 2 \times 1 \times 3 \times 2 \times 4 = 2304$ oligonucleotídeos diferentes para essa tradução (SNUSTAD e SIMMSON, 2013).



3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

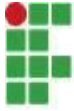
O presente trabalho teve como objetivo identificar maneiras pelas quais a Matemática pode contribuir para o estudo e desenvolvimento da área da Biotecnologia. Mediante as pesquisas fundamentadas em levantamentos bibliográficos foi possível encontrar relações diversas fundamentadas nas tentativas de descrever processos biológicos com a intenção de prever acontecimentos futuros e para aperfeiçoar técnicas já utilizadas no dia a dia de um Biotecnólogo.

Entre possíveis relações que podem ser estabelecidas entre Matemática e Biotecnologia pode-se destacar as modelagens utilizadas para descrever o crescimento celular de microorganismos, bem como a utilização de instrumentos como a distribuição de Poisson para identificação da natureza e taxas de mutações que podem ocorrer nesse processo.

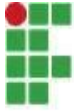
A técnica de PCR, tão comum em práticas laboratoriais com material genético, é um bom exemplo do como as proporções matemáticas estão presentes no cotidiano de um Biotecnólogo, pois além das taxas exponenciais identificadas nesse processo, as distribuições estatísticas, como a distribuição de Poisson, se tornam relevantes para a devida compreensão dos resultados e posterior análise.

Além de ferramentas para descrever e compreender fenômenos, a técnica de RNA recombinante, essencial para o desenvolvimento de técnicas de transgenia, em conjunto com a PCR, são processos que necessitam de modelos matemáticos que auxiliam diretamente a prática laboratorial, como os cálculos referentes às temperaturas de *melting* e desnaturação de enzimas e materiais genéticos, o condicionamento adequado nessas práticas envolve a otimização e garante a completude da técnica.

Para trabalhos futuros, sugere-se pesquisas envolvendo outros temas como a modelagem matemática aplicada a funcionamento neurológico ou a genética de

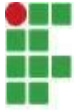


populações, porém é aconselhável também a busca de temas ainda não muito explorados como a aplicação de Matemática e Biotecnologia em áreas relacionadas a Ciências Humanas e Sociais, para expandir a rede de conexões interdisciplinares e desenvolver novos conhecimentos.



REFERÊNCIAS

- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia na produção de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Blücher, 2007. V.3, Série Biotecnologia Industrial. p.V-VI.
- ARRUDA JÚNIOR, R. G. **Temperatura de Melting: um estudo comparativo**. 2010. 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciência da Computação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010. Disponível em: <<https://bit.ly/2zH5Azi>>. Acesso em: 9 nov. 2018.
- CLARK, L.; CARBON J.. **A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plas- mids representative of the entire E. coli genome**. Cell 9, 1976. p.91-99. Disponível em: <<https://bit.ly/2qcBtLy>>. Acesso em: 28 set. 2018
- DEVLIN, K. **Matemática: a ciência dos padrões**. Porto: Porto Editora, 2002. 222p.
- ECKERT K. A.; Kunkel T. A. The fidelity of DNA polymerase and the polymerases used in the PCR. In: **Polymerase Chain Reaction I: A Practical Approach**. McPherson M. J., Quirke P., Taylor G. R., eds. Oxford: IRL Press, 1991. p. 17-24. Disponível em: <<https://bit.ly/2zL7rD2>>. Acesso em: 9 nov. 2018.
- FRY, M. Hershey and Chase Clinched the Role of DNA as the Genetic Material: Phage Studies Propelled the Birth of Molecular Biology. **Landmark Experiments In Molecular Biology**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.111-142, out. 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802074-6.00004-7>. Disponível em: <<https://bit.ly/2PIkw0M>>. Acesso em: 4 nov. 2018.
- HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de física**. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2009 vol 1
- HAYASHI, K. Manipulation of DNA by PCR. In: **The Polymerase Chain Reaction**. K. Mullis, F. Ferré, and R.A. Gibbs, eds. Birkhäuser, Boston, 1994. p. 3-13.
- HOFFMAN, Julien I. E. **Biostatistics for Medical and Biomedical Practitioners** . 2.



ed. California: Elsevier, 2015. 727 p. Disponível em: <<https://goo.gl/fPE2qh>>. Acesso em: 30 out. 2018.

IEZZI, G.; DOLCE, O.; POMPEO, J. N. **Fundamentos de Matemática Elementar – Logaritmos**. vol.2. 10 ed. São Paulo, 2013.

JUNGCK, J. R. Mathematics Make Microbes Beautiful, Beneficial, and Bountiful. In: GADD, Geoffrey M.; SARIASLANI, Sima. **Advances in Applied Microbiology**. San Diego, Ca: Academic Press, 2012. Cap. 3. p. 37-76. Disponível em: <<https://bit.ly/2PrPXFO>>. Acesso em: 28 out. 2018.

KHAN, S. *et al.* Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. **International Journal Of Genomics**, Wuhan, China, v. 2016, p.1-14, 6 nov. 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2405954>.

LEVINSON, W. Crescimento. In: LEVINSON, Warren. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13. ed. São Paulo: Mcgraw Hill Brasil, 2016. Cap. 3. p. 15-17. Disponível em: <<https://bit.ly/2pJ2tSE>>. Acesso em: 9 out. 2018.

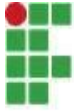
LURIA, S.; DELBRUCK, M. **Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance**. Genetics, 1943. p. 491-511. Disponível em: <<https://bit.ly/2JHh9eo>>. Acesso em: 20 out. 2018.

MAIER, R. M. **Bacterial Growth**. Environmental Microbiology. Elsevier Inc., 2009. p. 37-54. Disponível em: <<https://bit.ly/2D83jBn>>. Acesso em: 9 out. 2018.

MAOR, E. **e : the story of a number**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1994.

MATA-ALVAREZ, J.; MITCHELL, D. A. MATHEMATICAL MODELING IN BIOTECHNOLOGY. In: DOELLE, Horst Werner; ROKEM, Stefan; BEROVIC, Marin. **BIOTECHNOLOGY: Methods in Biotechnology**. Oxford: Encyclopedia Of Life Support Systems (eolss), 2009. p.102-139. Disponível em: <<https://bit.ly/2OPFomX>>. Acesso em: 5 abr. 2018

MENEELY, P. M. Pick Your Poisson: An Educational Primer for Luria and Delbrucks



Ministério da Educação

Classic Paper. **Genetics**, Haverford, Pa, v. 202, n. 2, p.371-375, 1 fev. 2016. Genetics Society of America. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/genetics/202/2/371.full.pdf>>. Acesso em: 4 nov. 2018.

NASCIMENTO, A. A. C. et al. **TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE**. Ribeirão Preto, Sp: Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2003. 87 p.

PIERCE, B. A. Análise da Genética Molecular e Biotecnologia. In: PIERCE, Benjamin A.. **Genética: Um Enfoque Conceitual**. 5. ed. Rio de Janeiro, Rj: Guanabara Koogan Ltda., 2016. Cap. 19. p. 480-520.

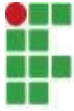
PRIETO, J. **Resistentes, la selección se conoce precozmente**. Disponível em: <<https://bit.ly/2DncEW7>>. Acesso em: 06 nov. 2018.

SAMPAIO, C. F.; SILVA, A. G. UMA INTRODUÇÃO À BIOMATEMÁTICA: A IMPORTÂNCIA DA TRANSDISCIPLINARIDADE ENTRE BIOLOGIA E MATEMÁTICA. In: COLÓQUIO INTERNACIONAL "EDUCAÇÃO E CONTEMPORANEIDADE", 6., 2012, São Cristovão. **VI Colóquio Internacional Educação e Contemporaneidade ISSN 1982-3657**. São Cristovão: Educon, 2012. p.1-12. Disponível em: <http://educonse.com.br/2012/eixo_06/PDF/26.pdf>. Acesso em: 5 abr. 2018.

STEPHENSON, F. H. **Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory**. 2. ed. San Diego, Ca: Academic Press, 2010. 460 p. Disponível em: <<https://bit.ly/2F4IMAp>>. Acesso em: 4 set. 2018.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS M. J. **Fundamentos de Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro, Rj: Guanabara Koogan Ltda., 2013. 739 p. Tradução de: Cláudia Lúcia Caetano.

WAHL, G. M., BARGER, S. L., e KIMMEL, A. R. Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: Theoretical concepts and practical considerations.



Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987. p. 399–407.

WALLACE B. R.; MIYADA C. G. Oligonucleotide probes for the screening of recombinant DNA libraries. **Guide to Molecular Cloning Techniques**, 1987. p. 432–442.

WETMUR, J.G.; SNINSKY, J.J. Nucleic acid hybridization and unconventional bases. In **PCR Strategies** (M.A. Innis, D.H. Gelfand, and J.J. Sninsky, eds.). Academic Press, San Diego, CA, 1995. pp. 69–83. Disponível em: <<https://bit.ly/2PL8UDF>>. Acesso em: 8 nov. 2018.