



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA**

**THAYS PAULINO SIMARRO**

---

---

**LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*) EM  
DIFERENTES PROPORÇÕES DE DNA EQUINO E BOVINO**

---

---

**Goiânia  
2021**

**THAYS PAULINO SIMARRO**

---

---

**LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*) EM  
DIFERENTES PROPORÇÕES DE DNA EQUINO E BOVINO**

---

---

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito obrigatório para a obtenção do Título de Licenciatura.

Orientador: Dr. Alex Silva da Cruz  
Coorientadora: Sarah R. Amado, Me.

**Goiânia  
2021**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**BANCA EXAMINADORA DA MONOGRAFIA**

**Aluna: Thays Paulino Simarro**

---

**Orientador: Dr. Alex Silva da Cruz**

---

**Coorientadora: Sarah R. Amado**

**Membros:**

**1.Dr. Alex Silva da Cruz**

**2. Lorrynne Guimarães Oliveira, Me.**

**3. Calebe Bertolino Marins de Campos, Me.**

## **DEDICATÓRIA:**

Dedico este trabalho à minha avó Izabel quem foi meu maior apoio em todos os momentos, que fez a faculdade se tornar um sonho possível e me propôs um novo mundo de possibilidades.

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço à minha avó Maria Izabel por ter me dado todo apoio e incentivo durante essa jornada, por ter acreditado em mim, sem ela nada disso seria possível. Sou grata também a minha tia Solange que sempre me incentivou até nas horas mais difíceis e nunca desistiu de me ajudar. Sou grata aos meus tios Dayse e Jales que também me ajudaram e acreditaram em mim. Sou grata aos meus colegas Ygor, Raissa, Haylla, que me acompanharam nas lutas diárias durante o curso, dando todo o apoio necessário. E grata aos professores, principalmente o professor Alex que me orientou durante todo o curso com duas iniciações científicas e o trabalho final.

Por fim sou grata a Deus por ter me concedido saúde, força e disposição nestes quatro anos do curso. Sem ele, nada disso seria possível.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
DEDICATÓRIA.....	V
SUMÁRIO .....	VI
RESUMO .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1. PRODUÇÃO DE CARNE BOVINA E EQUINA NO BRASIL .....	3
1.2. QUALIDADE DA CARNE BRASILEIRA PARA A COMERCIALIZAÇÃO .....	4
1.3. TIPOS DE FRAUDE ALIMENTAR .....	5
1.4. TESTES USADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDES EM ALIMENTOS.....	7
1.4.1. PCR.....	7
1.4.2. ELISA.....	8
1.4.3. LAMP .....	9
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 MÉTODO .....	14
3.1 EXTRAÇÃO DE DNA .....	14
3.2 TESTE LAMP .....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	16
5 CONCLUSÕES .....	19
6 REFERÊNCIAS.....	20
7 ANEXOS .....	26
8 Termo de autorização para divulgação.....	30

A adulteração de carne se tornou um problema de preocupação global. Os métodos existentes que identificam a contaminação de carne equina são caros e complexos, requerendo equipamentos especializados. Desenvolvemos um método específico, rápido e de fácil visualização: a LAMP, que em apenas 1 hora faz a detecção de até 0,1% de carne equina. Através desta técnica, é possível fazer a detecção de DNA equino utilizando diferentes proporções de DNA equino de amostras de carne, bem como identificar o nível de sensibilidade da LAMP, ou seja, identificar qual a proporção entre DNA equino e bovino que a LAMP consegue detectar. O resultado pode ser observado a olho nu, através de corantes intercalantes. A técnica se destaca por ser isotérmica, simples e rápida, podendo ser feita até nos laboratórios mais simples.

Palavras-Chave: DNA, Contaminação, Fraude, Patente.

*Meat adulteration has become an issue of global concern. Existing methods for identifying equine contamination are expensive and complex, requiring specialized equipment. We developed a specific, quick and easy to visualize method: LAMP, which in just 1 hour detects up to 0.1% of equine meat. Through this technique, it is possible to detect equine DNA using different proportions of equine DNA from meat samples, as well as identify the sensitivity level of LAMP, that is, identify the proportion between equine and bovine DNA that LAMP can detect. The result can be observed with the naked eye, through intercalating dyes. The technique stands out for being isothermal, simple and fast, and can be performed even in the simplest laboratories.*

*Keywords: DNA, Contamination, Fraud, Patent.*



# 1 INTRODUÇÃO

---

De acordo com o Centro de Estudos Avançado de Economia Aplicada (CEPEA USP, 2007) o agronegócio no Brasil corresponde a 23,5% do PIB (Produto Interno Bruto), do qual a pecuária é responsável por 8,27%. A pecuária brasileira gera emprego para 10% da população economicamente ativa do país e de 2007 a 2015 sua taxa de crescimento anual chegou a 8,05% (CARVALHO *et al.*, 2017).

Neste contexto, o Brasil ocupa a posição de maior exportador de carne bovina do mundo e o 2º maior produtor de bovinos do mundo, com aproximadamente 212 milhões de cabeças de gado (FONSCECA *et al.*, 2005). Além de apresentar um numeroso rebanho que abastece mais de 150 países, o Brasil é considerado o segundo maior consumidor (38,6 kg/habitante/ano) de carne bovina do mundo, o que gera a necessidade de abate de quase 200 mil cabeças de gado por dia (BERNDF, 2019).

Para que a produção de bovinos ocorra com qualidade e seja bem-vista no mercado exterior é indispensável a aplicação da genética para a seleção de raças (FREITAS, 2018). Ao processar a carne para a comercialização, também é importante considerar se este produto atende a aspectos sanitários.

No entanto, em 2013 a qualidade de produtos cárneos foi fortemente abalada em vários países por ter sido encontrado DNA de carne de cavalo nestes produtos. Em Paris, por exemplo, houve a descoberta de carne de cavalo em lasanhas, o que causou grande prejuízo ao Brasil, visto que todas as carnes exportadas foram devolvidas (CASTRO, 2014).

À medida que a fraude alimentar em questão foi sendo detectada em outros países, a desconfiança no setor se tornou tão ampla que o comissário de saúde europeu Tonio Borg, mandou fazer testes com 6,5 mil amostras de carne. O objetivo de Borg detectar tanto a presença ilegal de carne de cavalo em produtos originalmente a base de carne bovina, quanto identificara presença do anti-inflamatório fenilbutazona, comumente utilizado

em cavalos, mas com grande potencial tóxico, genotóxico e carcinogênico para o organismo humano (CASTRO, 2014).

Até o presente momento, uma das técnicas mais utilizadas para detectar fraude da carne de cavalo é a PCR (Reação de Cadeia de Polimerase). A PCR é uma técnica complexa que envolve três tipos de temperaturas específicas, dentre outras características que a faz ser de difícil aplicação para lugares remotos. Por isso, é de enorme importância o desenvolvimento de uma técnica inovadora, rápida e de baixo custo para a identificação de amostras alimentares contaminadas. Tantos pré-requisitos podem ser atendidos pela LAMP (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop), que se apresenta como alternativa promissora para a identificação de produtos a base de carne de vaca com presença ilegal de carne de cavalo, pois demanda a utilização de apenas uma temperatura em banho-maria para a amplificação do DNA alvo, que pode ser visualizado a olho nu através da utilização de corantes intercalantes. (WANG J. *et al.*, 2019).

A LAMP é caracterizada por uma reação isotérmica com uma temperatura de 36°C, que pode ser realizada em uma única etapa. Pode ser realizada, fazendo-se o uso de um conjunto de seis *primers*: F3 e B3, FIP e BIP. FLP e BLP FIP, F3 e FLP ligam-se à região 3'. Já na região 5', ligam-se os primers B3, BIP e BLT. (WANG J. *et al.*, 2019)

Dentre outros trabalhos realizados que utilizaram a LAMP para detecção de carne equina, o trabalho Brunner merece destaque. Os resultados foram analisados com base no corante sybr green e foi desenvolvido por um grupo Brunner. A detecção visual é feita com precisão e mostra o potencial de aplicação e detecção no local. Dentre os vários experimentos realizados com diversos animais (gado, porco, ovelha, coelho e outros), a carne de cavalo obteve maior especificidade. Em apenas 1 hora, 0,1 % de misturas de carne equina foram detectadas em outras carnes, mostrando o quanto o método é adequado para verificar adulteração de carne. (WANG *et al.*, 2019).

## 1.1. Produção de carne bovina e equina no Brasil

De acordo com o Centro de Estudos Avançado de Economia Aplicada, o agronegócio no Brasil corresponde a 23,5% do PIB (Produto Interno Bruto), do qual a pecuária é responsável por 8,27% (COELHO 2007). A pecuária brasileira gera emprego para 10% da população economicamente ativa do país e de 2007 a 2015 sua taxa de crescimento anual chegou a 8,05% (CARVALHO *et al.*, 2017).

Em se tratando da produção de carne bovina, o Brasil é o segundo maior produtor, correspondendo a 22,1% da produção desta carne mundialmente (RIBEIRO *et al.*, 2005). Para se ter uma ideia em 2016, as exportações de carne representaram 48% dos produtos exportados pelo Brasil, chegando a 11,38 milhões de toneladas, representando 18,8% do volume mundial. Neste mesmo ano, a carne bovina contribuiu com 5,51 bilhões de dólares. Assim, nota-se que exportações de carne funcionam como um arrecadador de moeda estrangeira, ficando, portanto, relevante a avaliação do papel que o Brasil desempenha no comércio internacional (NETO, 2018).

No período de 2004 a 2010, o Brasil foi líder mundial nas exportações de carne vermelha, com a capacidade do rebanho e novos acordos comerciais, o Brasil exportou carne para mais de 150 países. As inovações tecnológicas no campo e na indústria frigorífica levaram à produção de carnes com maior controle de qualidade e garantia de procedência. Os principais estados brasileiros exportadores de carne bovina são: São Paulo, Mato Grosso, Goiás, Mato do Grosso do Sul, Rondônia, Minas Gerais e Pará (NETO, 2018).

O Brasil é um país privilegiado para produção de gado, pois apresenta grandes dimensões de Terra, chegando a mais de 167 milhões de hectares de pasto no país. Também apresenta condições climáticas favoráveis, o que contribui para o baixo custo de produção quando comparado aos países europeus. Estes aspectos, somados ao menor custo da mão de obra, contribuem para que o país ofereça carne com o preço mais favorável em relação aos concorrentes no mercado mundial, tendo seu produto mais atrativo (NETO, 2018).

A carne equina apresenta baixo consumo na maioria dos países. Representa cerca de 0,25% da produção total de carnes no mundo. O Brasil detém o quarto maior rebanho equino do mundo, sendo que o consumo desta carne é insignificante no país. Mas em países da Europa, seu consumo tem aumentado devido o reconhecimento do seu valor nutricional. O Brasil é o décimo quarto exportador mundial de carne equina, além de ocupar o sexto lugar do *ranking* de abates da espécie, com produção anual estimada de 23 mil toneladas de carne (SANTOS, 2018).

A carne de cavalo desempenha um importante papel na cadeia nutricional, sendo considerada magra entre os diversos tipos de carne. Tem como características uma cor escura, ausência de tecido adiposo e gordura amarela peculiar. A carne é composta por 69,6% de músculo, 17,4% de ossos e apenas 10,45% de gordura. Apresenta teores elevados de ferro e zinco estando, portanto, suficiente para suprir um terço da exigência diária de adultas (SANTOS, 2018).

Por uma questão cultural, a carne de cavalo não faz parte dos hábitos brasileiros. Apesar de ser um alimento das classes pobres na maioria dos países europeus, não é aceita no Brasil (WILLEMES, 2013).

## **1.2. Qualidade da carne brasileira para a comercialização**

Por ser um grande exportador de carne, o Brasil precisa atender a todas as necessidades dos países que importam o produto. Portanto, a carne deve conter todos os aspectos de qualidade necessária, como: rendimento e composição, proporção de carne magra e gordura, quantidade de marmorização no tecido magro, cor e textura da gordura, tamanho e a forma dos músculos, cor da carne e capacidade de retenção de água, composição química do músculo, palatabilidade, integridade do produto e qualidade ética relacionada ao bem-estar do animal (FILHO, 2006).

São dois, os fatores que influenciam na qualidade da carne exportada: intrínsecos, que são vinculados ao genótipo dos animais e às condições ambientais as quais os animais são submetidos e os extrínsecos, que incluem todos os procedimentos técnicos adotados pelos matadouros-

frigoríferos e as medidas tomadas até chegar no consumidor (FELICIO, 1997).

Na tentativa de atender às expectativas dos consumidores, a rastreabilidade dos alimentos se tornou um meio viável para facilitar a ação corretiva e o planejamento preventivo, visando a melhoria contínua dos produtos alimentícios. Deste modo, acompanha-se o bem-estar do animal desde o nascimento até o abate, tendo em vista a proteção da saúde animal para garantir a segurança alimentar da carne para a população que a consome (LARA *et al.*, 2003).

Mas a rastreabilidade faz-se importante também após o abate, visando acompanhar o processamento da carne e reduzir, por conseguinte, o risco de fraude alimentar. Esta consiste na alteração ou modificação total ou parcial de um ou mais componentes do produto de acordo com padrões estabelecidos ou fórmulas aprovadas pela legislação (LARA *et al.*, 2003).

### **1.3. Tipos de fraude alimentar**

Um exemplo de fraude alimentar foi o que ocorreu em 2017, com a operação carne fraca, causando grande impacto à exportação brasileira. Nesta operação foi identificado na carne o excesso de conservante que estava muito além do máximo permitido, a adulteração sob o aspecto do uso de produtos químicos supostamente cancerígenos e a comercialização de carne estragada, o que desencadeou uma proibição de grandes países importarem carne, como: China, Chile, Egito, Panamá, México, União Europeia, entre outros (COELHO, 2017).

Outra consequência da operação carne fraca, foi o comprometimento da imagem do Brasil como grande exportador mundial ao ser revelado um esquema de adulteração de pelo menos 30 frigoríficos, trazendo impactos tanto no mercado interno, quanto no externo. Este escândalo trouxe ao Brasil, o risco de perder espaço para outros competidores no mercado exterior. Mas, com o tempo e com a influência das mídias, a imagem do Brasil quanto à produção e comercialização de carne pode ser recuperada com a transparência do governo e o afastamento dos casos envolvidos (SILVA, 2016).

Outro exemplo de fraude é o do escândalo internacional no qual havia adulteração de carne bovina com carne equina. Esta prática ilegal traz danos à saúde do consumidor, uma vez que produtos cárneos com presença de carne equina podem conter medicamentos veterinários, como a fenilbutazona, que é tóxica para a medula óssea e está associada à anemia aplásica. Além disso, a fenilbutazona tem potencial genotóxico e carcinogênico, fazendo com que o consumo de carne equina sem procedência seja preocupante sob a perspectiva da segurança alimentar (CASTRO, 2014).

Em 2013, houve um escândalo em Paris, com lasanhas sendo vendidas com carne equina a qual não se encontrava declarada no rótulo. Em 1981, o Estados Unidos importou carne bovina adulterada por carne equina. Em 1948, no Reino Unido, também houve adulteração de carne equina sendo vendida como carne bovina em hambúrgueres. Na Irlanda, foi achado carne de cavalo em almôndegas adulteradas com carne equina (HIGGINS, 2013). No Brasil, no município de Tubarão, em Santa Catarina houve a suspeita de que um estabelecimento vendia carne de boi como carne equina. Todas estas fraudes, mostram a importância de uma gestão adequada de alimentos, com técnicas qualificadas para detecção do adulterante, neste caso, a carne equina (PORTO, 2013).

Outro problema que agrava as vendas de produtos cárneos, se refere às modificações dos rótulos dos produtos e à substituição do produto parcialmente ou inteiramente, o que priva o consumidor de saber o que está consumindo. Neste contexto, várias técnicas vêm sendo utilizadas para análise de produtos de origem animal, como a Reação em Cadeia Polimerase (PCR), o teste ELISA e o teste de Amplificação Isotérmica Mediada por Alças, os quais são capazes de detectar fraudes alimentares, inclusive a fraude pela adição de outros tipos carne em carne bovina (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

## 1.4. Testes usados para identificação de fraudes em alimentos

Visando uma exportação e uma comercialização interna de qualidade com respectiva diminuição das fraudes alimentares, foram desenvolvidas várias técnicas para detectar adulterações em carne bovina ou a troca de carnes. Uma delas é a Reação em Cadeia Polimerase (PCR), uma técnica que permite identificar o DNA da (s) espécie (s) presente (s) na amostra (MEIRA, 2015).

### 1.4.1. PCR

A amplificação por PCR consiste no anelamento de pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) em uma determinada região do DNA de uma determinada espécie seguido da síntese *in vitro* de milhares de cópias do DNA alvo. Após a amplificação por PCR, costuma-se realizar a eletroforese em gel de agarose para detecção do DNA amplificado (LOPES, 2013).

A PCR começa com uma enzima chamada DNA polimerase, usada para sintetizar novas fitas de DNA a partir das fitas moldes já existentes. A DNA polimerase é retirada da bactéria resistente ao calor chamada *Thermus aquaticus*, podendo assim ser usada em altas temperaturas para desnaturar o DNA molde. A partir do *primer*, que é uma sequência curta de nucleotídeos que se liga ao DNA molde por sequências de bases complementares, estabelece-se um ponto de partida para a síntese de DNA, determinando a sequência que será amplificada (LOPES, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Quanto às etapas da PCR, ocorrem em um termociclador passando por três temperaturas. Primeiro ocorre a desnaturação, a 96°C, que separa as fitas molde de DNA. Segundo: o anelamento, a cerca de 55 a 65°C, onde ocorre o resfriamento e os *primers* se ligam às fitas simples de DNA. Terceiro: a extensão, onde as temperaturas são elevadas a 72° C, para que a DNA polimerase estenda os *primers* e produza as novas fitas de DNA (LOPES, 2013).

As vantagens da PCR são: rapidez, alta especificidade e sensibilidade, além de apresentar baixo risco de contaminação (OLIVEIRA *et*

*al.*, 2015). Através desta técnica, é possível identificar a presença ou ausência de material genético de uma espécie em um alimento (OLIVEIRA *et al.*, 2015). As detecções são feitas até mesmo através de sequências de DNA muito pequenas.

Em se tratando da PCR multiplex, capaz de identificar até seis tipos de DNA diferentes em uma amostra, mostra-se promissora para a identificação de adulterações em amostras de carne (CARVALHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

#### **1.4.2. ELISA**

O método ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), (Ensaio de imunossorvente ligado a enzima) é um método utilizado para identificação de antígenos e anticorpos no plasma sanguíneo. Através deste, é possível detectar carne de cavalo em misturas de carne não aquecida. A técnica emprega o princípio da visualização da reação anticorpo com antígeno, em pouco tempo o anticorpo promove a reação no substrato, desenvolvendo a cor. A intensidade da cor na reação depende da quantidade de anticorpo presente (SARTOR *et al.*, 2003).

No teste, um antígeno é adicionado a placa e se liga a sua superfície, é feita uma lavagem para adicionar os antígenos que não se ligam. A amostra a à placa, eles se ligarão. Uma nova lavagem é feita para retirar os anticorpos que ser pesquisada é adicionada, e se tiver anticorpos contra o antígeno adicionados não se ligaram. O cromógeno e os substratos são adicionados, se os cromógenos forem oxidados pela enzima, haverá formação de cor (SARTOR *et al.*, 2003).

Para a detecção de carne equina, o antígeno é adicionado a microplaca, onde também coloca os anticorpos específicos para cavalos obtidos por imunoabsorção de anti-soros de cavalo em extrato sarcoplasmático imobilizados de frango, carne bovina e suína para remover anticorpos da reação cruzada. Os anticorpos purificados ligados a um suporte sólido sequestram proteínas solúveis de músculo de cavalo de misturas de carne (MARTIN *et al.*, 1988).



Os métodos ELISA são cada vez mais utilizados na análise de produtos alimentícios devido à sua sensibilidade, baixo custo e reduzido tempo de análise podendo vir a desempenhar um importante papel no controle da autenticidade dos produtos cárneos ( LILIANA *et al.*, 2015)

### 1.4.3. LAMP

Até o presente momento, uma das técnicas mais utilizadas para detectar a fraude da carne de cavalo é a PCR (Reação de Cadeia de Polimerase). A PCR é uma técnica complexa que envolve três tipos de temperaturas específicas, dentre outras características que a faz ser de difícil aplicação para lugares remotos (VIEIRA, 2012). Por isso, é de enorme importância o desenvolvimento de uma técnica inovadora, rápida e de baixo custo para a identificação de amostras alimentares contaminadas. Tantos pré-requisitos podem ser atendidos pela LAMP (Amplificação Isotérmica Mediada por Alças), que se apresenta como alternativa promissora para a identificação de produtos à base de carne de vaca com presença ilegal de carne de cavalo, pois demanda a utilização de apenas uma temperatura em banho-maria para a amplificação do DNA alvo, que pode ser visualizado a olho nu através da utilização de corantes intercalantes (NAGAMINE *et al.*, 2002; NJIRU *et al.*, 2008).

Notomi *et al.* (2000) desenvolveu a LAMP para a amplificação do DNA através do uso de conjunto de quatro *primers*, da Bst DNA polimerase, das dNTPs, dentre outros reagentes. A reação é isotérmica, acontecendo na temperatura 60-65°C por 40-60 minutos. O *primer* interno direto é chamado de FIP e o reverso é denominado BIP. Há também o uso de *primers* que atuam nas alças do *amplicon* para acelerar a reação. O processo funciona da seguinte forma: primeiro se produz o material que vai ser trabalhado para que ocorra a amplificação, o ciclo de alongamento e o ciclo de reciclagem (NOTOMI, 2011).

A LAMP é caracterizada por ser uma reação isotérmica que funciona a uma temperatura de 60-65°C, podendo ainda ser realizada em uma única etapa (NOTOMI, 2000). Pode ser realizada utilizando-se um conjunto de quatro a seis *primers*: dois internos, dois externos e dois de *loop*. Os dois

*primers* externos são descritos como F3 e B3 (função de deslocamento durante a etapa não cíclica). Os *primers* internos são FIP e BIP (atuam na etapa não cíclica e na etapa cíclica da LAMP). Os *primers* FLP e BLP são *primers* de *loop*, ou seja, atuantes nas alças de DNA formadas durante a reação, assim, têm a função de se ligar aos locais onde não são acessados pelos outros quatro *primers* descritos anteriormente e servem para acelerar a reação. FIP, F3 e FLP atuam no sentido 3' da fita de DNA, enquanto BIP, B3 e BLP atuam no sentido 5' da fita de DNA (SILVA, 2014).

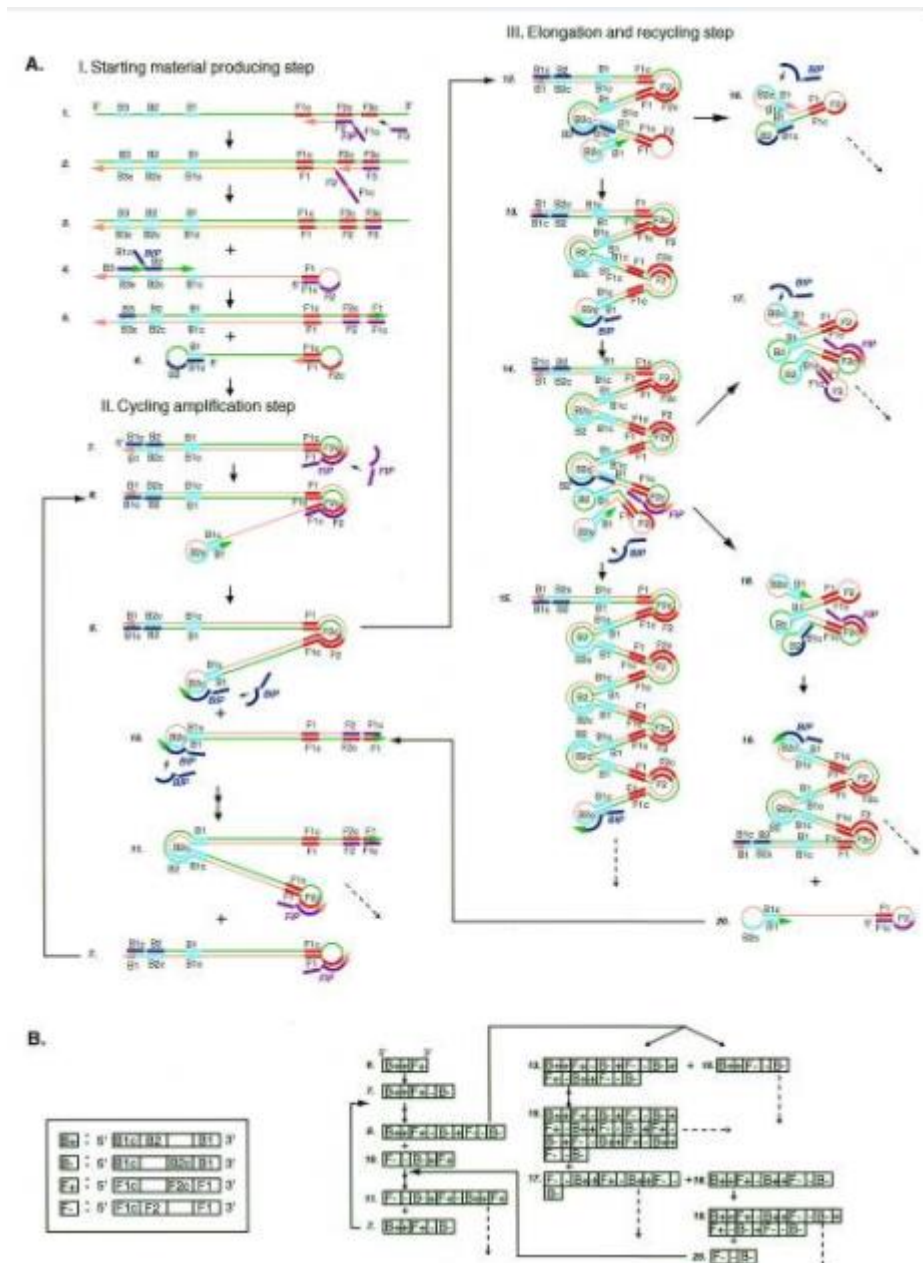
Os *primers* se anelam a fita molde de DNA de forma muito específica (só se anelam ao DNA da espécie para a qual foram projetados), contribuindo para a amplificação desta fita de DNA (SILVA, 2014)

A utilização dos *primers* contribui para reduzir o tempo da reação e para que ela aconteça em uma temperatura única (isotérmica), o que facilita sua realização. *Amplicons* de diferentes tamanhos são gerados. Essa amplificação pode ser detectada pelo uso de corantes pós-reação (KUMAR *et al.*, 2017).

A LAMP é dividida em duas etapas, a primeira é a não cíclica, conforme a figura A: é feita com dois pares de *primers* externos F3 e B3, que servem para amplificar o DNA alvo na etapa não cíclica. FIP e BIP são *primers* internos e sintetizam a fita complementar que terão o deslocamento executado pelos *primers* externos. Primeiro, os iniciadores internos dão origem aos loops, que se formam nas extremidades da fita de DNA. Os iniciadores FIP e F3 atuam no sentido *sense* e B3 e BIP atuam no sentido *anti-sense*. Quando a reação atinge a temperatura necessária, a enzima passa a ter atividade. O iniciador FIP se anela a região F2c e a enzima Bst polimerase começa a dar início a síntese da fita complementar. Em seguida o iniciador F3 reconhece sua região específica F3c e direciona a enzima para dar extensão a fita. Logo o iniciador FIP se desloca da fita sintetizada. Nesta mesma fita complementar que foi deslocada, o primer BIP anela na região B2c, finalizado a síntese. Em seguida o iniciador B3, reconhece a região alvo B3c, provocando o deslocamento da fita sintetizada pelo BIP. Esta fita sintetizada pelo iniciador BIP apresenta as extremidades loops, indicando que o alvo pode ser amplificado na etapa cíclica e servirão para deslocar as fitas sintetizadas pelos iniciadores internos (OLIVEIRA, 2016).

Na etapa cíclica, conforme a figura B, o FIP reconhece a região F2c presente na extremidade do loop e começa a síntese pela Best polimerase. Após a síntese ser finalizada, forma a estrutura haste-laço que é responsável por promover a autoativação da síntese. Em seguida, a fita sintetizada por FIP é liberada. Nesta mesma fita liberada, que é uma fita invertida da estrutura de partida o BIP se anela a região B2c, formando a fita complementar que irá apresentar outras haste-laços, com várias cópias invertidas do DNA alvo. Vários ciclos são repetidos até que os iniciadores internos estejam totalmente consumidos, como representado na figura A (OLIVEIRA, 2016, ZAHRADNIK *et al.*, 2015).

Ao final da reação, o resultado pode ser visto através de corantes fluorescentes especiais ou mudança de cor na mistura de reação. Os corantes mais utilizados para visualização dos resultados são os corantes o azul de hidroxinaftol (HNB) e SYBR Green I. (OLIVEIRA, 2016)



Representação esquemática do mecanismo de LAMP. ( A ) Etapas da reação LAMP. Esta figura mostra o processo que começa a partir do primer FIP. No entanto, deve ser lembrado que a síntese de DNA também pode começar a partir do primer BIP. ( B ) Apresentação esquemática da estrutura dos produtos LAMP em uma forma de DNA linearizada. B +, B-, F + e F- representam as estruturas de DNA mostradas nas caixas à esquerda. +, a sequência alvo flanqueada por B1 e F1c; -, a sequência complementar (NOTOMI *et al.*, 2000).

As vantagens da LAMP são: sua alta especificidade para a sequência alvo, é simples e fácil de realizar, pois exige apenas quatro primers, uma DNA polimerase e um banho maria de laboratório regular. Também é uma técnica sensível, exigindo poucas quantidades de DNA. Seu limite de detecção é de poucas cópias de DNA, sendo comparada à PCR (NOTOMI *et al.*, 2000).

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral do presente estudo é realizar, através da técnica LAMP, a detecção de DNA equino utilizando as diferentes proporções de DNA equino e bovino de amostras de carne.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Testar a LAMP em amostras com diferentes proporções de DNA equino e de DNA bovino.
- Detectar a especificidade do teste LAMP ao testá-la no DNA bovino.
- Identificar o nível de sensibilidade da LAMP, ou seja, identificar qual a proporção entre DNA equino e bovino que a LAMP consegue detectar.
- Divulgar os resultados para que outras pesquisas correlatas possam ser realizadas, principalmente na área da vigilância sanitária, onde é possível que haja alimentos à base de carne de boi com presença ilegal de carne de cavalo.

### 3 MÉTODO

---

O projeto de pesquisa envolvendo a utilização do teste LAMP para a detecção do DNA equino em reações contendo DNA bovino foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais sob o número de registro 4082060318.

Quanto à realização da pesquisa, ocorreu na Pontifícia Universidade Católica de Goiás, havendo para tal, a necessidade de aquisição de amostras de carne bovina e de carne equina. Deste modo, a carne bovina foi adquirida em açougue localizado na cidade de Goiânia e a carne equina foi obtida através de doação, pelo frigorífero Prosperidad localizado na Araguari – MG.

No laboratório Replicon, a carne foi armazenada no frizer a uma temperatura de  $\pm 0^{\circ}$ . Com esta carne, foram feitos testes LAMP com diferentes proporções de carne equina e bovina: 1:0; 4:1; 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 0:1; 0:0.

#### 3.1 Extração de DNA

Anteriormente ao processo de extração do DNA em amostras de carne equina e bovina, foram realizados alguns procedimentos padrão de boas práticas em laboratório, como: a limpeza das bancadas e a limpeza das ponteiros e pipetas que foram ainda colocadas sob luz ultravioleta para a maior garantia de descontaminação.

De maneira resumida, a extração do DNA foi feita a partir de 20 mg de amostra de carne equina e bovina, colocadas em 600  $\mu$ L de solução *Nuclei Lysis Solution*, misturadas com esta solução e levadas ao banho-maria. Em seguida, foi adicionado 200  $\mu$ L *Protein Precipitation Solution* ao tubo, seguido da adição de 600  $\mu$ L de *Isopropanol* e 600  $\mu$ L de álcool a 70%. A cada reagente acrescentado, levava-se as amostras à centrifuga por quatro minutos a uma velocidade de 14.000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi retirado, transferido ao tubo com isopropanol e colocado no vórtex por vinte segundos. Ao final foi adicionado ao DNA 100  $\mu$ L de DNA Rehydration para, por último, ser deixado no banho maria por 1 h a 65° C.

### 3.2 Teste LAMP

Na padronização da LAMP testou-se a técnica em diferentes concentrações e volumes de reagentes, ordem em que deveriam ser adicionados à reação, tempo e temperatura no termociclador. Ao final do teste de padronização, definiu-se que para cada reação LAMP o volume final padrão seria de 25 µL resultante da adição dos seguintes reagentes: 5pmol de cada primer externo (F3 e B3), 40pmol a concentração dos primers internos (FIP e BIP), 4mM de MgSO<sub>4</sub> (New England Biolabs, EUA), 1,6 mM de dNTPs (Sigma, EUA), 8U Bst DNA polimerase (New England Biolabs, EUA), 1X de tampão de reação (10x ThermoPol Buffer) e DNA genômico alvo.

Os 4 primers utilizados na reação LAMP (F3, B3, FIP e BIP) foram projetados no sistema PRIMER BLAST® disponibilizado pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI) com base no genoma de referência de DNA mitocondrial de *Equus caballus* MN187575.1, obtido no GenBank (Quadro 1).

**Quadro 1.** Sequências nucleotídicas dos *primers* LAMP direcionados à amplificação do DNA mitocondrial de *Equus caballus*.

Primer code	Primer Sequence (5'- 3')	Number of bases
F3	GCATACCCCATCCAAGTCAA	20
B3	GGAAAGAATGGGCGAGGTTG	20
FIB	TTCCCGCGGCTTGGTGATTAAGTCATTTCCAGTCAACACGCA	42
BIP	CTACGTGTCCCAATCCTCGTCCGAAAGAACCAGATGCCAGGT	42

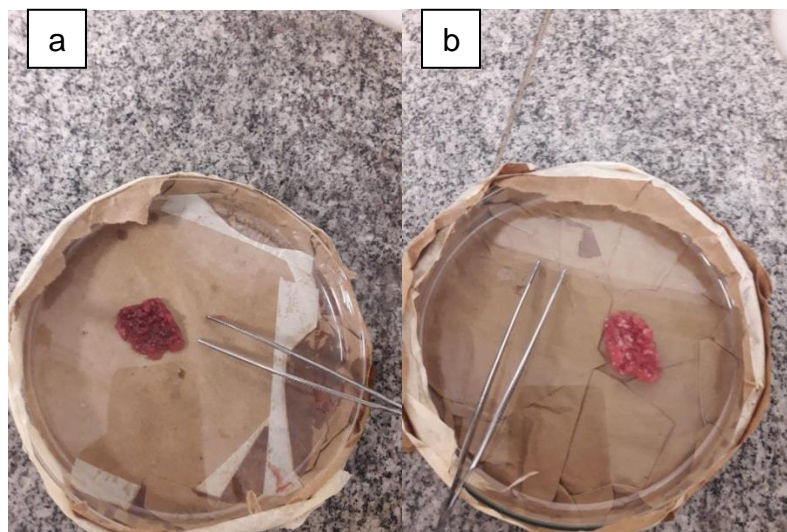
Finalizada a montagem das reações utilizando-se os reagentes destacados acima e considerando ainda as proporções de carne equina e bovina: 1:0; 4:1; 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 0:1; 0:0, levou-se as mesmas ao termociclador (Applied Biosystems®) a uma temperatura de 65°C durante 60 minutos e 85°C durante 5 minutos para que se fizesse a amplificação do DNA alvo (DNA equino). Para detecção da amplificação, realizou-se o método de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Os experimentos foram feitos com a carne equina e bovina, observando-se, anteriormente à realização dos mesmos, diferença de coloração entre estes dois tipos de carne onde a carne equina é a mais escura e a bovina é a mais clara (Figura C).

A carne equina é considerada importante em alternativa à carne vermelha, pois apresenta características nutricionais favoráveis. Sendo uma carne magra e com baixo índice de gordura. Possui uma cor avermelhada e é considerada de consistência firme e de aspecto fino e longo, com certa semelhança à carne bovina. Também tem elevado índice de proteína, zinco e ferro. (SANTOS. 2018)



**Figura C:** C a) Amostra da carne equina; C b) Amostra de carne bovina.

Ao realizar os experimentos. Foi feito nas proporções de DNA equino e de DNA bovino de: 1:0; 4:1; 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 0:1; 0:0, verificou-se que apenas a proporção de 1:0, ou seja, 1 de DNA equino para 0 de DNA bovino, não amplificou. (Figura C).

Das reações descritas acima também observou-se que exceto a que continha a proporção de 1:0 de DNA equino, todas as outras com presença de DNA equino amplificaram, mostrando a especificidade da técnica para a



amplificação deste DNA e sua sensibilidade, visto que amplificou o DNA equino mesmo quando presente em menores quantidades nas proporções testadas. Ainda quanto à especificidade, vê-se que está presente quando a proporção de 0 de DNA equino para 1 de DNA bovino não amplificou. Ademais, o controle negativo teve ausência de amplificação, mostrando ausência de contaminação nas amostras.



**Figura D:** mostrando as ampliações de DNA equino nas seguintes proporções de DNA equino e bovino: 1:0; 4:1; 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 0:1; 0:0.

Estudos com adulterações de carne, para validar a especificidade do método, mostram que a carne de cavalo é a que apresenta melhores resultados, com amplificação significativa. As reações foram feitas usando o corante azul de hidroxinaftol (HNB). Após meia hora de reação, em uma temperatura a 65° C, foi obtido uma cor rosa positiva e nas outras espécies de animais, foi obtido apenas uma cor amarela, mostrando, portanto, que a

LAMP foi específica para a amplificação de carne equina. A análise sensitiva foi feita usando diferentes porcentagens de DNA equino: 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0%. Os resultados mostraram que o método foi suficiente para detectar até 0,1% do DNA em questão (WANG *et al.*, 2019).

Através dos estudos de Wang et al. 2019, chegou-se à conclusão de que o ensaio da LAMP é de simples execução, rápido, preciso e sensível para discriminação de espécies de carne e pode ser usado para apoiar a identificação de espécie de carne para combater a fraude e adulteração de alimentos cárneos. Os autores puderam ainda, identificar os limites de detecção dos ensaios LAMP em carne crua e carne cozida, mostrando que é possível obter resultados de amplificação em 30 minutos com maior sensibilidade do que os ensaios PCR. (ZAHARADNIK, *et al.*, 2014)

Outra pesquisa feita com amostras de DNA de búfalo, frango, peru, porco, resultou em uma resposta negativa do ensaio LAMP, mas, concomitantemente, positiva e específica para a amplificação do DNA alvo, que, no caso, era o DNA equino. Para tanto, foi misturada carne de cavalo com carne bovina e feita em diferentes porcentagens. A carne de gado e água mostraram resultados negativos e a porcentagem de 0,01% de carne de cavalo pôde ser detectada em 10 minutos. Ao final do estudo, os autores concluíram que o ensaio LAMP foi específico, sensível e rápido (AARTSE, 2017).

A patente que consta em anexo, mostra estes resultados.

## 5.0 CONCLUSÕES

---

- Com base nos estudos feitos na revisão bibliográfica da LAMP, conclui-se que a técnica LAMP ao utilizar um conjunto de *primers* específicos se torna rápida e de fácil realização.
- Devido às suas características, pode ser realizada em laboratórios mais simples no Brasil e em outros laboratórios de países em desenvolvimento.
- Foi realizado nas porcentagens 1:0, 4:1 3:1, 2:1, 1:1, 1:3, 1:4, 0:1, 0:0, e com o teste de pipetagem, foi possível amplificar até na proporção 2:1, tendo, portanto, a técnica com alta sensibilidade.

## 6.0 REFERÊNCIAS

---

1. AARTSE A. SCHOLTENS, HANS J.G. MONIQUE M. GREVE B. THEO W. PRINS, LEEN A. van G. ESTHER J. K. TOINE F.H. BOVEE. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid onsite detection of horse meat. p. 7-12. 2017.
2. ABRANTES M. R.; CÂMPLELO C. S.; SILVA J. B. A. Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor. **Rev. Instituto Adolfo Lutz** v.73 p.246-250. 2014.
3. BERNDT A. NOGUEIRA A. R. A. ANDRI L. C. CAVALLARI M. M. JACINTO M, A. C. Qualidade de carne maturada de animais de raça Canchim de diferentes linhagens. **EMBRAPA** São Carlos p. 3-5.
4. CASTRO M. L. Desenvolvimento de metodologias de biologia molecular para detecção de carne de cavalo (*Equus caballus*) em produtos cárneos. Coimbra p. 12-21. 2014
5. CARVALHO S; BRANDÃO G P. E; LEAL P. M. Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia polimerase: o método de controle de fraude em alimentos. **Digital Library** p.49-60. 2010. Disponível em: [https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-10022011-145229/publico/Fernanda\\_Melo\\_Lima\\_Brugnano.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-10022011-145229/publico/Fernanda_Melo_Lima_Brugnano.pdf). Acesso em:20/04/2021.
6. CARVALHO B. T. ZEN S. A Cadeia pecuária de corte no Brasil: evolução e tendências. **Rev. Ipecege**. v.3 p.85. 2017.
7. CHO A. DONG H. Meat Species Identification using Loop-mediated Isothermal Amplification Assay Targeting Species-specific

Mitochondrial DNA **Korean J. Food Sci. An** V. 34 N. 6 P. 799-807. 2014.

8. COELHO; SILVA A. Impacto Operação Carne Fraca nas exportações de carne brasileira. São Paulo. p 22-23. 2017. Disponível em: [http://dspace.insper.edu.br/xmlui/bitstream/handle/11224/1807/Alexandre%20Silva%20Coelho\\_Trabalho.pdf?sequence=1](http://dspace.insper.edu.br/xmlui/bitstream/handle/11224/1807/Alexandre%20Silva%20Coelho_Trabalho.pdf?sequence=1). Acesso em: 24/04/2021
9. KUMAR Y; BANSAL S; JAISWAL P; Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid and Sensitive Tool for Quality Assessment of Meat Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.16 p.1360-1362. 2017.
10. LARA J. A. F; SOARES A. L; LIMA N. P; IDA E. I; SHIMOKOMAKI M; Rastreabilidade de carne bovina: uma exigência para a segurança alimentar. Londrina, v.24 n.1, p.143-144. 2003.
11. MEIRA L; MAFRA I; COSTA J; AMARAL J. S; RAMOS F; OLIVEIRA M; Novas metodologias para identificação de adulterações de produtos cárneos com carne de cavalo. n.9 p.5 2015.
12. LOPES A. R. L. Métodos de biologia molecular aplicados a segurança alimentar: identificação de espécies de bovino (*Bos taurus*) e suíno (*sus scrofa*) em produtos cárneos. Coimbra. p. 7-19. 2013.
13. FELICIO P. E. Fatores ante e post Mortem que influenciam na qualidade da carne bovina. Nome da revista? v.único p.3-4. ,1997.
14. FILHO L. A. Produção de carne bovina no Brasil, qualidade, quantidade ou ambas? Simpósio sobre desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte. Brasília. 2006.
15. HIGGINS A. Escândalo de carne de cavalo macula UE. 2013. Disponível em: <https://www1.folha.uol.com.br/mundo/2013/03/1246815-escandalo-da-carne-de-cavalo-macula-ue.shtml>. Acesso em:19/04/2021.

16. MARTIN R. AZCONA J. I. GARCÍA T. HERNANDEZ P. E. SANZ B. Sandwich ELISA for detection of horse meat in raw meat mixtures using antisera to muscle soluble proteins. **Meat Science** v.22 Ed.2 p.143-153. 1988.
17. MEIRA L; MAFRA I; COSTA J; AMARAL J. S; RAMOS F; BEATRIZ M. P; OLIVEIRA P. Novas metodologias para identificação de adulterações de produtos cárneos com carne de cavalo. **Revista Asae**. p. 4-7. 2015.
18. NAGAMINE, K; HASE, T.; NOTOMI, T. Reação acelerada por amplificação isotérmica mediada por loop usando iniciadores de loop. **Molecular and Cellular Probes**. v. 16, n.3, p. 224-231, 2002
19. NETO A. O. O Brasil no mercado mundial de carne bovina: análise da competitividade da produção e da logística de exportação brasileira. **ATELIÊ GEOGRÁFICO** Ordem correta é volume, número, página e ano. Tudo em minúsculo v. 2 n.2 p. 184-185. Goiânia, 2018.
20. NJIRU ZK.; MIKOSZA A.s.; ARMSTRONG T.; ENYARU J.C.; NDUNGU J.M., THOMPSON A.R. Método de amplificação isotérmica mediada por Loop (LAMP) para detecção rápida de Trypanosoma bruceirhodesiense. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.2, n.1, 2008.
21. NOTOMI T; OKAYAMA H; MASUBUCHI H; YONEKAWA T; WATANABE K.; AMINO N. T. H. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v.28 n.12 p.3-7. 2000.
22. NOTOMI T; FRANÇOIS P; TANGOMO M; HIBBS J; BONETTI E; BOEHME C. C; PERKINS M; SCHRENZEL J; Robustez de uma reação de amplificação isotérmica mediada por loop para aplicações de diagnóstico. **FEMS Immunology e Medical Microbiology** v.62 p.41-48. 2011.
23. OLIVEIRA K. G. Amplificação isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP) em microchip de poliéster-toner. Goiânia. **Instituto de química da Universidade Federal de Goiás**. p. 5-8. 2016

24. OLIVEIRA A. C. S; FERREIRA B. C. A; CARDOSO G. V. F; CILVA C. L; SILVA C. L; SILVA F; MELO R. M; CARDILLI D. J; LEITE F. P. L; ROOS T. B; MORAES C. M. Avaliação da técnica PCR multiplex para detecção de fraude por adição de carne bubalina em carne moída bovina. REV. **INSTITUTO ADOLFO LUTZ**. p. 371-379. 2015.
25. PORTO G. Caso da carne de cavalo. Um escândalo de dimensões europeias. **LE ÉCRIVAIN LE**. 2013. Disponível em: <https://leecrivain.wordpress.com/2013/02/09/caso-da-carne-de-cavalo-um-escandalo-de-dimensoes-europeias/>. Acesso em:13/04/2021.
26. RIBEIRO C. F. A; ALMEIDA O. T; CONCEIÇÃO S; RIBEIRO S. C. A; Exportação brasileira de carne bovina: uma análise de comércio exterior. IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. p. 1894-1895. Paraíba. 2005.
27. SANTOS S. B. A. Produção e comercialização de carne equina brasileira. Campinas SP. p.1-2. **SOBER**. 2018.
28. SARTOR I. F; HASEGAWA Y. M; CANAVESSI A. M; O. PINCKNEY R. D. Ocorrência de anticorpos de Neospora caninum em vacas leiteiras avaliados pelos métodos ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. v.24 n.1 p. 3-10, 2003.
29. SILVA D. R. Os efeitos da operação carne fraca na imagem do Brasil. **Revista estrangeira organizacional**. v. 5. p. 51-52. 2016.
30. SILVA G. D. Detecção da bactéria waolbachia em insetos através da técnica LAMP (Amplificação isotérmica mediada por loop). **Arca, repositório institucional da fiocruz**. Belo Horizonte MG. P. 25-35. 2014
31. TEIXEIRA L. V. TEIXEIRA C. S. OLIVEIRA D. A. A. Identificação espécie-específica de carnes e produtos cárneos de origem bubalina e bovina pela técnica de PCR – RFLP. **Rev. Scielo**. p.1-3. 2015.

32. VELOSO A. C. A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite ou proteínas lácteas. P1. **SCIELO**. São Paulo. 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/CC96mSTPfnqDDv47StWL6Mt/?lang=pt>. Acesso em: 14/12/2021.
33. VIEIRA D. P. Técnicas de PCR: Aplicações e padronização de reações. Exemplos práticos de autenticação de carne e seus derivados. **Pubvet** Londrina. v.6 n.21 p.2-4. 2012.
34. WANG J. WAN Y. CHEN C. LIANG H. DING S. SHANG K. LIANG M. DONG J. DU F. CUI X. TANG Z. Colorimetric Detection of Horse Meat Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). **Food Analytical Methods** p. 3-6 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12161-019-01590-9> . Acesso em: 02/11/2021.
35. WILLEMES E. Consumo Simbólico. **Rev. Ciências sociais. USP**. v.20 n.1 p. 148. 2013.
36. ZAHRADNIK C. MARTZY R. MACH R. L. KRAKA R. FARNLEITNER A. H. BRUNNER K. Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) para detecção de carne de cavalo em carne e produtos de carne processada. **Food Anal. Methods** v.8 p. 1576–1581 (2015). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-014-0072-8>. Acesso: 30/06/2021.





## ANEXOS

---



## Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "APLICAÇÃO DA TÉCNICA LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION ASSAY (LAMP) PARA DETECÇÃO DE CARNE EQUINA EM PRODUTOS DERIVADOS DE CARNE BOVINA E PARA DETECÇÃO DE CARNE BOVINA E/OU EQUINA EM PRODUTOS DERIVADOS DE CARNE SUÍNA", protocolada sob o CEUA nº 4082060318, sob a responsabilidade de **Sarah Amado Ribeiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEUA/PUC GOIAS) na reunião de 02/04/2018.

We certify that the proposal "LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION ASSAY (LAMP) FOR THE DETECTION OF EQUINE MEAT IN BOVINE MEAT PRODUCTS AND BOVINE AND / OR EQUINE MEAT IN PRODUCTS DERIVED FROM SWINE MEAT", utilizing 1 Bovines (males and females), 1 Equines (males and females), protocol number CEUA 4082060318, under the responsibility of **Sarah Amado Ribeiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Pontifical Catholic University of Goiás (CEUA/PUC GOIAS) in the meeting of 04/02/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [01/2018](#) a [01/2021](#) Área: [Genética](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Machos e  
Fêmeas](#)

idade: [1 a 10 anos](#)

Linhagem: Sem raça definida (SRD)

Peso: 400 a 1000 kg

Origem: Não aplicável biotério

Espécie: Equídeos

sexo: Machos e  
Fêmeas

idade: 1 a 25 anos

Linhagem: SRD

Peso: 300 a 1000 kg

Resumo: A presença ilegal de carne de determinadas espécies de animais em produtos cárneos processados e ultraprocessados, confere fraude alimentar com grande possibilidade de danos à saúde do consumidor. Desta forma, a presente pesquisa utilizará a técnica de Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay (LAMP) associada à coloração com corante intercalante, com a finalidade de detectar a contaminação de carne bovina por carne equina e a contaminação de carne suína por carne bovina ou equina em alimentos processados e ultraprocessados. Esta técnica confirmará a presença do DNA do animal que está conferindo contaminação (DNA alvo) ao produto cárneo através de visualização de fluorescência a olho nu, o que possibilita sua aplicação nos produtos à base de carne de vaca ou de porco ofertados no mercado, assim como a identificação de contaminação dos mesmos. Os resultados obtidos com a investigação de contaminação dos produtos à base de carne de vaca ou de porco poderão colaborar para a execução de uma fiscalização rigorosa dos produtos em questão, favorecendo o aumento de sua qualidade e confiabilidade no cenário nacional e internacional.

Local do experimento: Núcleo de Pesquisas Replicon

Goiânia, 02 de abril de 2018

Profa. Dra. Marta Regina Magalhães  
Blanch

Profa. Dra. Graziela Torres

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais      Vice-  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Pontifícia  
Universidade Católica de Goiás      Pontifícia Universidade  
Católica de Goiás



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade,  
Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional  
do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 024460 7

Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: SOCIEDADE GOIANA DE CULTURA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 01587609000171

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Associação com intuito não econômico

Endereço: 1ª AVENIDA , N 656 SETOR UNIVERSITARIO

Cidade: Goiânia

Estado: GO

CEP: 74605-020

País: Brasil

Telefone: (62) 3946 1014

Fax: (62) 3946 1460

Email: marcoslajovic@hotmail.com

Dados do Pedido



PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO  
Av. Universitária, 1068 | Setor Universitário  
Caixa Postal 86 | CEP 74005-010  
Goiânia | Goiás | Brasil  
Fone: (62) 3946 1000 ou 1021 | D  
www.pucgoias.edu.br | prograd@pucgoias.edu.br

RESOLUÇÃO n°038/2020 – CEPE

ANEXO I  
APÊNDICE ao TCC

Termo de autorização de publicação de produção acadêmica

O(A) estudante Thays Paulino Simarro do Curso de Ciências Biológicas Licenciatura, matrícula 20172005100065, telefone: (62) 99545-52-98 e-mail thayspaulino98@gmail.com, na qualidade de titular dos direitos autorais, em consonância com a Lei n° 9.610/98 (Lei dos Direitos do autor), autoriza a Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás) a disponibilizar o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado : LAMP (loop mediated isothermal amplification) em diferentes proporções de DNA equino e bovino, gratuitamente, sem ressarcimento dos direitos autorais, por 5 (cinco) anos, conforme permissões do documento, em meio eletrônico, na rede mundial de computadores, no formato especificado (Texto (PDF), Imagem (GIF ou JPEG); Som (WAVE, MPEG, AIFF, SND); Vídeo (MPEG, MWV, AVI, QT), outros, específicos da área; para fins de leitura e/ou impressão pela internet, a título de divulgação da produção científica gerada nos cursos de graduação da PUC Goiás.

Goiânia, 14 de dezembro de 2021

Assinatura do autor: Thays Paulino Simarro

Nome completo do autor: Thays Paulino Simarro

Assinatura do professor-orientador: Alex Silva da R.

Nome completo do professor-orientador: \_\_\_\_\_