

ELAINE CRISTINA DE MATTOS

**Associação de métodos para detecção de
Trypanosoma cruzi em alimentos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

**Área de Concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-
Chioccola**

**SÃO PAULO
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Mattos, Elaine Cristina de.

Associação de métodos para detecção de *Trypanosoma cruzi* em alimentos / Elaine Cristina de Mattos. – 2017.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Vera Lúcia Pereira-Chioccola.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Análise de alimentos. 3. Surtos de Doenças. 4. Doença de Chagas. 5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

SES/CCD/CD-346/2017

Dedico este trabalho aos pacientes com doença de Chagas, especialmente os envolvidos nos surtos por infecção oral, com todo o meu respeito e solidariedade, na esperança de poder contribuir para um futuro melhor.

AGRADECIMENTOS

À Vera Lúcia Pereira-Chioccola, minha orientadora, pela coragem de assumir esta orientação como um grande desafio, pelo voto de confiança, pelos ensinamentos, paciência e parceria estabelecida ao longo desses anos, além da amizade.

À Vilma dos Santos Menezes Gaiotto Daros, minha madrinha profissional, que desde minha época como bolsista do Programa de Aprimoramento Profissional me incentivou e me apoiou. Obrigada pelos anos de amizade, minhas conquistas são parte de tudo o que você fez por mim.

Às queridas Márcia Bittar Atui (Bitts), Maria Aparecida Moraes Marciano (Marys) e Maria Luisa Barbosa (Malu), por todo apoio, ajuda no desenvolvimento dos experimentos, troca de experiências que foram de um valor inestimável para o desenvolvimento desse trabalho, risadas e amizade sincera. Vocês estarão sempre no meu coração.

Aos funcionários do Núcleo de Morfologia e Microscopia do Centro de Alimentos, onde tudo começou, meus sinceros agradecimentos ao Antonio Roberto de Souza Ferreira, Márcia Dimov Nogueira, Augusta Mendes da Silva, Juliane dos Santos Soares, Hilberto Matosalém de Souza, Sandra Zoraide Obando Ayad e Eloane Cristina Paiva Silva. Obrigada por terem aguentado minha cara de sono e pelos momentos de terapia.

À Deise Aparecida Pinatti Marsiglia pela oportunidade e valorização do meu trabalho.

Aos funcionários do Centro de Laboratório Regional de Santo André, especialmente à Rute Dal Col, pela amizade e companheirismo; Adriana Loureiro do Nascimento, pelos conhecimentos em tantas áreas; Lúcia Vannucci Savignano, pelo carinho e incentivo; Ivana Barros de Campos, Daniela Colpas e Vanessa Carvalho pelas conversas nos momentos difíceis, almoços descontraídos e risadas.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Cristina da Silva Meira-Strejevitch e Ricardo Gava por toda assistência na parte laboratorial. Obrigada aos queridos Cida, Daise, Gabi, Inara, Kate, Lilian,

Luiz, Margarete, Marilena, Marta, Ricardinho e Valeria pela paciência em ajudar a *aluna turista*.

Ao pessoal do Laboratório de Doença de Chagas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, especialmente à Angela Maria Lourenço e Cristiane Castro Faccini, por ceder amostras de *T. cruzi* e meio de cultura, pelos ensinamentos sobre xenodiagnóstico artificial e pela parceria.

Às alunas do Dr André Gustavo Tempone, do Laboratório de Toxinologia, especialmente à Daiane, Juliana Tonini e Thais, por cederem tantas vezes um "pouquinho" de *T. cruzi*, permitindo a realização de todos os experimentos.

À Alessandra Ferraiolo Nogueira Domingues, da EMBRAPA Amazônia Oriental, pelas amostras de polpa de açaí cedidas.

Aos integrantes da banca de qualificação, professor Pedro Luiz da Silva Pinto, Cristina da Silva Meira-Strejevitch e Gabriela Motoie, por todas as sugestões de melhorias.

À minha família: ao meu marido Marcelo pelo apoio, companheirismo e valorização do meu trabalho; à minha filha Carol pela paciência e compreensão ao ouvir a mamãe falar: *filha agora a mamãe não pode te dar atenção, pois preciso terminar minha tese*; à minha mãe Elza pelo incentivo, paciência e carinho, que desde sempre foi minha melhor amiga e meu exemplo de pessoa. Obrigada por fazerem parte da minha vida e por todo amor.

Aos meus entes queridos que já não estão mais presentes, mas tenho certeza que estariam orgulhosos e felizes com esta minha conquista, especialmente meu pai Luiz Carlos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pela oportunidade e ao Instituto Adolfo Lutz pela infra-estrutura.

Enfim, sou grata a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse trabalho.

RESUMO

A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 6 a 8 milhões de pessoas no mundo. No Brasil, a transmissão oral tem se destacado, sendo que a polpa de açaí e o caldo de cana são os alimentos mais envolvidos em surtos. A dificuldade de isolamento de parasitas em alimentos não tem permitido a análise epidemiológica desses episódios. O objetivo do presente estudo foi padronizar um método laboratorial para detecção de *T. cruzi* em alimentos. Para atingir este objetivo estudamos as seguintes estratégias: i. padronização da PCR convencional (cPCR) e em tempo real (qPCR) para a determinação de *T. cruzi* em polpa de açaí e caldo de cana; ii. avaliação da semeadura de alimentos contaminados em meio de cultura LIT a fim de aumentar a carga parasitária potencializando a sua detecção na PCR; iii. análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com os alimentos; iv. simulação da contaminação dos alimentos com triatomíneos infectados a fim de testar o método padronizado; v. aplicação da técnica de pesquisa de sujidades leves para detecção de fragmentos dos triatomíneos como indicador da contaminação. Todos os ensaios foram realizados em amostras de polpa de açaí e caldo de cana contaminadas com diferentes concentrações de *T. cruzi* (cepa Y). Os resultados revelaram que o procedimento ideal para pesquisa de *T. cruzi* em polpas de açaí e caldo de cana consistiu em: i. centrifugação do alimento; ii. extração de DNA com kit comercial para matriz fezes e; iii. qPCR utilizando iniciadores específicos para *T. cruzi*. A cPCR se mostrou também eficiente para detecção do parasita em alimentos, sendo os limites de detecção de 1×10^1 e 1×10^2 tripomastigotas nos sedimentos de polpa de açaí e caldo de cana, respectivamente. A semeadura em meio LIT dos alimentos contaminados experimentalmente não foi eficiente para aumentar a carga parasitária. A análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com os alimentos mostrou que o parasita manteve-se móvel e ativo nas amostras de caldo de cana por mais de 24 horas, mas na polpa de açaí apresentaram-se móveis e ativos por até 8 horas. A técnica padronizada aplicada às amostras de alimentos

contaminados com triatomíneos infectados foi eficiente para detecção de *T. cruzi*. As técnicas para pesquisa de sujidades leves permitiram a recuperação e caracterização dos fragmentos de triatomíneos, como indicador da contaminação por *T. cruzi*. Estes dados dão subsídios para concluir que a qPCR padronizada para detecção de *T. cruzi* em amostras de alimentos poderá atender a demanda de diagnóstico dos surtos de infecção oral de doença de Chagas aguda, juntamente com a pesquisa de sujidades leves, contribuindo para o esclarecimento dos casos e como suporte para as ações de vigilância em saúde.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, análise de alimentos, surtos de doenças, doença de Chagas, Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects approximately 6 to 8 million people worldwide. In Brazil, oral transmission has been prominent. Acai pulp and sugarcane juice are the foods most frequently involved in outbreaks. The difficulty to isolate parasites in food has not allowed the epidemiological analysis of these episodes. The objective of the present study was to standardize a laboratory method for the detection of *T. cruzi* in food. To achieve this goal, we studied the following strategies: i. standardization of the conventional PCR (cPCR) and real time (qPCR) to determine *T. cruzi* in acai pulp and sugarcane juice; ii. evaluation of seeding of infected food in LIT culture medium in order to increase the parasite load, thus enhancing its detection in PCR; iii. analysis of morphology and mobility of trypomastigote forms after contact with food; iv. application of light filth analysis for the detection of triatomine bug fragments as an indicator of contamination. All assays were performed on acai pulp and sugarcane juice samples infected with different concentrations of *T. cruzi* (strain Y). Results revealed that the ideal procedure for *T. cruzi* screening on acai pulp and sugarcane juice consisted of: i. centrifugation of food; ii. DNA extraction with commercial kit for stool matrix and; iii. qPCR using specific primers for *T. cruzi*. The cPCR was also efficient to detect the parasite in food, with detection limits of 1×10^1 and 1×10^2 trypomastigotes in the acai pulp and sugarcane juice sediments, respectively. Seeding in LIT media of experimentally infected foods was not efficient to increase parasite load. The analysis of morphology and mobility of trypomastigote forms after contact with food showed that trypomastigotes remained mobile and active in the sugarcane juice samples for more than 24 hours, but in the acai pulp they were mobile and active for up to 8 hours. The techniques to investigate light filth allowed the recovery and characterization of triatomine bug fragments as an indicator of *T. cruzi* contamination. These data support the conclusion that the standardized qPCR to detect *T. cruzi* in food samples could meet the demand for diagnosis of outbreaks of oral infection of acute Chagas disease,

together with the investigation of light filth, thus contributing to the clarification of cases and working as a support for health surveillance actions.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, food analysis, outbreaks, Chagas disease, real time polymerase chain reaction

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA.....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cPCR.....	reação de PCR convencional
C _T (do inglês <i>Threshold cycle</i>).....	número de ciclos
CTAB.....	brometo de cetiltrimetilamônio
DNA (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>).....	ácido desoxirribonucléico
<i>g</i>	força centrífuga
HIV (do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>).....	Vírus da Imunodeficiência Humana
kDNA.....	DNA do cinetoplasto
LIT (do inglês <i>Liver Infusion Tryptose</i>).....	meio de infusão de fígado e triptose
LLC/MK ₂	linhagem de células de rins de macaco Rhesus
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
OPAS.....	Organização Pan-Americana da Saúde
pb.....	pares de bases
PCR (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	reação em cadeia pela polimerase
qPCR.....	PCR em tempo real
SINAN.....	Sistema de Informação de Agravos de Notificação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos.....	20
Figura 2: Formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Figura 3: Formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> no tubo digestivo do triatomíneo.....	25
Figura 4: Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Figura 5: Algumas espécies de triatomíneos.....	29
Figura 6: Reservatórios de <i>T. cruzi</i>	30
Figura 7: Eventos fisiopatológicos da doença de Chagas.....	33
Figura 8: Ranking global de parasitas de veiculação hídrica e alimentar.....	44
Figura 9: Xenodiagnóstico artificial. Ninfas de 3 ^o estágio de <i>T. infestans</i>	56
Figura 10: Ninfa alimentada, com detalhe para o abdômen distendido.....	57
Figura 11: Procedimento para liberação das fezes do triatomíneo para verificação da presença de parasitas.....	58
Figura 12: Recuperação de DNA de <i>T. cruzi</i> no sobrenadante e sedimento de amostras de polpa de açaí após contaminação experimental com diferentes concentrações de tripomastigotas provenientes de cultura de células e determinada por cPCR.....	69
Figura 13: Recuperação de DNA de <i>T. cruzi</i> no sobrenadante e sedimento de amostras de caldo de cana após contaminação experimental com diferentes concentrações de tripomastigotas provenientes de cultura de células e determinada por cPCR.....	69
Figura 14: Curva padrão dos iniciadores <i>Cruzi</i> 32/148-qPCR utilizando DNA de <i>T. cruzi</i> (cepa Y).....	70

Figura 15: Limite de quantificação de qPCR em amostras de polpa de açaí e caldo de cana contaminadas com diferentes concentrações de tripomastigotas.....	71
Figura 16: Recuperação de DNA de <i>T. cruzi</i> em alíquota de 50 g de polpa de açaí contaminada (50g/ 6×10^3 tripomastigotas) e semeada em LIT.....	72
Figura 17: Recuperação de DNA de <i>T. cruzi</i> em alíquota de 50 g de caldo de cana contaminado (50g/ 6×10^3 tripomastigotas) e semeado em LIT.....	72
Figura 18: Resultados de qPCR utilizando amostras de DNA de polpa de açaí (A) e caldo de cana (B) contaminadas com 6×10^3 tripomastigotas/50g, semeadas em LIT (100 mL) e incubados a 28°C, em períodos a que se refere (em dias).....	74
Figura 19: Recuperação de DNA de <i>T. cruzi</i> em amostras de caldo de cana e polpa de açaí após inserção de triatomíneos infectados com <i>T. cruzi</i> nos alimentos, trituração e centrifugação das amostras....	77
Figura 20: Fragmentos de <i>Triatoma infestans</i> (ninfas de 3° estágio) recuperados nas técnicas de pesquisa de sujidades leves nas amostras de alimentos.....	79
Figura 21: Fragmentos de <i>Sitophilus</i> sp e <i>Tribolium</i> sp recuperados nas técnicas de pesquisa de sujidades leves nas amostras de alimentos.....	80
Figura 22: Fragmento do tegumento de <i>Triatoma infestans</i> (ninfas de 3° estágio), recuperado na técnica de pesquisa de sujidades leves nas amostras de alimentos, sob microscópio estereoscópio, aumento de 40x.....	80
Figura 23: Comparação da análise microscópica do fragmento de tegumento de <i>Triatoma infestans</i> , em aumentos de 100x (A) e 400x (B) e élitro de <i>Sitophilus</i> sp, em aumentos de 100x (C) e 400x (D), triturados em polpa de açaí.....	81

Figura 24: Presença de célula tricógena (pelos) nos fragmentos dos élitros de *Sitophilus* sp (A), *Tribolium* sp (B) e no tegumento de *Triatoma infestans* (C)..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mudanças na mortalidade, prevalência e incidência por transmissão vetorial da doença de Chagas em 21 países endêmicos da América Latina, nos anos de 1990, 2000, 2006 e 2010.....	20
Tabela 2: Casos confirmados de doença de Chagas aguda, por modo de transmissão, segundo região de notificação. Período: 2007 - 2014..	21
Tabela 3: Experimentos realizados para a comprovação da infecção oral por <i>T. cruzi</i> , por ordem cronológica.....	38
Tabela 4 - Casos confirmados de doença de Chagas aguda notificados no SINAN, Brasil, por Região/UF de notificação e modo provável de infecção, período 2007 a 2014.....	40
Tabela 5: Casos confirmados por modo provável de infecção, segundo mês dos primeiros sintomas. Brasil, 2007 a 2014.....	42
Tabela 6: Análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com polpa de açaí, no período de 24 horas.....	75
Tabela 7: Análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com caldo de cana, no período de 24 horas.....	76
Tabela 8: Resultados da qPCR para amostras de polpa de açaí e caldo de cana contaminadas com triatomíneos infectados com <i>T. cruzi</i>	77

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Histórico.....	18
1.2 Epidemiologia.....	19
1.3 Agente etiológico.....	22
1.4 Formas de transmissão.....	26
1.5 Características do vetor.....	28
1.6 Outros hospedeiros de <i>T. cruzi</i>	30
1.7 Aspectos clínicos da doença de Chagas.....	31
1.7.1. Aspectos clínicos da doença de Chagas na infecção por via oral.....	32
1.8 Diagnóstico laboratorial.....	33
1.9 Tratamento.....	35
1.10 Surtos de doença de Chagas aguda por via oral.....	36
1.11 Açai.....	44
1.12 Cana-de-açúcar.....	48
1.13 Legislações e controle sanitário dos alimentos.....	49
1.14 Justificativa.....	52
2 OBJETIVOS.....	53
2.1 Geral.....	53
2.2 Específicos.....	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1 Delineamento experimental.....	54
3.2 Obtenção e manutenção de <i>T. cruzi</i>	54
3.3 Xenodiagnóstico artificial.....	55
3.4 Amostras de alimentos.....	58
3.4.1 Polpas de açai.....	58
3.4.2 Caldo de cana.....	59
3.5 Insetos.....	59
3.5.1 Triatomíneos.....	59
3.5.2 Coleópteros.....	59

3.6 Contaminação dos alimentos por <i>T. cruzi</i>	60
3.7 Métodos Moleculares.....	60
3.7.1 Extração de DNA.....	60
3.7.2 PCR convencional (cPCR).....	62
3.7.3 Eletroforese e gel de agarose.....	63
3.7.4 PCR em tempo real (qPCR).....	63
3.8 Cultura dos alimentos contaminados com <i>T. cruzi</i> em meio LIT.....	64
3.9 Análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com os alimentos.....	64
3.10 Contaminação dos alimentos com triatomíneos infectados com <i>T. cruzi</i> artificialmente e coleópteros.....	65
3.11 Pesquisa de sujidades leves nos alimentos infectados com triatomíneos e coleópteros.....	66
3.12 Análise de dados.....	67
3.13 Qualidade dos experimentos moleculares.....	67
4 RESULTADOS.....	68
4.1 Padronização de método para detecção de <i>T. cruzi</i> em alimentos.....	68
4.1.1 Extração de DNA.....	68
4.1.2 cPCR.....	68
4.1.3 qPCR.....	70
4.2. Cultura dos alimentos contaminados com <i>T. cruzi</i> em meio LIT.....	71
4.3 Análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com os alimentos.....	74
4.4 Contaminação dos alimentos com triatomíneos infectados com <i>T. cruzi</i> artificialmente.....	76
4.5 Pesquisa de sujidades leves nos alimentos infectados com triatomíneos e coleópteros.....	78
5 DISCUSSÃO.....	82
6 CONCLUSÕES.....	97

7 REFERÊNCIAS.....	99
--------------------	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A hipótese clássica sobre a origem da doença de Chagas propõe que tenha surgido entre as populações pré-históricas dos Andes quando começaram a domesticar animais, mudaram para hábitos sedentários e adotaram a agricultura. Estas mudanças em seus hábitos de vida aconteceram há aproximadamente 6.000 anos. Entretanto, os dados da paleoparasitologia, baseados na biologia molecular, mostraram que a infecção por *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas eram comuns em populações pré-históricas da América do Sul e América do Norte muito antes deste período, sendo tão antiga quanto a presença humana no continente americano (Ferreira et al., 2011a).

Em 1909, o pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1878-1934), no município de Lassance, interior do Estado de Minas Gerais, descreveu todos os aspectos da doença de Chagas, incluindo as características do parasita, forma de transmissão, reservatórios, ciclo biológico até os sintomas clínicos dos acometidos pela enfermidade (Siqueira-Batista et al., 2007; Neves et al., 2011).

Em abril de 1909, ao examinar uma criança febril, de 2 anos de idade, de nome Berenice, Carlos Chagas descobriu em seu sangue o mesmo protozoário encontrado nos barbeiros e nas diversas espécies de animais examinados, sendo considerado o primeiro caso clínico humano descrito da doença de Chagas (Neves et al., 2011).

Até a década de 1970 a doença de Chagas era endêmica em 18 estados brasileiros. A soroprevalência, em inquérito realizado entre 1975 e 1980, era de 4,2% (Brasil, 2009).

Na América do Norte, a doença de Chagas foi relatada pela primeira vez no México em 1940 e nos Estados Unidos em meados dos anos 50 (Woody e Woody, 1955). Posteriormente uma pesquisa realizada com

imigrantes da América Central na região de Washington, mostrou uma prevalência de 4,9% da doença nesta população (Kirchhoff et al., 1987). Pouco tempo depois foram identificados casos em Nova York e Manitoba, no Canadá (Hotez et al., 2013).

1.2 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença de Chagas está entre as dezessete doenças tropicais negligenciadas, atingindo cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo. Na América Latina há cerca de 5 milhões e no Brasil há 2 milhões de chagásicos, ocorrendo 50.000 novos casos ao ano e 12.000 mortes ao ano, especialmente nos 21 países endêmicos da América Latina (OPAS/OMS, 2016). Os países Argentina, Brasil e México concentram mais de 60% dos casos, seguidos pela Bolívia e Colômbia (Schmunis e Yadon, 2010; WHO, 2015).

Historicamente, a transmissão e morbidade estavam concentradas em áreas rurais da América Latina, onde as condições precárias de moradia favoreciam a infestação pelos vetores. No entanto, nas últimas décadas, o sucesso dos programas de controle vetorial contribuiu substancialmente para a diminuição da transmissão em áreas rurais (Bern et al., 2011).

Com os movimentos migratórios, houve a introdução do parasita em países não-endêmicos tais como Estados Unidos da América, Canadá, Japão, Austrália e diversos países da Europa. Estima-se que há >300.000 indivíduos infectados nos Estados Unidos, >5.500 no Canadá, >80.000 na Europa, >3.000 no Japão e >1.500 na Austrália, conforme **Figura 1** (Coura e Viñas, 2010).

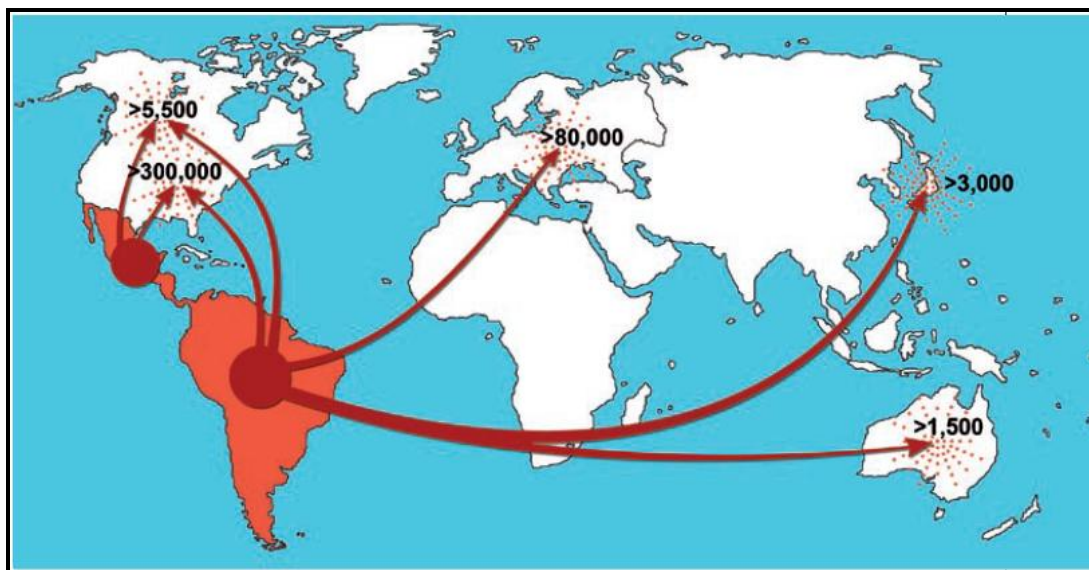


Figura 1 - Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos. Fonte: Coura e Viñas, 2010

Embora estes números tenham apresentado uma redução de 1990 a 2010 (**Tabela 1**), recentemente, a descrição de surtos endêmicos de doença transmitida oralmente abriu uma nova área de estudo e análise. Por ser um meio desconhecido, a contaminação via oral tornou-se um dos casos mais ativos na Venezuela, no Brasil e na Colômbia (SVS, 2016).

Tabela 1: Mudanças na mortalidade, prevalência e incidência por transmissão vetorial da doença de Chagas em 21 países endêmicos da América Latina, nos anos de 1990, 2000, 2006 e 2010. Fonte: SVS, 2016

Parâmetros – estimativas	1990	2000	2006	2010
Número de mortes/ano	>45.000	21.000	12.500	12.000
Número de pessoas infectadas	30.000.000	18.000.000	15.000.000	5.742.167
Casos novos/ano – transmissão vetorial	700.000	200.000	41.200	29.925
População total sob risco	100.000.000	40.000.000	28.000.000	70.199.360

De acordo com o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), no período de 2007 a 2014 foram notificados 1.349 casos de doença de Chagas aguda confirmados, sendo 1.266 casos (93%) somente na região Norte do Brasil. As regiões Nordeste e Centro-Oeste apresentaram 3% e 2% dos casos, respectivamente (**Tabela 2**).

Tabela 2: Casos confirmados de doença de Chagas aguda, por modo de transmissão, segundo região de notificação. Período: 2007 - 2014. Fonte: Ministério da Saúde / SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN NET

Região de Notificação	Ign/Branco	Transfusional	Vetorial	Vertical	Acidental	Oral	Outro	Total
TOTAL	340	1	123	7	2	871	5	1349
1 Região Norte	304	1	97	2	1	859	2	1266
2 Região Nordeste	22	-	13	-	1	11	-	47
3 Região Sudeste	-	-	1	2	-	-	2	5
4 Região Sul	-	-	-	2	-	1	1	4
5 Região Centro Oeste	14	-	12	1	-	-	-	27

Importante ressaltar que, independentemente do modo de transmissão, todas as regiões brasileiras apresentaram ao menos uma notificação de caso da doença aguda.

A notificação obrigatória da ocorrência de casos da infecção aguda em humanos justifica-se plenamente nos objetivos da consolidação da vigilância epidemiológica desta importante endemia latino-americana. Ao contrário, não se indica a notificação de casos crônicos da enfermidade, pois, diante da lenta evolução da parasitose, tal informação nada acrescenta aos estudos epidemiológicos da doença, e, principalmente, não desencadeia nenhuma medida efetiva de vigilância (Ministério da Saúde, 2004; ANVISA, 2006).

Atualmente o risco de transmissão da doença de Chagas no Brasil depende:

I. da persistência de focos residuais de *Triatoma infestans*, com o achado episódico em alguns estados;

II. da existência de grande número de espécies comprovadamente autóctones ou potencialmente vetoras, mesmo que em alguns casos as populações domiciliadas tenham sido grandemente reduzidas (*Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*);

III. da emergência de “novas” espécies (*Triatoma rubrovaria*, *Panstrongylus lutzii*);

IV. da emergência de transmissão “endêmica” na Amazônia, com mecanismos excepcionais de transmissão (vetorial domiciliar sem colonização, vetorial extradomiciliar, oral);

V. da ocorrência de surtos episódicos de transmissão oral (SVS, 2005).

1.3 Agente etiológico

T. cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado, pertencente ao filo *Sarcomastigophora*, classe *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma*, subgênero *Schizotrypanum* (WHO, 2002).

Os membros desta ordem se caracterizam pela presença de uma mitocôndria diferenciada que alberga uma estrutura denominada de cinetoplasto. Em *T. cruzi*, o cinetoplasto apresenta-se volumoso e contém uma fonte de DNA extranuclear denominada de DNA do cinetoplasto ou kDNA. O tamanho e a forma do cinetoplasto são variáveis em diferentes estágios do desenvolvimento do parasita (Valadares, 2007).

O kDNA é constituído por aproximadamente 5 mil a 20 mil minicírculos e 50 cópias de maxicírculos por rede. A principal função apontada para os maxicírculos é a de codificar enzimas da cadeia respiratória, sendo consideradas como verdadeiras representantes do DNA mitocondrial, enquanto os minicírculos parecem codificar os ácidos ribonucléicos-guia (g-RNA) necessários para a edição de RNA mitocondriais (Siqueira-Batista et al., 2007).

A diversidade no comportamento e morfologia dos isolados de *T. cruzi* foi reconhecida logo após a descoberta da doença de Chagas. Desde então, uma variedade de técnicas bioquímicas e moleculares revelaram a grande diversidade genética presente nas cepas deste parasita. Diferentes

pesquisadores descreveram essa diversidade usando vários termos (Anônimo, 1999).

Uma das primeiras propostas para a caracterização biológica de *T. cruzi* foi feita por Brener (1977), que descreveu as cepas Y e CL como as grandes representantes da variabilidade intraespecífica deste protozoário.

Ainda na década de 70, através da análise do perfil eletroforético de isoenzimas do parasita, Miles et al. (1978) reconheceram e nomearam de "zimodemas" (população que apresentam mesmo perfil de isoenzimas) três grupos distintos: zimodemas I e III, constituído por amostras procedentes do ciclo silvestre e zimodema II, representado por amostras do ciclo domiciliar.

Em um esforço para unificar a nomenclatura de *T. cruzi*, a fim de melhorar a comunicação dentro da comunidade científica, em 2009, foi acordado um sistema de que as estirpes deste protozoário deveriam ser referidas por seis unidades de tipagem discretas (DTUs I, II, III, IV, V e VI), proposta aceita atualmente (Zingales et al., 2009). DTUs são definidas como "conjuntos de unidades populacionais geneticamente relacionadas entre si e identificáveis por marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos comuns" (Tibayrenc, 1998).

Quanto à sua morfologia, o protozoário apresenta três formas evolutivas, identificadas à microscopia óptica, pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo: amastigota, epimastigota e tripomastigota (Martins et al., 2012).

- Amastigota - mede cerca de 4,0 μm (entre 2 e 6,5 μm); pode ser fusiforme ou arredondado; apresenta pouco citoplasma, com núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico; o cinetoplasto é bem visível, porém não possui flagelo exteriorizado, nem membrana ondulante, por isso seu único movimento é de rotação; é a forma encontrada dentro das células do hospedeiro vertebrado e multiplica-se por divisão binária longitudinal a cada 12 horas, transformando-se em tripomastigotas sanguíneos, aproximadamente 11 a 13 horas antes da ruptura da célula (**Figura 2A**) (Siqueira-Batista et al., 2007; Rey, 2010).

- Epimastigota - mede entre 20 e 40 μm ; possui flagelo livre, cinetoplasto anterior ao núcleo e membrana ondulante pouco desenvolvida; é bastante móvel, apresenta intensa atividade replicativa, entretanto não é capaz de penetrar nas células do hospedeiro vertebrado, sendo encontrada no tubo digestivo do triatomíneo; essa forma desenvolve-se melhor na faixa de 20° a 28°C, não suportando temperatura de 37°C (**Figura 2B**) (Siqueira-Batista et al., 2007)

- Tripomastigota - não possui atividade replicativa e corresponde à forma infectante extracelular, localizando-se em ambos os hospedeiros: invertebrado, como tripomastigota metacíclico e no vertebrado, como tripomastigota sanguíneo. A forma metacíclica mede em torno de 17 μm , apresenta núcleo grande e central, cinetoplasto com alta densidade de DNA, em porção terminal posterior, com flagelo mais curto emergindo do corpúsculo basal próximo ao cinetoplasto. O tripomastigota sanguíneo pode ser fino ou largo, apresentando entre 15 e 20 μm , sendo que a forma fina apresenta movimento rápido e unidirecional, mais apta à penetração nas células; já a forma larga movimenta-se lentamente e de modo não direcional, não sendo capaz de penetrar nas células, por isso persistem mais tempo na corrente sanguínea (**Figura 2C**) (Siqueira-Batista et al., 2007).

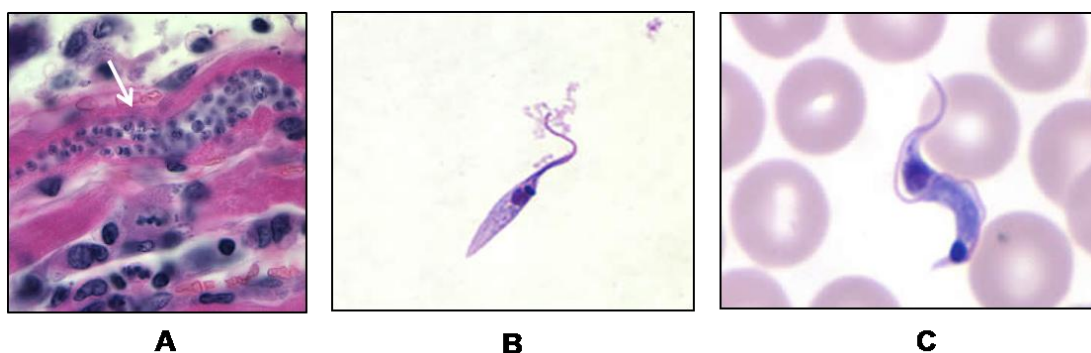


Figura 2 - Formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*: A - amastigota em tecido cardíaco, B - epimastigota em cultura, C - tripomastigota no sangue. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2016.

No triatomíneo detectam-se tripomastigotas, epimastigotas e formas arredondadas com flagelo circundando o corpo, denominadas

esferomastígotas, presentes no estômago e intestino do triatomíneo, predominando geralmente epimastigotas nas porções médias e tripomastigotas na porção distal e nos tubos de Malpighi (**Figura 3**). O parasita não se aloja nas glândulas salivares do inseto, mas pode encontrar-se, eventualmente, em sua cavidade geral. Uma vez infectado, geralmente assim permanecerá o inseto, embora eventualmente esta infecção possa ser eliminada espontaneamente em condições excepcionais, a longo prazo (Dias, 2006; Neves et al., 2011).

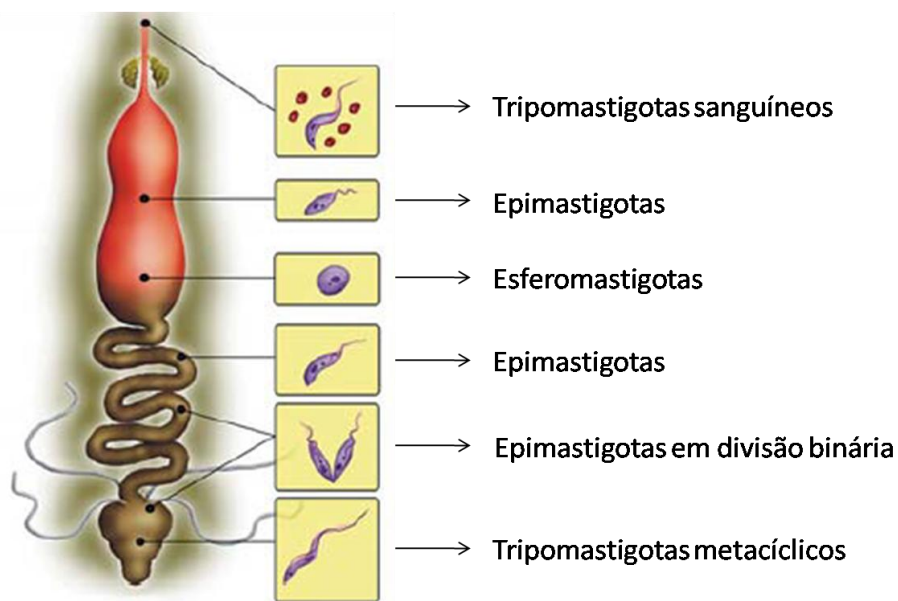


Figura 3: Formas evolutivas *Trypanosoma cruzi* no tubo digestivo do triatomíneo. Fonte: Coura et al., 2016

Nos hospedeiros vertebrados e na cultura de tecidos são encontradas intracelularmente as formas amastigotas, e extracelularmente as formas tripomastigotas presentes no sangue circulante. As formas amastigotas e tripomastigotas são infectantes para células *in vitro* e para vertebrados (Neves et al., 2011).

O ciclo biológico de *T. cruzi*, portanto, envolve uma fase no triatomíneo e outra fase no hospedeiro vertebrado, conforme mostrado na **Figura 4**.

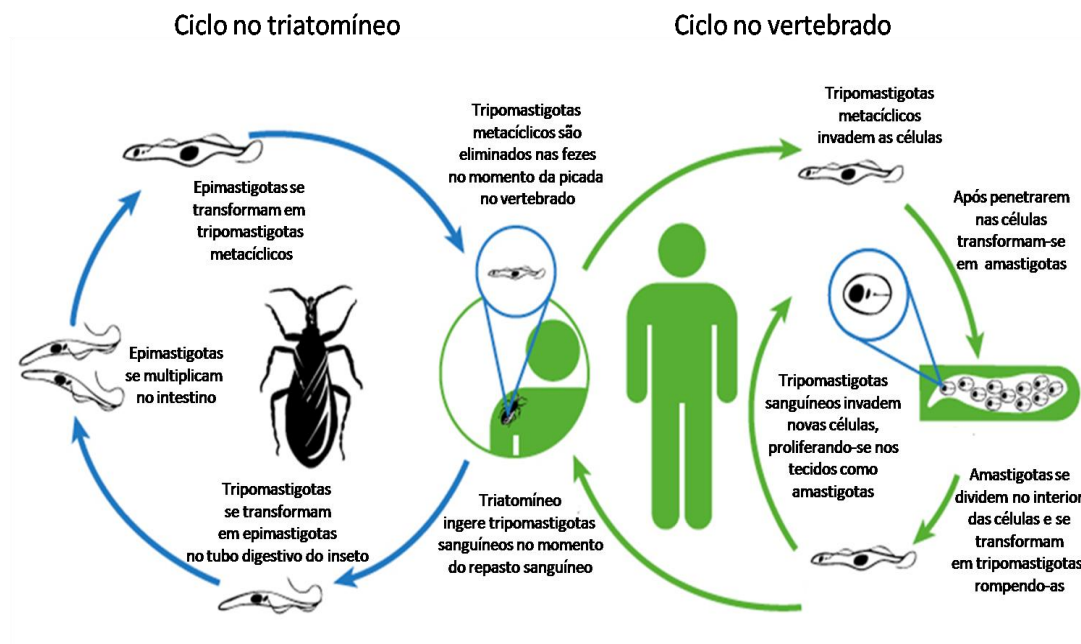


Figura 4: Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2016

Em culturas artificiais com meios enriquecidos (infusão de fígado, triptose), predominam epimastigotas, havendo tendência à diferenciação para tripomastigotas em cultivos mais velhos (Dias, 2006).

Apesar das formas tripomastigotas encontradas no sangue e na cultura apresentarem-se morfológicamente idênticas, 12 glicoproteínas diferentes são usadas para a invasão celular. De acordo com Yoshida (2009), tripomastigotas metacíclicos usam glicoproteínas de superfície, tais como gp82 e gp35 / 50, enquanto as formas de cultura de tecidos utilizam a gp85. Apesar da semelhança molecular, as glicoproteínas tem propriedades adesivas e diferentes receptores nas células alvo (Martins et al., 2011).

1.4 Formas de transmissão

A transmissão de *T. cruzi* para o ser humano pode ocorrer por diversas formas:

- Vetorial: ocorre pela penetração de tripomastigotas metacíclicos, eliminados nas fezes ou na urina de triatomíneos, no momento da picada, em solução de continuidade da pele ou mucosa íntegra (Neves et al., 2011).
- Transfusional / Transplante: ocorre pela passagem do parasita, por transfusão de sangue e/ou hemocomponentes ou transplante de órgãos, de doadores infectados a receptores sadios, sendo considerada a principal forma de transmissão em países não endêmicos (Canadá, Espanha, EUA e outros) e em países latino-americanos que estejam em processo de erradicação do vetor (Ministério da Saúde, 2009a; Ministério da Saúde, 2009b).
- Vertical ou congênita: ocorre, principalmente, pela via transplacentária e pode ocorrer em qualquer fase da doença (aguda ou crônica). A transmissão pode ocorrer durante a gestação ou no momento do parto. Há possibilidade de transmissão pelo leite, durante a fase aguda da doença (Mazza et al., 1936). Já em nutrizes na fase crônica, a transmissão durante a amamentação pode ocorrer em casos de sangramento por fissura mamária e não propriamente pelo leite (Ministério da Saúde, 2014).
- Acidental: ocorre pelo contato da pele ferida ou de mucosas com material contaminado (sangue de doentes, excretas de triatomíneos, animais contaminados) durante manipulação em laboratório, em geral sem o uso adequado de equipamentos de proteção individual (Ministério da Saúde, 2009b).
- Oral: ocorre de maneira circunstancial, por meio de alimentos contaminados com o parasita, a partir de triatomíneos e/ou suas dejeções, urina e/ou secreção anal de marsupiais infectados. Também, pode ocorrer por meio da ingestão de carne crua ou mal cozida de caça ou por meio de hábitos primitivos de ingestão de triatomíneos (OPAS, 2009).

A transmissão oral, pela ingestão de alimentos contaminados, tem sido predominante no Brasil nos últimos anos, embora o modo vetorial seja tradicionalmente o mais conhecido para veiculação do parasita (Dias et al., 2011).

1.5 Características do vetor

O vetor da doença de Chagas é um inseto hematófago conhecido popularmente como barbeiro, pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (Rey, 2010).

Além do nome popular barbeiro, esses insetos são também chamados chupões, chupanças, bicudos, finções ou procotós, e são muito conhecidos das populações rurais de várias regiões do Brasil. De tamanho relativamente grande, geralmente pretos ou acinzentados, possuem manchas vermelhas, amarelas ou alaranjadas ao redor de seu abdômen. Em sua fase adulta apresentam dois pares de asas, das quais a parte superior compõe-se de uma parte mais endurecida e outra mais fina. Por isso são chamados hemípteros, quer dizer, sua asa é metade dura e metade flexível (Ministério da Saúde, 1989).

As espécies estão distribuídas em três gêneros principais: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* que proliferam em diferentes biomas das Américas do Norte, Central e do Sul. Espécies de barbeiros podem ser encontradas desde tocas e furnas terrestres até copas de árvores, especialmente palmeiras e se alimentam do sangue dos mais variados mamíferos, desde tatus até primatas. Os barbeiros, particularmente *Triatoma infestans*, adaptaram-se tão bem ao domicílio humano e a seus moradores (homens, cães e outros animais) que passaram a preferir o homem para seus repastos sangüíneos e a morar e procriar na casa do homem (Camargo, 2008).

O processo de domiciliação dos triatomíneos ainda não é totalmente conhecido. Acredita-se que a evolução da hematofagia na família Triatominae tenha se originado a partir de várias linhagens de Reduviidae, que em primeiro lugar, adaptaram-se como predadores sugadores de sangue, seguido de hematofagia obrigatória em nichos de vertebrados (Schofield, 2000).

Cerca de 140 espécies de triatomíneos são conhecidas atualmente, entre as quais várias apresentam capacidade de transmissão da doença (Ministério da Saúde, 2009b) (**Figura 5**).

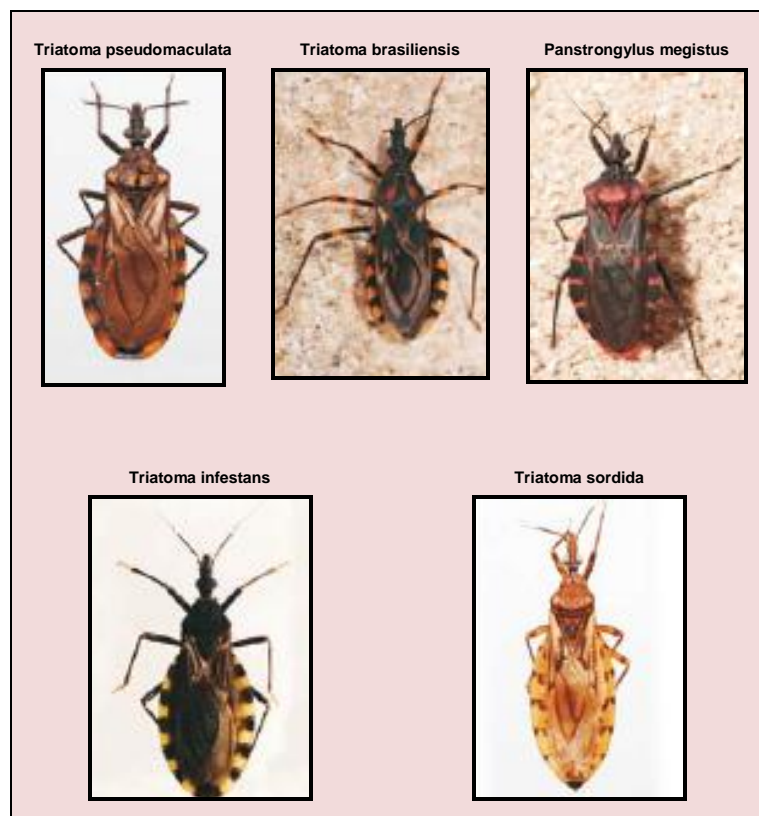


Figura 5: Algumas espécies de triatomíneos. Fonte: Ministério da Saúde, 2009b

Em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (Ferreira e Silva, 2006).

Em estudo realizado para avaliar a vigilância entomológica da doença de Chagas no Estado de São Paulo, no período de 2007 a 2009, Silva et al. (2011) revelaram que as espécies *T. sordida* (92,1%) e *P. megistus* (5,8%) foram as que se destacaram. Entretanto, a positividade para *T. cruzi* foi de 1,2%. A vigilância em vigor no Estado de São Paulo tem se mostrado eficaz e ocorrido de forma contínua, permitindo monitorar a

situação, garantir a sustentabilidade das ações e assegurar a detecção precoce de triatomíneos e o seu controle.

1.6 Outros hospedeiros de *T. cruzi*

A lista dos animais silvestres já encontrados com infecção natural por *T. cruzi* é considerável. Marsupiais, desdentados (tatus) e quirópteros (morcegos), além de roedores, leporídeos, carnívoros e primatas, de vários gêneros e espécies, estão entre eles (**Figura 6**). Os marsupiais parecem ser os reservatórios silvestres mais importantes (Rey, 2010).



Figura 6: Reservatórios de *Trypanosoma cruzi*. Fonte: OPAS, 2009

As aves são refratárias à infecção devido à lise e morte induzida por macrófagos dos parasitas mediada pelo complemento. Embora *T. cruzi* tenha uma ampla gama de hospedeiros, os reservatórios epidemiologicamente importantes variam por região geográfica, devido à

biologia e ecologia dos mamíferos e vetores e como essas interações se traduzem em risco de exposição humana. Gambás e tatus, por exemplo, são importantes reservatórios nas Américas (Kierszenbaum et al., 1981; Meirelles e Souza, 1985; Gaunt e Miles, 2000; Yeo et al., 2005).

1.7 Aspectos clínicos da doença de Chagas

A doença de Chagas caracteriza-se por apresentar três fases distintas: fase aguda, fase indeterminada e fase crônica (Neves et al., 2011).

A fase aguda corresponde ao período em que os parasitas são facilmente encontrados no sangue e caracteriza-se clinicamente por febre, sensação de fraqueza, poliadenite, aumento do fígado e do baço, podendo ser também oligossintomática (Rey, 2010).

As células infectadas, além de liberarem os tripomastigotas para infectar outras células, liberam produtos que ativam enzimas, polipeptídeos, prostaglandinas, citocinas, enfim, diversos mediadores potenciais da inflamação. Estas substâncias podem funcionar como antígenos ou gerar novos antígenos, assim provocando variadas e complexas respostas do sistema imune do hospedeiro. O indivíduo, uma vez infectado, permanece como tal por toda a vida, embora dados clínicos, sorológicos e parasitológicos sugestivos de auto-cura, em humanos, já tenham sido apresentados (Brener et al., 2000).

Após 2 a 4 meses do desaparecimento das manifestações da fase aguda, onde os parasitas tornam-se indetectáveis no sangue periférico, dá-se início à fase crônica, geralmente caracterizada por um longo período de latência, chamada forma indeterminada, que pode durar de 10 a 30 anos ou por toda a vida. Depois desse período, os pacientes infectados podem apresentar manifestações relacionadas ao comprometimento de órgãos tais como coração, esôfago, cólon e sistema nervoso, caracterizando as formas clínicas cardíaca, digestiva e/ou cárdio-digestiva da doença de Chagas (Prata, 2001).

Ainda permanece inexplicável por que diferentes pacientes desenvolvem as formas clínicas cardíaca, digestiva, cárdio-digestiva ou indeterminada. Atualmente, acredita-se que uma das principais causas dessas diferentes manifestações clínicas está diretamente relacionada com a variação genética de *T. cruzi*, não podendo ser descartados, dentro deste panorama, os aspectos ambientais, nutricionais e imunológicos do hospedeiro (Macedo et al., 2004).

Reativações da doença de Chagas foram descritas em pacientes em tratamento com imunossupressores e HIV positivos (Lima, 2001; Oliveira et al., 2010; Campos et al., 2016).

No caso de pacientes com infecção pelo HIV, a reativação da doença de Chagas representa em muitas vezes a primeira infecção oportunística e a meningoencefalite e/ou miocardite são as principais manifestações clínicas (Galhardo et al, 1999).

1.7.1. Aspectos clínicos da doença de Chagas na infecção por via oral

A apresentação clínica da doença de Chagas contraída por transmissão oral é diferente da observada com as formas tradicionais de infecção. Assim, depois de uma latência de 5 dias pós-ingestão, a infecção é caracterizada por manifestações graves, tais como febre prolongada, miocardite aguda, insuficiência cardíaca e, em alguns casos, meningoencefalite. Adicionalmente, já foi relatada a presença de gastrite grave, hemorragia gastrointestinal e diarreia. Essa forma de transmissão apresenta elevada mortalidade, com prognóstico pior quanto menor a idade do paciente (Toso et al., 2011; Rueda et al., 2014).

Em um estudo com 233 pacientes na fase aguda na Amazônia brasileira, constatou-se que 78,5% (183/233) dos pacientes tinham contraído a infecção de surtos causados provavelmente por transmissão oral, cujas manifestações clínicas mais comuns foram: febre (100%), dor de cabeça (92,3%), mialgia (84,1%), palidez (67%), dispneia (58,4%), edema dos

membros inferiores (57,9%), edema (57,5%), dor abdominal (44,2%), miocardite (39,9%) e exantema (27%). Treze pacientes (5,6%) morreram. Dez deles com comprometimento cardiovascular, dois com complicações de origem gastrointestinal e um com causa mal definida (Rueda et al., 2014).

1.8 Diagnóstico laboratorial

São preconizados métodos parasitológicos diretos e/ou métodos sorológicos, dependendo da fase clínica da doença, conforme ilustra a **Figura 7**.

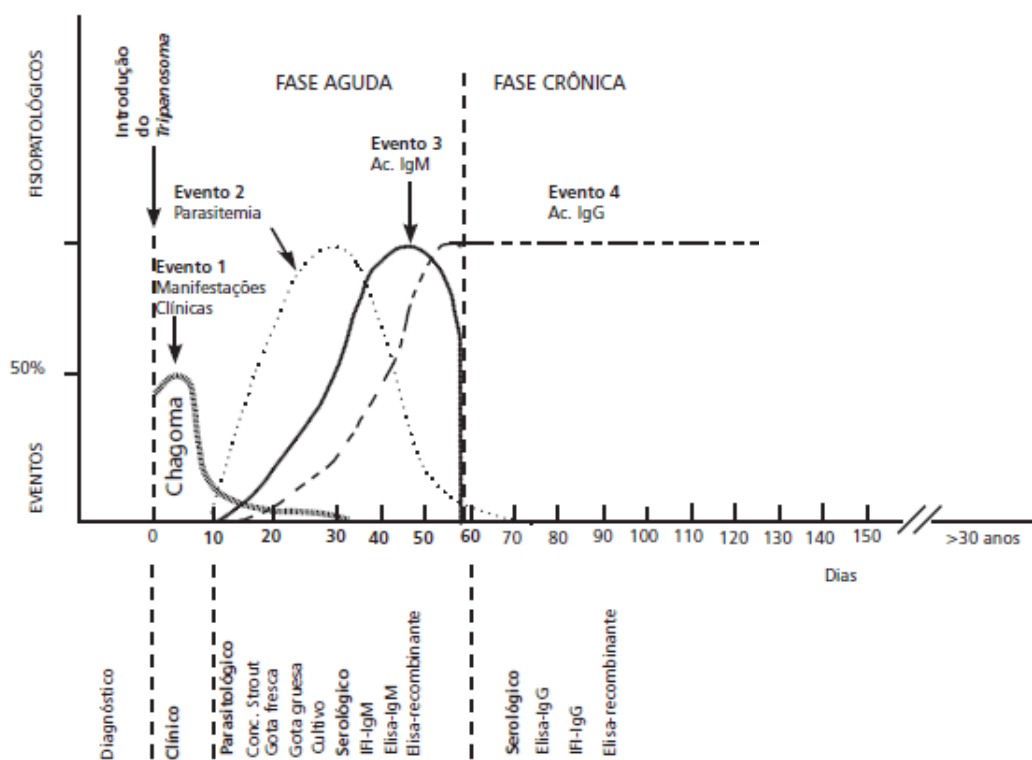


Figura 7: Eventos fisiopatológicos da doença de Chagas. Fonte: Ministério da Saúde, 2014

Na fase aguda, são realizados, portanto, métodos parasitológicos diretos: pesquisa a fresco de tripanossomatídeos, métodos de concentração (Strout, micro-hematócrito e creme leucocitário) e lâmina corada de gota

espessa ou de esfregaço, sendo recomendada a realização simultânea de diferentes exames parasitológicos diretos (Ministério da Saúde, 2014).

O xenodiagnóstico e a hemocultura são métodos muito sensíveis na fase aguda. O xenodiagnóstico pode chegar a 100% de positividade. Estas técnicas não são normalmente indicadas, uma vez que nestes métodos os exames e obtenção dos resultados ocorrem após 30 dias (Neves et al., 2011).

Nas fases indeterminada e crônica da doença, os métodos parasitológicos (de demonstração direta e indireta) apresentam baixa sensibilidade devido à queda da parasitemia. Deste modo, os métodos imunológicos são a principal ferramenta para o diagnóstico da enfermidade. Atualmente são recomendados a hemoaglutinação indireta (HAI), a imunofluorescência indireta (IFI) e o método imunoenzimático (ELISA), sendo que a OMS indica positividade em pelo menos dois testes sorológicos convencionais para diagnóstico da doença (Siqueira-Batista et al., 2007; WHO, 2002; Ministério da Saúde, 2014).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é considerada uma técnica de uso restrito e realizada por centros de pesquisa, devido à ausência de protocolos definidos e procedimentos operacionais padronizados, assim como de *kits* comerciais para uso na rotina da vigilância e por isso não pode ser considerada um método de diagnóstico isolado para confirmação ou descarte de caso de doença de Chagas aguda ou crônica. Tem indicação quando os testes sorológicos apresentarem resultado indeterminado ou para o controle de cura após o tratamento antiparasitário. Assim, deve ser realizada por laboratórios de competência reconhecida, com execução por especialistas na área (Britto, 2009; Ministério da Saúde, 2014).

A análise de custo-efetividade, considerando gastos com material e equipamento, recursos humanos especializados, necessidade de infraestrutura física adequada, e as características da reação (sensibilidade, especificidade, acessibilidade, risco de contaminação e tempo para liberação do resultado final) sugere ainda as seguintes indicações para a PCR, além das acima citadas: em estudos comparativos com novas técnicas

sorológicas ou parasitológicas e na detecção do nível de parasitemia em imunodeprimidos por técnica quantitativa visando intervenção terapêutica ou profilática precoce (Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda, 2003).

1.9 Tratamento

O tratamento da doença de Chagas está limitado ao medicamento Benznidazol. Atualmente este medicamento é produzido por laboratório farmacêutico brasileiro, distribuído por meio de solicitação junto ao Ministério da Saúde do Brasil, não havendo distribuição ao mercado farmacêutico geral (SVS, 2016).

Até o ano de 2017, esta droga não era aprovada pelo FDA - *Food and Drug Administration* e tanto a organização internacional *Drugs for Neglected Diseases initiative* - DNDi como diversos grupos de pesquisadores estão em contínuo desenvolvimento de novas drogas que podem ter um perfil melhor de segurança, cujos testes clínicos estão em andamento (Hotez et al., 2013).

Em agosto de 2017, o FDA concedeu aprovação ao Benznidazol para uso em crianças de 2 a 12 anos de idade com doença de Chagas. O medicamento foi aprovado utilizando a "Via de Aprovação Acelerada", que permite que o FDA aprove medicamentos para condições graves, onde há necessidade médica e ensaios adequados e bem controlados estabelecem que o medicamento prevê um benefício clínico para os pacientes. Entretanto, recomenda estudos mais aprofundados para verificar e descrever os benefícios clínicos do fármaco (FDA, 2017).

Diversos produtos naturais como óleos essenciais, plantas, algas e até peptídeos isolados de secreções de animais, além do reposicionamento de fármacos e novas combinações terapêuticas, têm sido testados para o tratamento da doença de Chagas com resultados promissores contra o parasita (Pinto et al., 2013; Barrosa et al., 2014; Ferreira, 2014; de Á Santos, 2015; Santos et al., 2015; Varela et al., 2016).

Entretanto, apesar dos avanços na identificação destes novos candidatos a fármacos, a proposta terapêutica manteve-se a mesma durante mais de 40 anos e até hoje não existe nenhum tratamento eficaz para os pacientes em fase crônica (Pereira e Navarro, 2013).

A grande variabilidade genética das populações de parasitos, a existência de cepas naturalmente resistentes e a farmacocinética da droga explicam, em parte, diferenças na eficácia do tratamento (Liarte, 2006).

Ressalta-se que o tratamento da infecção via oral é o clássico da forma aguda, cuidando-se adicionalmente de possíveis hemorragias digestivas (Dias e Amato Neto, 2011).

1.10 Surtos de doença de Chagas aguda por via oral

Logo após a descoberta da tripanossomíase, Carlos Chagas e Oswaldo Cruz descreveram o primeiro caso de transmissão oral da doença quando saguis (*Callitrix penicillata*), colocados em jaula juntamente com insetos infectados pelo protozoário, adquiriram a infecção durante a predação. Na ocasião, a hipótese considerada para a contaminação foi a ingestão dos insetos pelos saguis (Dias, 2006).

A transmissão oral da doença de Chagas para seres humanos e outros mamíferos está demonstrada experimental, clínica e epidemiologicamente, significando hoje uma importante via de transmissão, responsável pelo aumento da morbi-mortalidade da forma aguda da doença (Brasil, 2008). Conforme mostra a **Tabela 3** diversos estudos demonstraram experimentalmente a transmissão de *T. cruzi* por via oral.

O primeiro caso de infecção humana pela via oral foi registrado na Argentina por Mazza e colaboradores, em 1936, pela ingestão de leite materno. No mesmo país foram relatados casos de crianças que adoeceram após consumo de remédio caseiro contendo sangue fresco de tatu e de carne crua de animais silvestres (Mazza et al., 1936).

No Brasil, o primeiro surto documentado de doença de Chagas aguda por via oral ocorreu na cidade de Teutônia (RS) no ano de 1965, caracterizado por infecção sistêmica com sintomas múltiplos, tendo sido inclusive confundido com outras doenças tais como febre tifóide e toxoplasmose. O surto acometeu 17 pessoas resultando em 6 óbitos. As análises anátomo-patológicas do músculo cardíaco mostraram a presença de ninhos de *T. cruzi*. Foi concluído que as pessoas envolvidas teriam consumido vegetais contaminados com secreções de marsupiais servidos na Escola Agrícola de Teutônia (Coura, 1966).

Shaw et al. (1969) registraram o segundo surto, ocorrido em Belém (PA) envolvendo 4 pessoas de uma família com quadro clínico típico de fase aguda da doença de Chagas e, após estudos epidemiológicos, sugeriu-se a hipótese de transmissão por alimentos contaminados com fezes de triatomíneos.

Em 1986, em Catolé do Rocha (PB), 26 pacientes apresentaram a forma aguda da doença, simultaneamente, muito semelhante ao que aconteceu em Teutônia. Neste caso, não foi possível explicar a transmissão vetorial e concluiu-se que os pacientes foram infectados por caldo de cana contaminado com fezes de triatomíneos (Shikanai-Yasuda et al., 1991; Toso et al., 2011).

Marcondes et al. (1991) desenvolveram trabalho a respeito deste surto ocorrido em Catolé da Rocha e afirmaram que a baixa densidade de triatomíneos, associada à baixa positividade para homem, indicam ser muito improvável a infecção dos indivíduos acometidos por contaminação por excreções de triatomíneos associadas à picada. Estas informações, associadas a vários fatores epidemiológicos apoiam a hipótese de contaminação oral dos 26 pacientes detectados no surto da Fazenda Aroeira.

Tabela 3: Experimentos realizados para a comprovação da infecção oral por *Trypanosoma cruzi*, por ordem cronológica.

Referência	Descrição
Nathan-Larrier, 1921	Animais de laboratório receberam formas tripomastigotas do parasita por via oral
Brumpt, 1931	Colocou fezes de triatomíneos infectados na mucosa bucal de animais
Dias, 1934	Tatus se alimentaram de <i>Panstrongylus megistus</i> e, posteriormente, a confirmação da transmissão se deu pela observação de gatos que se alimentaram de triatomíneos e roedores infectados
Diaz-Ungria et al., 1968, 1969, 1970 e 1971	Trabalharam com cães, cobaias e roedores, infectando-os por via oral com cepas locais de <i>T. cruzi</i> originadas de triatomíneos naturalmente infectados
Jansen e Deane, 1985	Constataram a infecção de camundongos que ingeriram alimentos contaminados com excrementos do gambá <i>Didelphis marsupialis</i> , ampliando as ações deste marsupial como reservatório e transmissor do <i>T. cruzi</i>
Calvo-Méndez et al., 1994	Camundongos receberam água potável, leite pasteurizado, carne moída crua ou cozida, queijo fresco e arroz cozido contaminados com fezes de <i>Triatoma pallidipennis</i> , concluindo que o leite se apresentou como o meio mais efetivo para a transmissão do <i>T. cruzi</i>
Castanho et al., 2002	Camundongos foram alimentados com caldo de cana contaminado com fezes de <i>Rhodnius neglectus</i> contendo <i>T. cruzi</i>
Yoshida, 2009	Descreveu, através de estudos de infecção experimental por <i>T. cruzi</i> pela via oral, a rota das formas tripomastigotas metacíclicas inoculadas oralmente, que escapam da ação do suco gástrico protegendo-se na camada de mucina e atravessando a mucosa gástrica
Barbosa, 2010	Demonstrou a capacidade de <i>T. cruzi</i> para sobreviver na polpa de açaí por diferentes períodos de incubação e sob diversos tratamentos térmicos, além de preservar a sua virulência em camundongos

A partir de 1996, assume-se mais expressamente a transmissão da doença de Chagas por via oral devido a mais um surto envolvendo 15 casos de indígenas com doença aguda na cidade de Mazagão (AP). Naquela ocasião, já havia evidências suficientes sobre a resistência de parasitas à acidez do estômago, a possibilidade de transmissão oral em animais, bem como em humanos (Toso et al., 2011).

Em março de 2005, um surto registrado numa área turística do estado de Santa Catarina, decorrente do consumo de caldo de cana produzido em diversos estabelecimentos ao longo de uma estrada, concitou a atenção internacional como consequência de ter apresentado 167 casos suspeitos, 25 casos confirmados e 3 óbitos (PANAFTOSA, 2006).

Em um levantamento realizado pelo SINAN, nas regiões do Brasil no período de 2007 a 2014 foram notificados 1.349 casos de doença aguda de Chagas. A forma de transmissão oral foi a mais frequente, com um total de 871 casos (65%) no referido período, conforme mostrado na **Tabela 4**.

A região Norte do Brasil é que apresenta a maior parte dos casos de transmissão por via oral com quase 99% dos casos. No Estado do Pará ocorreram 684 casos (80%), seguido pelo Estado do Amapá (95 casos - 11%). A região Nordeste apresentou apenas 1% dos casos e todos ocorreram no Estado do Maranhão, enquanto que a região Sul notificou apenas 1 caso (0,1%) no Estado do Rio Grande do Sul. No entanto, vale ressaltar que mais de 25% dos casos foram encerrados com a forma de transmissão ignorada ou sem preenchimento deste campo na ficha de notificação (SINAN, 2016).

Comumente, em sua maioria, os surtos são relacionados ao consumo de vegetais e sucos de frutas contaminados, entre eles: açai, bacaba, jaci (coquinho), caldo de cana, vinho de palma, suco de laranja, suco de goiaba, conforme dados apresentados de forma bastante clara e objetiva em uma revisão realizada por Rueda et al. (2014).

Tabela 4 - Casos confirmados de doença de Chagas aguda notificados no SINAN, Brasil, por Região/UF de notificação e modo provável de infecção, período 2007 a 2014. Fonte: SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2016.

Região/UF de notificação	Ign/Branco	Transfusional	Vetorial	Vertical	Acidental	Oral	Outro	Total
Região								
Norte	304	1	97	2	1	859	2	1266
Rondônia	-	-	2	-	-	-	1	3
Acre	-	-	8	-	-	1	-	9
Amazonas	7	-	18	-	1	57	-	83
Roraima	1	-	-	-	-	-	-	1
Pará	282	-	65	2	-	684	1	1034
Amapá	10	1	2	-	-	95	-	108
Tocantins	4	-	2	-	-	22	-	28
Região								
Nordeste	22	-	13	-	1	11	-	47
Maranhão	4	-	8	-	1	11	-	24
Piauí	2	-	2	-	-	-	-	4
Ceará	-	-	1	-	-	-	-	1
Paraíba	-	-	1	-	-	-	-	1
Pernambuco	15	-	-	-	-	-	-	15
Sergipe	1	-	1	-	-	-	-	2
Região								
Sudeste	-	-	1	2	-	-	2	5
Espírito Santo	-	-	-	-	-	-	1	1
Rio de Janeiro	-	-	1	-	-	-	-	1
São Paulo	-	-	-	2	-	-	1	3
Região Sul								
Rio Grande do Sul	-	-	-	2	-	1	1	4
Região								
Centro-Oeste	14	-	12	1	-	-	-	27
Mato Grosso do Sul	-	-	1	-	-	-	-	1
Mato Grosso	1	-	-	-	-	-	-	1
Goiás	13	-	11	-	-	-	-	24
Distrito Federal	-	-	-	1	-	-	-	1
Total	340	1	123	7	2	871	5	1349

Nóbrega et al. (2009) em estudos de coorte e casos-controle analisaram a exposição alimentar de pacientes com doença de Chagas aguda e verificaram que os seguintes alimentos poderiam estar envolvidos na veiculação do parasita: polpa e suco de açaí, charque e sucos de cupuaçu, biribá e muruci.

Para os surtos relacionados a consumo de sucos de frutas foi proposto que os insetos infectados, que habitam a copa das árvores, poderiam ser transportados a partir da área de colheita das frutas para as máquinas de extração de suco. Os triatomíneos infectados seriam, então, esmagados nas máquinas de extração de suco, devido a uma falta de cuidados sanitários durante a preparação, levando à contaminação e aos casos de doença de Chagas aguda (Xavier et al., 2014).

A infecção dos alimentos à base de vegetais *in natura* com *T. cruzi* é, portanto, acidental e pode ocorrer durante a colheita, armazenamento, transporte ou até mesmo na etapa de preparação (ANVISA, 2008).

Um fato curioso é a sazonalidade desses casos de doença de Chagas aguda transmitidas oralmente, conforme mostrado na **Tabela 5**. A maioria dos casos coincide com a colheita do açaí de agosto a novembro, quando os índices pluviométricos são mais baixos. Esta característica sugere que há uma relação direta entre a incidência da doença e o consumo da fruta indevidamente manipulada (Xavier et al., 2014; SINAN, 2016).

Além de casos no Brasil, surtos de transmissão oral da doença de Chagas têm sido relatados também em outros países da América Latina (Amunárriz et al., 1991; Rodriguez et al., 1992; Aguilar e Yépez, 1995; Cáceres et al., 1999; Nicholls et al., 2007a; Nicholls et al., 2007b; Alarcón de Noya et al., 2010; Zambrano et al., 2010; Muñoz-Calderon et al., 2013; Ramirez et al., 2013; Segovia et al., 2013).

Tabela 5: Casos confirmados por modo de infecção, segundo mês dos primeiros sintomas. Brasil, 2007 a 2014. Fonte: SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2016.

Mês dos primeiros sintomas	Ign/Branco	Transfusional	Vetorial	Vertical	Acidental	Oral	Outro	Total
TOTAL	340	1	123	7	2	871	5	1.349
Janeiro	30	-	3	-	-	22	-	55
Fevereiro	15	-	11	-	-	31	1	58
Março	14	-	2	2	-	22	-	40
Abril	11	-	8	2	-	37	-	58
Maiο	14	-	8	-	1	16	1	40
Junho	14	-	11	-	-	19	-	44
Julho	24	-	10	1	-	64	-	99
Agosto	36	-	14	-	-	128	-	178
Setembro	46	-	14	2	-	164	1	227
Outubro	51	1	20	-	1	173	1	247
Novembro	47	-	12	-	-	121	1	180
Dezembro	38	-	10	-	-	74	1	123

De acordo com a revisão realizada por Rueda et al. (2014), até o ano da publicação, o Brasil registrava o maior número de casos por infecção oral, seguido da Venezuela com 199, Colômbia com 49 casos confirmados e 31 casos suspeitos, Bolívia com 14, Guiana Francesa com 9 e Argentina com 2.

Além dos casos por consumo de vegetais, há também o relato de surtos ocorridos pelo consumo de carne de animais ou seus derivados, conforme descrito na revisão realizada por Sangenis et al. (2016).

Dessa forma, as seguintes possibilidades devem ser aventadas em relação ao mecanismo de transmissão oral na doença de Chagas: 1) ingestão de leite materno, de mãe infectada (o parasita pode vir da própria glândula ou contaminar o leite em casos de sangramento mamilar); 2) ingestão de sangue de mamífero infectado; 3) ingestão de carne mal cozida de mamífero infectado, especialmente reservatórios silvestres; 4) ingestão de suspensão de *T. cruzi* em pipetas (acidente de laboratório); 5) ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com fezes ou urina de triatomíneos infectados por *T. cruzi*; 6) ingestão de alimentos ou bebidas contaminados

com urina ou secreção perianal de marsupiais infectados por *T. cruzi* (Dias e Amato Neto, 2011).

A vigilância epidemiológica tem detectado esses casos de transmissão oral, principalmente na região Norte do país, o que indica a necessidade de estratégias de vigilância e controle do agravo, compatíveis com o padrão epidemiológico atual (SVS, 2015).

O documento *Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites* da *Food and Agriculture Organization / Organização Mundial da Saúde* incluiu *T. cruzi* como um parasita de origem alimentar. Para a elaboração deste documento, foi realizada uma classificação relacionada à importância de diferentes parasitas de transmissão alimentar a partir de uma perspectiva global, utilizando critérios epidemiológicos, clínicos e socioeconômicos. Utilizando esta estratégia, uma lista de 93 parasitas com potencial de transmissão por alimentos foi reduzida para uma lista de 24 e neste ranking, *T. cruzi* está classificado em 10º lugar, indicando a gravidade da doença de Chagas transmitida pelos alimentos, particularmente porque os nove parasitas que se classificam acima de *T. cruzi* têm uma distribuição global consideravelmente mais ampla como parasitas de transmissão hídrica e alimentar (**Figura 8**) (FAO/WHO, 2014; Rueda et al., 2014; Alarcon de Noya et al., 2015).

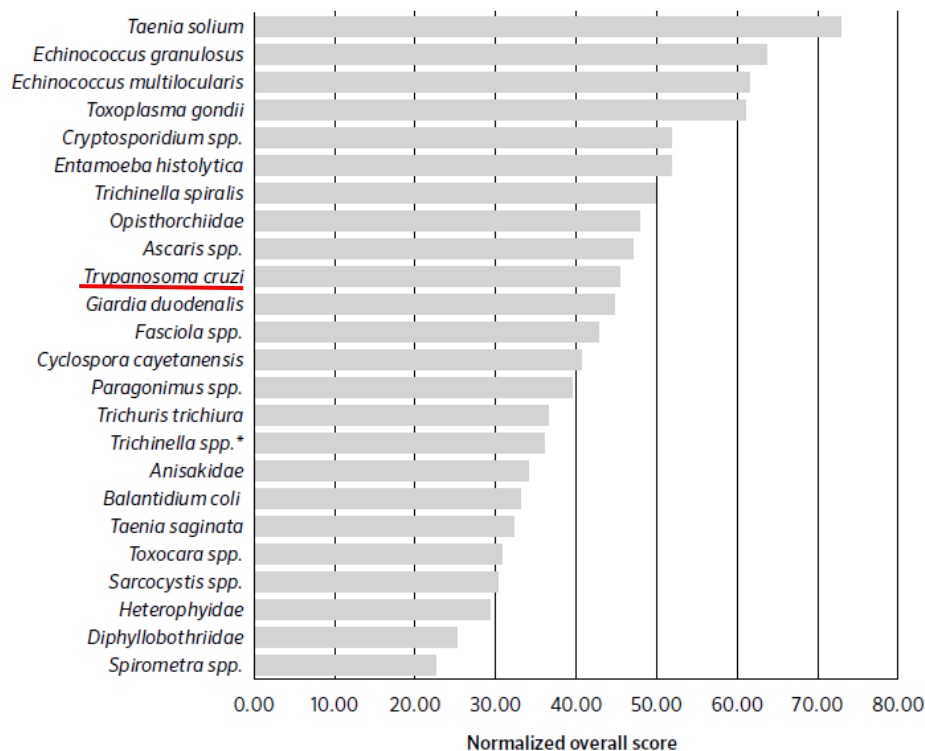


Figura 8 - Ranking global de parasitas de veiculação hídrica e alimentar. Fonte: FAO/WHO, 2014

1.11 Açaí

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira perene, tropical e frutífera que ocorre naturalmente nas várzeas da Amazônia. Tem predomínio no Estuário amazônico, alcança de 15 a 20 m de altura e 12 a 18 cm de diâmetro. Prefere os terrenos alagados e áreas úmidas, de ocorrência mais frequente às margens dos rios. Destaca-se, mundialmente, pela polpa extraída dos frutos, além de seus inúmeros subprodutos, energéticos, cosméticos, fitoterápicos entre outros, como também pela produção de palmito (Tomaz et al., 2013).

Existem dois períodos de produção de açaí que se caracterizam por produzirem frutos de qualidades diferentes. A safra de inverno é aquela cujo período é o primeiro semestre do ano (estação das chuvas), época em que os cachos apresentam frutos de maturação não uniforme, além de produzir

um açaí com paladar diferente do normal. Já a safra de verão (estação mais seca) é aquela cuja produção gira em torno do segundo semestre e se caracteriza por apresentar frutos com maturação uniforme e de melhor paladar. É quando a bebida se apresenta com melhor qualidade e rendimento (Fregonesi et al., 2010).

O fruto possui elevado teor de pigmentos, as antocianinas, que são benéficos à saúde, além de ser rico em proteínas, fibras, lipídios, vitamina E e minerais como manganês, cobre, boro e cromo. As antocianinas tornaram-se conhecidas por suas diversas propriedades farmacológicas e propriedades medicinais, incluindo anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana, prevenindo a oxidação de proteínas de baixa densidade (LDL), enfermidades cardiovasculares e doenças neurológicas (Kuskoski et al., 2002; Alexandre et al., 2004; Alasalvar et al., 2005).

O grande interesse comercial pelo açaí deve-se às suas perspectivas de aplicação nas indústrias alimentícias, aliada à grande quantidade existente na região Amazônica e à relativa facilidade de extração. Nessa região, existe um grande número de famílias que sobrevivem dessa palmeira, utilizada não só como alimento, mas como principal fonte de renda. Há, no entanto, um receio generalizado de que uma exploração desordenada acabe por dizimar os açazeiros (Miranda et al., 2012).

Em pesquisa, desenvolvida por Menezes et al. (2015), a respeito da opinião de consumidores brasileiros e norte-americanos sobre açaí, observou-se que os brasileiros concordam que o açaí é um alimento energético, calórico, natural e nutritivo. Já os norte-americanos consideraram o açaí um alimento natural e, principalmente, rico em antioxidantes. Certas diferenças de opiniões merecem destaque como aquelas em que os brasileiros consideram o açaí um alimento que engorda, rico em ferro e gorduroso, diferente dos norte-americanos. Além disso, os brasileiros parecem não ter o conhecimento que o açaí é rico em antioxidantes, não consideram o açaí um alimento caro, enquanto que o oposto foi observado pelos americanos.

Na região Norte do país a comercialização e consumo de suco de açaí são realizados imediatamente após o seu processamento, sem qualquer tratamento térmico (Ferreira et al., 2014).

A forma de consumo do açaí na região amazônica difere da dos demais estados brasileiros. Na cidade de Belém do Pará, por exemplo, ele é comercializado diariamente *in natura*, sem qualquer tratamento térmico. Ressalta-se que essa forma de consumo ocorre também em outras cidades da região Norte. Nas demais regiões, o açaí é comumente consumido na forma de polpa pasteurizada e congelada, sobretudo entre os esportistas, por ser considerado uma bebida energética e, na maior parte das vezes, acrescido de xarope de guaraná e/ou frutas, cereais e carboidratos de assimilação rápida para compensar sua deficiência em açúcares simples (Oliveira et al., 2002; Doradio et al., 2004; Monteiro, 2006).

A comercialização do açaí sofre restrições, por conta da alta perecibilidade do seu suco, que não resiste mais do que 72 horas, mesmo em ambiente refrigerado. Além do mais, como toda fruta tropical, o açaí torna-se escasso no mercado durante a entressafra. O tempo transcorrido entre a colheita e o beneficiamento do açaí – máximo de 12 horas depois de colhido – é crucial para garantir a qualidade do produto final. Da mesma forma, a segurança microbiológica é condição de oferta de um alimento saudável ao consumidor. Dessa forma, a comercialização do produto congelado torna-se necessária (Bezerra, 2007).

O fator responsável por esta alta perecibilidade é a elevada carga microbiana, juntamente com a degradação enzimática, responsáveis pelas alterações de cor e aparecimento do sabor azedo (Queiroz et al., 1998; Sousa et al., 1999).

Sousa et al. (2006) realizaram uma pesquisa sobre vida de prateleira de polpa de açaí e os resultados mostraram que, no decorrer do período estudado, que foi de 120 dias, houve alteração dos parâmetros físico-químicos de pH, acidez e sólidos solúveis, além de aumento da carga microbiana.

Corroborando com estes dados, Neves et al. (2015) em trabalho sobre a perecibilidade de polpa de açaí, armazenada sob refrigeração pelo período de 5 dias, revelaram que houve redução dos valores de pH e acidez titulável. Assim, considerando a influência do pH e da acidez na conservação dos alimentos, verifica-se a maior probabilidade de contaminação deste alimento por bactérias, bolores e leveduras, conforme o seu tempo de armazenamento.

Outro fator que interfere na qualidade das polpas de açaí está relacionado com o ataque por pragas, desde a fase de sementeira até o plantio adulto, o que vem causando muitos prejuízos às plantações. Além das pragas no campo, as polpas de açaí também estão sujeitas às contaminações por matérias estranhas durante as etapas do processamento do fruto. A presença de insetos e seus fragmentos, ácaros, ovos e larvas, como também areia, terra, partículas carbonizadas, entre outras, no produto final indica falhas na adoção e/ou manutenção das Boas Práticas de Fabricação (Brasil, 1997; Fregonesi et al., 2010).

Num projeto de pesquisa epidemiológica realizado em Abaetetuba, Cametá e Breves (PA) realizado por Valente et al. entre 2000 e 2003 foi feito o seguimento do açaí em caroços desde a coleta em localidades da ilha do Marajó (Ilha de Caruá e Muaná) e do Baixo Tocantins (Limoeiro do Ajuru, Carapajó e Ilha Patrimônio), até a chegada nos pontos de extração da polpa e revenda. Foram utilizadas armadilhas luminosas em barcos e examinados recipientes com os frutos nos barcos e feiras livres e revendedores por amostragem aleatória (Valente et al., 2006).

Nos resultados preliminares, 12 triatomíneos, 6 *R. pictipes*, 2 *R. robustus* e 4 *P. geniculatus* foram coletados no convés de barcos que atracavam próximo de ilhas, atraídos pelas armadilhas de luz, e 41,66% (5/12) apresentaram formas de *T. cruzi* nas fezes, após exame do conteúdo intestinal. Um exemplar de *P. geniculatus*, já morto foi encontrado em um panelo com frutos procedente da Ilha Curuá e que chegaram para revenda num porto da cidade de Abaetetuba. De alguma maneira, este inseto atraído pela luz dos barcos, que muitas vezes atracam em portos próximo das

matas, caiu dentro dos paneiros e morreu prensado entre os caroços. O inseto, mesmo morto, após dessecação apresentava ainda no conteúdo intestinal formas de *T. cruzi* perfeitamente viáveis (Valente et al, 2006).

Neste contexto, a pesquisa de matérias estranhas é de grande valia como indicador da contaminação de amostras de polpa de açaí por insetos, auxiliando inclusive na elucidação dos casos de doença de Chagas aguda por contaminação oral.

1.12 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), gramínea originária do Sudeste Asiático, é considerada uma das culturas agrícolas mais importantes das regiões tropicais e subtropicais, para a obtenção de açúcar, álcool e aguardente (Cardoso et al., 2007).

Em vários países, e principalmente no Brasil, o caldo de cana *in natura* é utilizado como refresco denominado em algumas regiões como garapa de cana. Este alimento consumido gelado ou a temperatura ambiente, é produzido através de moendas, para ser consumido imediatamente, não podendo ser armazenado porque é muito susceptível a alterações enzimáticas que proporcionam alterações sensoriais significativas e indesejáveis (Machado et al., 2013).

O Brasil apresenta grande disponibilidade de cana-de-açúcar, caracterizando essa cultura como grande geradora de empregos. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento, a previsão de área plantada de cana-de-açúcar é de 8.973 mil hectares para o biênio 2016/2017, tendo havido um crescimento de pouco mais de 10% no período de 6 anos. Na previsão do biênio 2016/2017 a safra será de 684.774 mil toneladas deste produto, sendo a região Sudeste a maior produtora com 451.278 mil toneladas (CONAB, 2016).

O comércio da venda de caldo de cana é realizado comumente por vendedores ambulantes que não possuem instalações compatíveis e

conhecimentos adequados sobre cuidados de higiene na preparação da bebida, e a sua comercialização nas ruas representa um risco potencial para a saúde do consumidor (Soccol et al., 1990; Cardoso et al., 2007; Carvalho et al., 2007).

A cana-de-açúcar reúne condições nutricionais adequadas à multiplicação de microrganismos, devido as suas características de baixo pH e altos teores de açúcares, interferindo na sua qualidade e segurança para o consumidor (Prado et al., 2010).

Além disso, da mesma forma que a polpa de açaí e outros produtos à base de vegetais, a cana-de-açúcar esta suscetível à contaminação por insetos e outras matérias estranhas durante seu processo de colheita, armazenamento e processamento do caldo de cana. Dessa forma, a pesquisa de matérias estranhas, realizada através da análise microscópica, fornece informações relevantes a respeito das condições sanitárias da matéria-prima, da manipulação, do ambiente, dos equipamentos e utensílios e da higiene no processamento da bebida, sendo, portanto, fundamental como indicador da presença de insetos e análise auxiliar para o esclarecimento de surtos de doença de Chagas aguda por transmissão oral.

1.13 Legislações e controle sanitário dos alimentos

A partir do ano 2000, com o aumento do número de casos de doença aguda de Chagas por provável transmissão oral, foram publicadas no Brasil, diversas legislações e documentos para o controle de qualidade dos produtos de frutas, visando minimizar todo e qualquer risco da ocorrência de doenças transmitidas por alimentos.

No ano 2000 foi aprovado pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento o regulamento técnico para fixação dos padrões de Identidade e Qualidade para polpa de frutas, dentre as quais se encontra a polpa de açaí, através da Instrução Normativa nº 1, de 07/01/2000. Esta norma traz algumas definições e parâmetros de qualidade para polpa de

açaí, bem como preconiza que a polpa de fruta não deverá conter terra, sujidade, parasitas, fragmentos de insetos e pedaços das partes não comestíveis da fruta e da planta (Brasil, 2000).

Em decorrência do grande surto ocorrido em 2005, em Santa Catarina, o Ministério da Saúde publicou o “Consenso Brasileiro em doença de Chagas” com o objetivo de padronizar as estratégias de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle da doença de Chagas. Este documento foi atualizado e publicada uma nova versão no ano de 2016, como II Consenso Brasileiro em doença de Chagas (SVS, 2005; SVS, 2016).

Neste mesmo ano, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC nº 218 de 29/07/2005, estabeleceu o regulamento técnico de procedimentos higiênico-sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais. Tal norma enfatiza diversas vezes a importância das boas práticas de produção como ferramenta para evitar a contaminação por insetos vetores (ANVISA, 2005; Ferreira et al., 2014).

No ano de 2006, foi apresentado um Relatório Técnico em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos, que resultou em algumas recomendações como a definição de casos suspeitos, prováveis e confirmados de transmissão oral e a necessidade de fomento à pesquisa básica e aplicada, para obtenção de conhecimentos que ajudem a compreensão do fenômeno de transmissão oral de *T. cruzi* e, conseqüentemente, a sua melhor interpretação epidemiológica e de prevenção/controle tais como técnicas de detecção do *T. cruzi*, em alimentos, dentre outras (PANAFTOSA, 2006).

A ANVISA, em 2008, elaborou o Informe Técnico nº 35 sobre o gerenciamento do risco sanitário na transmissão de doença de Chagas aguda por alimentos e recomendou à comunidade científica uma série de temas que necessitavam ser pesquisados, tais como: viabilidade, técnicas de detecção e de inativação e formas de contaminação de *T. cruzi* nos alimentos, bem como o desenvolvimento de medidas de controle por meio

de investigações epidemiológicas consistentes. No que se refere às ações de vigilância sanitária, foi criado um plano de ação para melhoria da qualidade higiênico-sanitária do açaí e a urgência de cada ação. O documento traz, ainda, diversas recomendações aos processadores de açaí (ANVISA, 2008).

Em 2009, a OPAS elaborou o “Guia de vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos”, destinado àqueles gestores e trabalhadores da saúde que exercem suas atividades em regiões onde o acesso à informação é difícil, reduzindo a possibilidade de troca de experiência com outros parceiros, principalmente com a população e que vem enfrentando uma demanda crescente de casos suspeitos deste agravo, em particular na região amazônica (OPAS, 2009).

No Estado do Pará, foi criado, no ano de 2011, o Programa Estadual da Qualidade do Açaí (PEQA), objeto do Decreto Estadual nº 2.475/2010. No Programa, está em curso a capacitação de batedores de açaí em boas práticas alimentares, de acordo com as normas do Programa Alimento Seguro (PAS) (Pará, 2010).

Também publicado pelo governo do Estado do Pará, o Decreto nº 326, de 20/01/2012, estabelece regras para cadastramento dos batedores artesanais de açaí, objetivando o conhecimento real do número de estabelecimentos que manipulam artesanalmente o açaí no Estado do Pará. Além disso, estabelece requisitos higiênico-sanitários para a manipulação de açaí por batedores artesanais, de forma a prevenir surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), minimizando o risco sanitário (Pará, 2012).

Relacionado com a presença de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, a norma atualmente em vigor no Brasil, é a Resolução nº 14, de 28/03/2014, da ANVISA, que estabelece limites quantitativos para fragmentos de insetos e outras sujidades em alguns grupos de alimentos. Os alimentos que não apresentam limites previstos no Anexo I de tal norma, serão considerados em desacordo com a

legislação caso seja constatada a presença de matérias estranhas, que é o caso dos sucos de frutas, como polpa de açaí e caldo de cana (ANVISA, 2014).

Além disso, esta regulamentação também define parasitas (helmintos e protozoários, em qualquer fase de desenvolvimento, associados a agravos a saúde humana) como matérias estranhas indicativas de riscos à saúde humana (ANVISA, 2014).

Percebe-se, portanto, que há um grande amparo legal para que seja feito um controle rígido da qualidade dos alimentos que possam ser relacionados aos surtos de doença de Chagas por via oral.

1.14 Justificativa

O Informe Técnico nº 35, da ANVISA, propõe à comunidade científica que se pesquise: i. a viabilidade de *T. cruzi* em diferentes alimentos, considerando fatores intrínsecos e extrínsecos; ii. técnicas de detecção e de inativação de *T. cruzi* em alimentos; iii. a integração das instituições de pesquisa no desenvolvimento das técnicas de contagem, viabilidade e inativação do *T. cruzi* em alimentos (ANVISA, 2008). Aliada a esta Norma e ao exposto nesta introdução, este estudo se justifica pela necessidade da padronização de métodos laboratoriais para a pesquisa de *T. cruzi* em alimentos infectados, colaborando para o esclarecimento dos surtos de doença de Chagas aguda por transmissão oral.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

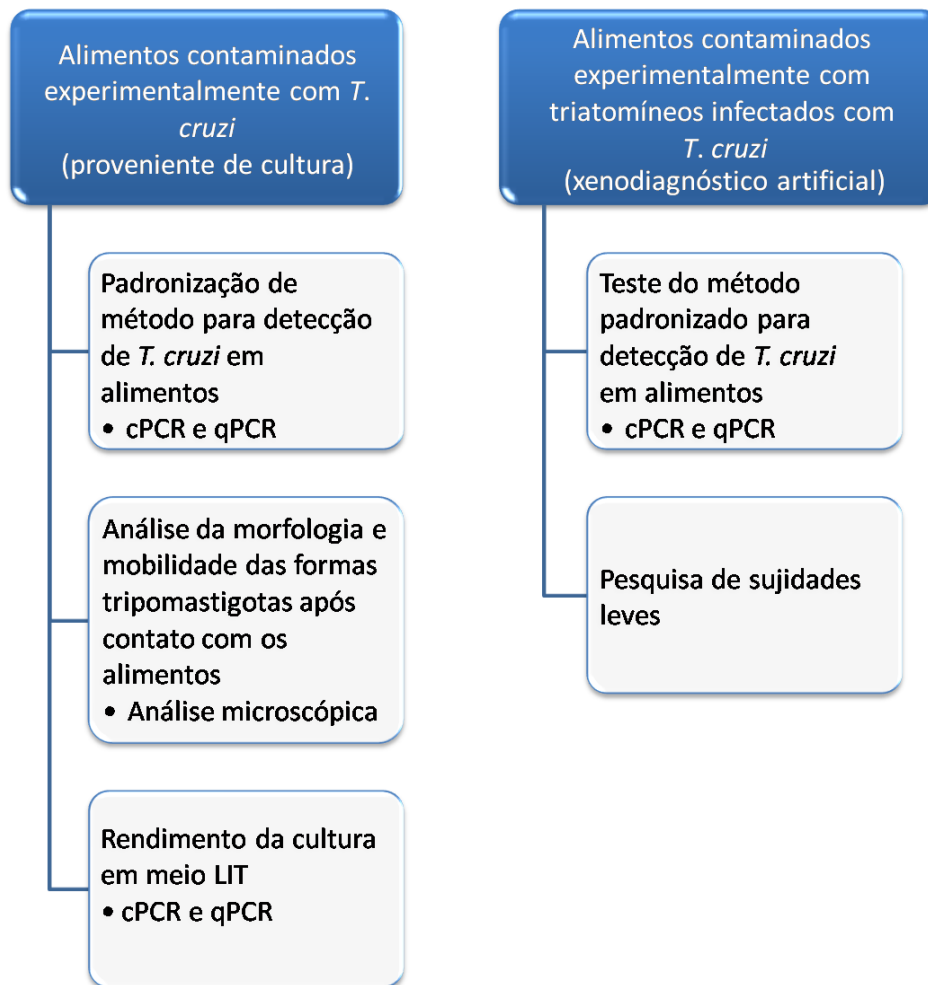
Padronizar um método laboratorial para detecção de *T. cruzi* em alimentos.

2.2 Específicos

1. Padronizar a PCR convencional e a PCR em tempo real para a determinação de *T. cruzi* em polpa de açaí e caldo de cana;
2. Avaliar o rendimento da cultura dos alimentos contaminados com *T. cruzi* em meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) a fim de aumentar a carga parasitária, melhorando a detecção do parasita pela PCR;
3. Analisar a morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com polpa de açaí e caldo de cana a fim de determinar o tempo ideal para realizar as análises em alimentos contaminados;
4. Contaminar amostras de polpa de açaí e caldo de cana com triatomíneos infectados a fim de testar os métodos moleculares padronizados para a detecção de *T. cruzi*; e
5. Caracterizar os fragmentos de triatomíneos recuperados de amostras de polpa de açaí e caldo de cana contaminadas, após procedimentos para pesquisa de matérias estranhas e compará-los com fragmentos de coleópteros.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental



3.2 Obtenção e manutenção de *T. cruzi*

A cepa de *T. cruzi* utilizada nos experimentos foi proveniente de duas fontes: cultura de células e fezes de triatomíneos infectados por xenodiagnóstico artificial.

As contaminações de polpa de açaí e caldo de cana, para padronização dos métodos de extração de DNA, métodos moleculares, testes de cultura em LIT e análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com os alimentos foram realizadas com tripomastigotas da cepa Y do parasita mantidas por passagens seriadas em culturas de células LLC/MK₂. Estas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em garrafas de 75 cm³ (Corning®) contendo 10 mL de meio RPMI (Meio *Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco®) contendo 292 mg/L de L-glutamina, 110 mg/L de piruvato de sódio, 1,0 g/L de glicose, 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, 100.000 U/L de penicilina, 133 mg/L de estreptomicina complementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab®). Após a formação da monocamada de células por volta de 48 horas de incubação, as garrafas foram infectadas com 1×10^7 tripomastigotas provenientes de camundongos ou de outra garrafa infectada. Após 48 horas de incubação o sobrenadante foi coletado de cada garrafa contendo os parasitas e realizada a contagem dos mesmos em câmara de Neubauer para obtenção das concentrações desejadas.

Os tripomastigotas de *T. cruzi* para realização do xenodiagnóstico artificial foram provenientes de camundongos machos da linhagem Swiss com idade entre 25 e 30 dias, mantidos no Laboratório de Doença de Chagas Elias Boainain do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, infectados por inóculos intraperitoneais com 1×10^5 tripomastigotas/animal. Após 7 dias da infecção os animais foram eutanasiados em câmara de gás CO₂ e o sangue infectado coletado por punção cardíaca em tubo contendo citrato.

3.3 Xenodiagnóstico artificial

O xenodiagnóstico artificial foi realizado no Laboratório de Doença de Chagas Elias Boainain do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, de

acordo com Araújo-Jorge e Castro (2000), com adaptações conforme descrição abaixo.

Separaram-se trinta ninfas de triatomíneos de 3º estágio (*Triatoma infestans*), mantidas no Laboratório de Doença de Chagas Elias Boainain do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, e as mesmas mantiveram jejum por três semanas.

Foram colocados 10 triatomíneos em cada recipiente plástico cilíndrico, de aproximadamente 4 cm de altura por 5 cm de diâmetro, coberto por uma tela de filó presa à abertura superior do frasco.

O sangue citratado, colhido por punção cardíaca de cada camundongo infectado uma semana antes com 100.000 formas da cepa Y de *T. cruzi*, foi alojado em recipientes com 3,5 cm de diâmetro e 1 cm de altura (tipo placa de petri) e vedados com filme de parafina plástica (Parafilm®). Estes recipientes contendo o sangue contaminado, foram colocados sob a tela de filó e acondicionados em estufa de 37°C por 1 dia (**Figura 9**).



Figura 9 - Xenodiagnóstico artificial. Ninfas de 3º estágio de *Triatoma infestans*.

Verificou-se o número de ninfas que se alimentaram em cada recipiente e as mesmas foram transferidas para cristalizadores, desprezando

aquelas que não ingeriram sangue. Considerou-se como ninfas alimentadas somente aquelas que, através da observação, apresentaram abdômen distendido, independente da intensidade (**Figura 10**).



Figura 10 - Ninfa alimentada, com detalhe para o abdômen distendido.

A leitura do xenodiagnóstico foi realizada 30 dias após a alimentação, através da obtenção de fezes dos triatomíneos por compressão abdominal com auxílio de pinças (**Figura 11**). As fezes foram depositadas sobre uma lâmina, à qual acrescentou-se 5 µl de salina tamponada, pH 7,2, e cobriu-se com lamínula 22 x 22 mm. Observou-se individualmente as fezes obtidas de cada triatomíneo. A leitura foi realizada ao microscópio óptico binocular em aumento de 400x, percorrendo todos os campos em busca de formas evolutivas de *T. cruzi*. Apenas os triatomíneos com xenodiagnóstico positivo para *T. cruzi* foram mantidos para o experimento.

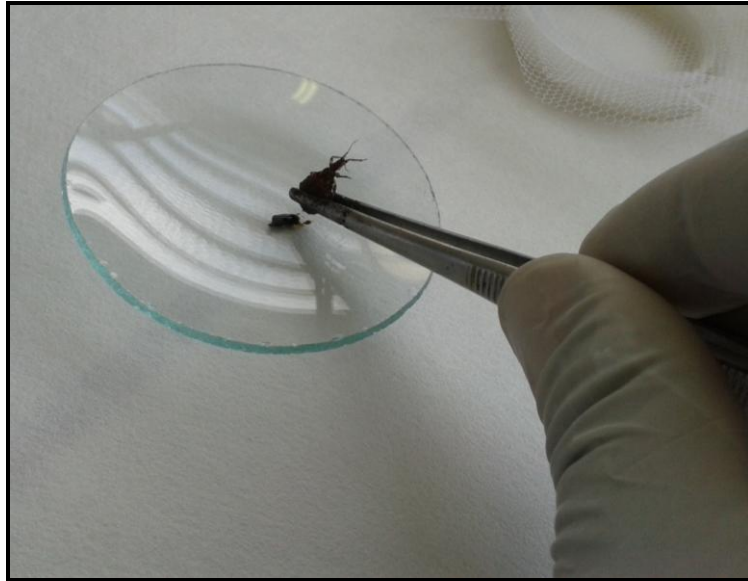


Figura 11 - Procedimento para liberação das fezes dos triatomíneos para verificação da presença de parasitas.

3.4 Amostras de alimentos

3.4.1 Polpas de açaí

Os experimentos foram realizados com amostras de polpa de açaí *in natura* provenientes de diversos estabelecimentos comerciais da cidade de Belém (PA), caracterizadas como açaí fino ou popular (tipo C) por apresentar aparência pouco densa. Um total de 40 embalagens contendo cerca de 50 g cada mantidas à temperatura 4°C foram encaminhadas para o Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz. Após o recebimento, as embalagens foram mantidas à -20°C até o momento de uso. Para cada experimento foi utilizado todo o conteúdo da embalagem.

3.4.2 Caldo de cana

As amostras de caldo de cana utilizadas nos experimentos foram provenientes de diversas feiras livres da cidade de Santo André (SP). Para a execução das análises foram adquiridas garrafas contendo 500 mL cada, mantidas à temperatura 4°C, e as amostras foram utilizadas para os experimentos no mesmo dia de sua aquisição. Para cada experimento foram utilizadas 50 g de caldo de cana.

3.5 Insetos

3.5.1 Triatomíneos

Para testar o método padronizado para detecção de *T. cruzi* em alimentos e realizar as técnicas para pesquisa de sujidades leves, objetivando caracterizar os fragmentos de triatomíneos, foram utilizadas 4 ninfas de triatomíneos de 3º estágio (*Triatoma infestans*), mantidas no Laboratório de Doença de Chagas Elias Boainain do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, sendo que foram adicionados 2 insetos às alíquotas de cada alimento (polpa de açaí e caldo de cana) para a contaminação experimental.

3.5.2 Coleópteros

Com a finalidade de comparar os fragmentos de triatomíneos recuperados das amostras de alimentos contaminados com fragmentos de insetos de campo, normalmente encontrados em produtos alimentícios, insetos da ordem Coleoptera foram utilizados para contaminação experimental de amostras de polpa de açaí e caldo de cana e posterior realização das técnicas para pesquisa de sujidades leves.

Os coleópteros utilizados no presente trabalho foram provenientes de amostras de massas alimentícias infestadas, de análises anteriores realizadas no Instituto Adolfo Lutz - Centro de Laboratório Regional de Santo André, identificados como *Sitophilus* sp e *Tribolium* sp. Ambos apresentam coloração castanha, tamanho entre 2,5 mm a 4 mm, élitros com sulcos longitudinais bem nítidos e inúmeras pontuações.

3.6 Contaminação dos alimentos por *T. cruzi*

Com objetivo de padronizar os métodos moleculares (cPCR e qPCR) e determinar o limite de detecção do método foram pesadas em béquer 5 alíquotas de 50 g da polpa de açaí e caldo de cana e, imediatamente contaminadas com as seguintes concentrações: 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 e 1×10^2 , 1×10^1 tripomastigotas, previamente contados em câmara de Neubauer.

Após a contaminação experimental com as diferentes concentrações de tripomastigotas, cada alíquota de alimento foi centrifugado a $2000 \times g$ por 5 minutos e alíquotas de 500 μL do sobrenadante e sedimento foram separadas para extração de DNA e PCR.

3.7 Métodos Moleculares

3.7.1 Extração de DNA

As extrações de DNA das amostras de polpa açaí e caldo de cana contaminadas foram testadas utilizando-se dois kits: QIAamp® DNA Mini Kit e QIAamp® DNA Stool Mini Kit, ambos da Qiagen®.

Para testar o kit QIAamp® DNA Mini Kit (para sangue e tecido), a cada 500 μL de alimento infectado adicionou-se 20 μL de proteinase K

dissolvida em 200 µL de tampão de lise (10 mM Tris– HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 0.5% SDS; 0.01% N-laurilsarcozyl, 100 µg/mL). A mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada a 56° C por 30 minutos. As extrações foram realizadas em sistema automatizado (QIAcube) e as amostras de DNA foram eluídas em 100 µL do tampão AE.

Como ambos os alimentos contêm muitos resíduos, assemelhando-se a matriz fezes, foi testado o kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen®). Os procedimentos foram realizados conforme as instruções do fabricante.

Alíquotas de 500 µL foram adicionadas em tubos de 2 mL contendo 1400 µL do BUFFER ASL. A seguir foram agitadas em vórtex até a completa homogeneização da mistura, incubadas a 95°C por 5 minutos e novamente agitadas em vórtex por 3 minutos. Ao final as amostras foram centrifugadas a 13000 g por 1 minuto e sedimento desprezado. Para retirar os prováveis inibidores da Taq DNA polimerase, 1200 µL de sobrenadante foram tratados com 1 tablete “InhibitEx”. As misturas foram homogeneizadas em vórtex até o tablete ser completamente dissolvido, incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas a 13000 g por 3 minutos. O sedimento foi descartado.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado a 13000 g por 3 minutos. Este segundo sobrenadante (200 µL) foi tratado com 15 µL de proteinase K no mesmo tampão de lise descrito acima, homogeneizado e incubado a 70°C por 10 minutos. As moléculas de DNA foram eluídas em 50 µL do tampão AE.

As concentrações e qualidade das amostras de DNA foram avaliadas por espectrofotometria em NanoDrop ND100 (Thermo Scientific®) em comprimento de onda 260 e 280 nm, tendo em vista que a relação A260/A280 fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucléicos e valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína.

Após as extrações, as amostras foram estocadas a -20°C. Para os controles positivos foram utilizados DNA extraído de *T. cruzi*. Para os

controles negativos foram utilizadas amostras de DNA de polpa de açaí e caldo de cana sem a infecção por *T. cruzi* e água ultrapura.

3.7.2 PCR convencional (cPCR)

As amplificações foram realizadas utilizando um kit comercial (Gotaq®green Master Mix - Promega®) contendo dois corantes (azul e amarelo) que permitem monitorar o progresso das amostras durante a eletroforese. Cada 12,5 µL do “mix” continha uma unidade de Taq DNA polimerase em 10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 50mM KCl; 1.5 mM MgCl₂ e 200 mM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando-se 5 µL do DNA alvo e 250 pM de cada primer em um volume final de 25 µL. As reações de amplificação foram realizadas no equipamento Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®). A cada conjunto de reações foram incluídos os controles negativos (água livre de nuclease e uma amostra do alimento não infectado) e um controle positivo (*T. cruzi*).

A presença de *T. cruzi* nas amostras foi identificada utilizando-se o par de iniciadores TCZ1 (5'-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3') e TCZ2 (5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'), que amplifica um fragmento de 188 pb (Moser et al., 1989). As amplificações foram compostas de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de uma segunda etapa composta de desnaturação (95°C por 30 segundos), anelamento (57°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 30 segundos) repetida por 30 ciclos. A terceira etapa constituiu em um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.7.3 Eletroforese e gel de agarose

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% em TBE (Tris-Borato, 0,045M; EDTA, 0,001M) com 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de brometo de etídio e separados por um sistema de eletroforese horizontal numa cuba contendo o mesmo tampão. As imagens dos géis foram visualizadas sob iluminação UV em transluminador Mini Bis Pro (Programa Gel Capture, Mini Bis Pro, versão 4.5.3). Os tamanhos dos fragmentos foram comparados com o padrão de peso molecular de 100 pb utilizado no gel juntamente com as amostras.

3.7.4 PCR em tempo real (qPCR)

As reações foram padronizadas utilizando DNA extraído de tripomastigotas (Cepa Y) em diluições seriadas, realizadas em equipamento de PCR em tempo real da Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System® em um volume final de 20 μL . O valor de “cycle threshold” (C_T), que indica a medida relativa da concentração do DNA alvo, foi automaticamente determinado no equipamento. A seguir foi construída uma curva padrão.

As amostras de DNA (3 e 1 μL) foram adicionadas a uma mistura contendo 10 μL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix, 0.4 μM de cada iniciador (“forward” e “reverse”). As amplificações de uma região dos minicírculos do kDNA de *T. cruzi* foram realizadas com o par de iniciadores para qPCR cuja descrição é: Cruzei 32F (5'- TTTGGGAGGGGCGTTCA-3') e 148R (5'-ATATTACACCAACCCCAATCGAA-3'). A sonda TaqMan (71P) (5'-CATCTCACCCGTACATT-3') foi marcada com FAM na extremidade 5' e a extremidade 3', com Quencher não fluorescente (NFQ) (Qvarnstrom et al., 2012).

O protocolo de amplificação incluiu um ciclo de 2 minutos a 50°C e 10 min a 95°C. A seguir, foram realizados 40 ciclos de 95°C por 15

segundos e 60°C por 1 minuto. A cada lote de reação foram incluídos os controles negativos (água e uma amostra do alimento não infectado) e um controle positivo (*T. cruzi*).

3.8 Cultura dos alimentos contaminados com *T. cruzi* em meio LIT

Estes experimentos foram realizados a fim de avaliar a possível utilização de meio de cultura para aumentar a quantidade de parasitas a serem detectados pela PCR. Foram testadas alíquotas de 50 g de polpa de açaí e caldo de cana contaminadas experimentalmente com 6×10^3 tripomastigotas. As misturas foram semeadas em 100 mL do meio LIT com gentamicina, incubadas a 28° C por 10 dias. A cada 2 dias foi retirada uma alíquota de 500 µL de cada alimento contaminado para extração de DNA e testes moleculares.

3.9 Análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com os alimentos

A análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com polpa de açaí e caldo de cana foi realizada por microscopia óptica comum. Cerca de 1×10^6 tripomastigotas foram adicionadas a alíquotas de 500 µL de polpa de açaí e caldo de cana, em duplicata para realização do teste em duas temperaturas (ambiente e refrigerado). Como controle foi utilizada a mesma quantidade de tripomastigotas em meio de cultura. O pH dos alimentos foi medido antes do procedimento de contaminação com o parasita.

Foram realizadas visualizações em microscópio óptico no momento da contaminação e após 2, 4, 8 e 24 horas de contato, para análise da morfologia do parasita e contagem de formas móveis de acordo com Brener (1962), que consistiu em colocar uma alíquota de 5 µL de amostra

contaminada em uma lâmina, cobrindo-a com lamínula 22 x 22 mm, determinando assim o número de parasitos em 50 campos.

Previamente a este experimento, foram feitas observações do parasita utilizando-se diferentes alíquotas dos alimentos contaminados (50 g, 1 mL e 500 µL) a fim de determinar a quantidade que seria utilizada para conduzir este ensaio.

3.10 Contaminação dos alimentos com triatomíneos infectados com *T. cruzi* artificialmente e coleópteros

Para testar o protocolo padronizado de detecção de *T. cruzi* em alimentos e caracterizar os fragmentos de triatomíneos, 500 g de polpa de açaí e 500 mL de caldo de cana receberam 2 triatomíneos cada da espécie *Triatoma infestans* (3^o estágio) que apresentaram resultados positivos para presença de parasita nas fezes após o procedimento de xenodiagnóstico artificial.

Após a inserção dos triatomíneos, os alimentos foram triturados em liquidificador por 2 minutos. Desta mistura, foi retirada uma alíquota de 50 g para realização dos procedimentos do método padronizado para detecção de *T. cruzi* em alimentos (extração de DNA e PCR).

As alíquotas restantes de polpa de açaí e caldo de cana foram submetidas às técnicas para pesquisa de sujidades leves, para recuperação, observação e caracterização dos fragmentos dos triatomíneos.

Paralelamente, com o objetivo de comparar os fragmentos dos triatomíneos com coleópteros, que são os insetos comumente encontrados em alimentos como pragas oriundas do campo e do armazenamento de grãos, outras duas alíquotas de 500 g de polpa de açaí e caldo de cana receberam 4 coleópteros cada uma, moídos previamente, sendo 2 do gênero *Sitophilus* e 2 do gênero *Tribolium* e foram também submetidas às técnicas para pesquisa de sujidades leves.

3.11 Pesquisa de sujidades leves nos alimentos contaminados com triatomíneos e coleópteros

Para a recuperação dos fragmentos de triatomíneos e coleópteros triturados com os alimentos, foram realizadas duas técnicas.

Para o caldo de cana, foi realizada a técnica 16.5.18 da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2011), método 972.35 com adaptações. Cerca de 450 mL foram tamisados em peneira de malha nº 230 e o resíduo retido foi filtrado à vácuo em funil de Buchner utilizando-se papel de filtro.

A polpa de açaí foi submetida à técnica descrita por Atui et al. (2012) para pesquisa de matérias estranhas.

De acordo com o método, 100 g do alimento foi pesado em béquer de 1000 mL, adicionado 600 mL de água quente e 50 mL de ácido clorídrico. Após fervura de 15 minutos desta mistura, a amostra foi tamisada em peneira nº 140, lavada com solução de álcool isopropílico a 40% e transferida para frasco armadilha de Wildman de 2000 mL com auxílio de pissete contendo solução de álcool isopropílico a 40%. Foram adicionadas solução de álcool isopropílico a 40% até o volume de 800 mL e 50 mL de vaselina líquida. O material ficou sob agitação magnética e fervura durante 7 minutos. Após essa etapa, foi adicionado 100 mL da mistura de solução de tween 80 em álcool isopropílico a 40% e Na₄EDTA em álcool isopropílico a 40%, agitação por 1 minuto e 3 minutos de repouso. O frasco teve seu volume totalmente preenchido com solução de álcool isopropílico a 40% e após repouso de 20 minutos foi realizada uma primeira extração. Novamente foi adicionado 35 mL de vaselina líquida no frasco contendo a amostra, preenchido com solução de álcool isopropílico a 40% e após repouso de 5 minutos foi realizada a segunda extração. O material foi filtrado à vácuo em funil de Buchner utilizando-se papel de filtro para visualização dos fragmentos de inseto.

Todos os papéis de filtro foram examinados sob microscópio estereoscópio em aumentos de 15 a 40x (Micronal®) e os fragmentos de

insetos observados sob microscópio óptico em aumentos de 100 e 400x (Olympus®).

3.12 Análise de dados

A curva padrão e o limite de quantificação do par de iniciadores *Cruzi* 32/148-qPCR para qPCR foram analisados utilizando o programa de computador GraphPad Prism 6.05 Software Inc. (San Diego, CA, EUA). A curva padrão foi construída utilizando oito concentrações de DNA obtido a partir de 1×10^6 tripomastigotas (correspondendo a 35 ng/μL) em triplicata. As diluições em série foram até 0,1 tripomastigota e os valores de C_T foram traçados como média (em triplicata) contra os valores do número de tripomastigotas em log 10 para determinar o limite de detecção do marcador molecular *Cruzi* 32/148-qPCR. As concentrações foram determinadas após o cálculo da equação de regressão linear ($y = ax + b$), onde $y = C_T$; a = inclinação da curva (inclinação); x = número de parasitas; e b = onde a curva intersecta o eixo y (intercepção y) (Bustin et al., 2009).

3.13 Qualidade dos experimentos moleculares

Uma amostra de polpa de açaí e outra de caldo de cana não infectadas por *T. cruzi* foram utilizadas para extrair DNA e como controle negativo em todas as reações. Em paralelo, em cada reação foi utilizado um controle “branco” onde água ultrapura foi colocada no lugar da amostra de DNA. Foram utilizadas salas separadas para i: extração de DNA; ii: mistura das soluções para PCR e marcadores moleculares; iii: adição de DNA; iv: eletroforese em gel de agarose. As amostras de DNA foram ensaiadas em duplicata e, pelo menos duas vezes para determinar a reprodutibilidade.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização de método para detecção de *T. cruzi* em alimentos

4.1.1 Extração de DNA

O método da centrifugação associado à extração de DNA utilizando o kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) para extração em fezes foi eficiente para as amostras de alimentos apresentando resultados de amplificação do DNA do parasita nos dois alimentos contaminados experimentalmente.

A utilização do kit para extração de DNA em tecido QIAamp® DNA Mini Kit para extração de DNA de alimentos não foi efetiva. Todos os resultados de PCR foram negativos. Portanto a utilização deste kit não foi viável em amostras de alimentos.

4.1.2 cPCR

A cPCR foi realizada em DNA extraído do sedimento e sobrenadante de polpa de açaí e caldo de cana contaminados experimentalmente.

Como mostra a **Figura 12** os produtos amplificados de 188 pb estavam presentes nos sedimentos das amostras de polpa de açaí contendo todas as concentrações de tripomastigotas. Nos sobrenadantes, DNA do parasita foi detectado até a concentração de 1×10^4 tripomastigotas. Portanto, a recuperação dos parasitas foi mais eficiente nos sedimentos das polpas de açaí contaminadas. O limite de detecção da cPCR no sedimento foi de 1×10^1 tripomastigotas.

A **Figura 13** mostra os resultados da cPCR para a detecção de *T. cruzi* em caldo de cana. Verifica-se que, no sedimento, houve detecção de

até 1×10^2 tripomastigotas e no sobrenadante até 1×10^4 parasitas, corroborando com o resultado da polpa de açaí onde o limite de detecção foi mais baixo para o sedimento.

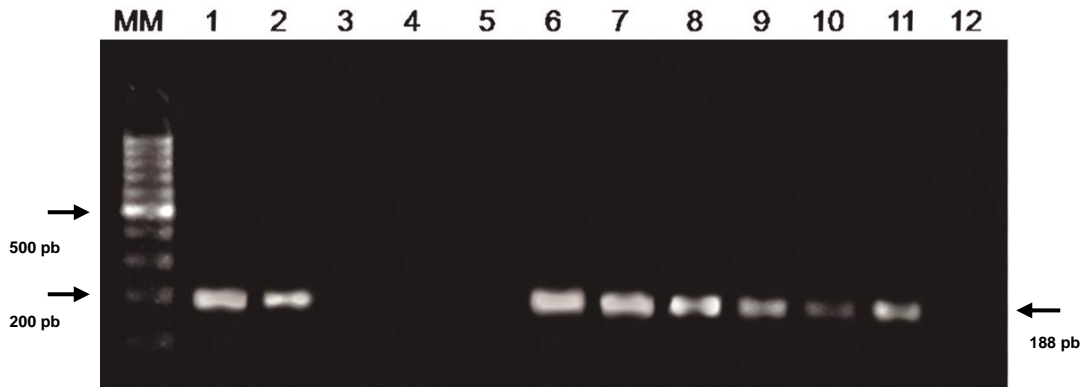


Figura 12: Recuperação de DNA de *Trypanosoma cruzi* no sobrenadante (1 a 5) e sedimento (6 a 10) de amostras de polpa de açaí após contaminação experimental com diferentes concentrações de tripomastigotas provenientes de cultura de células e determinada por cPCR. Concentrações de 1×10^5 (1 e 6); 1×10^4 (2 e 7); 1×10^3 (3 e 8); 1×10^2 (4 e 9) e 1×10^1 (5 e 10). Os produtos de 188 bp de uma região repetitiva nuclear de *Trypanosoma cruzi* foram amplificados pelo marcador molecular TCZ1/TCZ2 e analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. MM - marcador molecular de 100 pb. Controles positivo (11) e negativo (12).

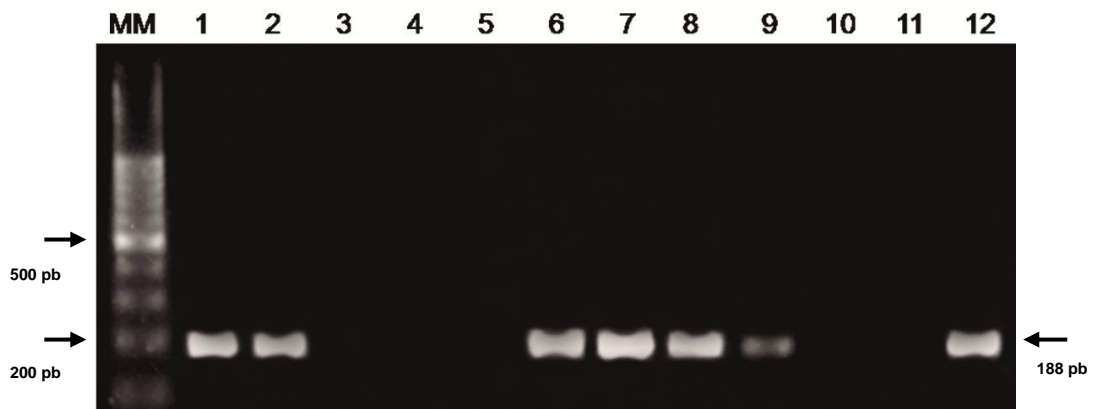


Figura 13: Recuperação de DNA de *Trypanosoma cruzi* no sobrenadante (1 a 5) e sedimento (6 a 10) de amostras de caldo de cana após contaminação experimental com diferentes concentrações de tripomastigotas provenientes de cultura de células e determinada por cPCR. Concentrações de 1×10^5 (1 e 6); 1×10^4 (2 e 7); 1×10^3 (3 e 8); 1×10^2 (4 e 9) e 1×10^1 (5 e 10). Os produtos de 188 bp de uma região repetitiva nuclear de *Trypanosoma cruzi* foram amplificados pelo marcador molecular TCZ1/TCZ2 e analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. MM - marcador molecular de de 100 pb. Controles negativo (11) e positivo (12).

4.1.3 qPCR

Para as padronizações da qPCR, o primeiro passo foi determinar a curva padrão do par de iniciadores *Cruzi32/148-qPCR*, que foi calculada utilizando DNA de *T. cruzi* (cepa Y) (**Figura 14**). A curva padrão apresentou $R^2 = 0,9919$, ou seja, alta linearidade entre as variáveis. O limite mínimo de detecção foi um décimo (10^{-1}) parasita (equivalente a 0,35 fg/ μL de DNA). A reprodutibilidade e a precisão também foram demonstradas, uma vez que resultados semelhantes foram apresentados nas réplicas (em duplicata) e em diferentes reações (mesma amostra feita em dias diferentes).

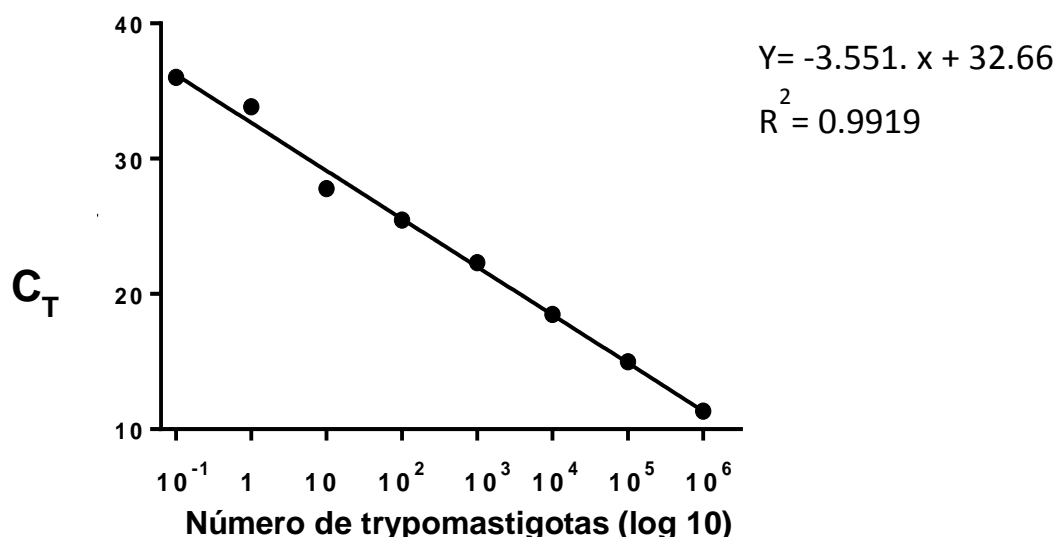


Figura 14: Curva padrão dos iniciadores *Cruzi 32/148-qPCR* utilizando DNA de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). A análise da curva padrão foi feita em diluições de 10 vezes (log) de tripomastigotas, na concentração inicial de 35 ng/ μL (1×10^6 tripomastigotas). Os resultados são apresentados como média de “cycle threshold” (C_T) obtido das amostras em triplicata de cada concentração de DNA.

A seguir foram avaliados os limites de quantificação do par de iniciadores *Cruzi32/148-qPCR* nas amostras de polpa de açaí e caldo de cana infectadas, utilizando 3 μL e 1 μL de DNA purificado (concentração de cerca de 100 ng/ μL). Embora as moléculas de DNA do parasita tenham sido detectadas por qPCR em todas as alíquotas de polpa de açaí (**Figura 15 A**) e caldo de cana (**Figura 15 B**), a amplificação do DNA nos sedimentos foi

mais eficiente do que nos sobrenadantes, por apresentar menores valores de C_T em todas as concentrações testadas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes usando 1 μ L ou 3 μ L da amostra de DNA.

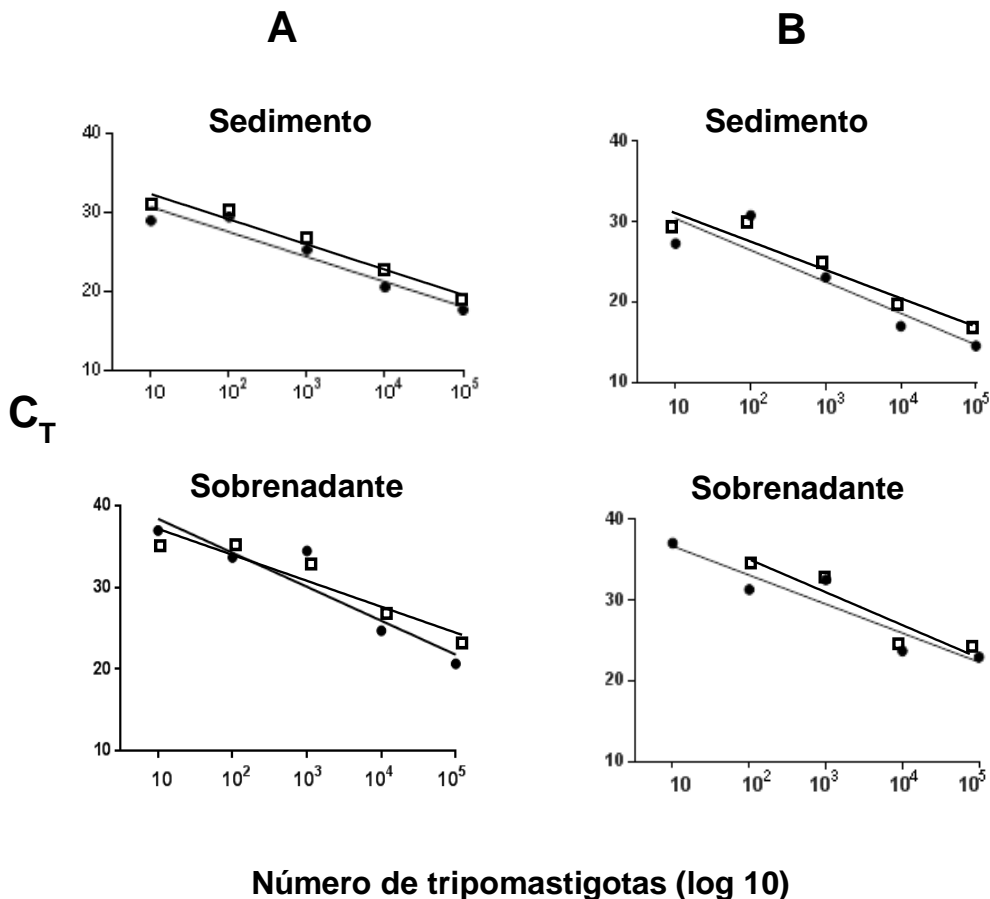


Figura 15. (A) e (B) representam o limite de quantificação de qPCR em amostras de polpa de açaí e caldo de cana, respectivamente, contaminadas com as referidas concentrações de tripomastigotas. Foram utilizados os sedimentos e sobrenadantes para extração de DNA. Os resultados são apresentados como média de “cycle threshold” (C_T) obtido das amostras em duplicata de cada concentração de DNA utilizando 3 μ L (círculos) e 1 μ L (quadrados).

4.2. Cultura dos alimentos contaminados com *T. cruzi* em meio LIT

O objetivo deste experimento foi verificar se haveria possibilidade de aumentar a quantidade de parasitas em meio de cultura para posterior análise por PCR. As **Figuras 16** e **17** mostram os resultados da PCR

convencional para cultura de polpa de açaí e caldo de cana contaminados, respectivamente.

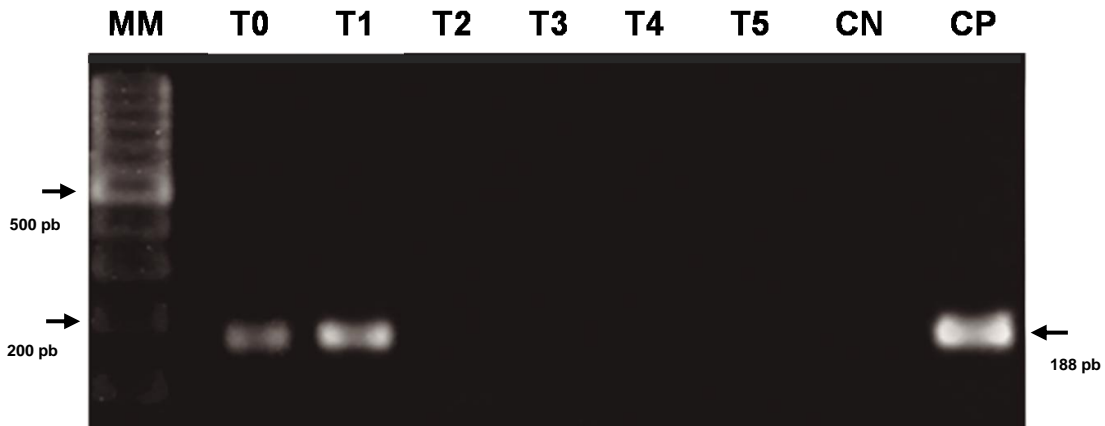


Figura 16: Recuperação de DNA de *Trypanosoma cruzi* em alíquota de 50 g de polpa de açaí contaminada (6×10^3 tripomastigotas) e semeada em LIT. A incubação foi realizada a 28°C por 10 dias e as coletas realizadas a cada 2 dias de incubação. T0 - dia da incubação; T1 - 2 dias; T2 - 4 dias; T3 - 6 dias; T4 - 8 dias; T5 - 10 dias; CN - controle negativo; CP - controle positivo. Os produtos de 188 bp foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. MM - marcador molecular de 100 pb.



Figura 17: Recuperação de DNA de *Trypanosoma cruzi* em alíquota de 50 g de caldo de cana contaminado (6×10^3 tripomastigotas) e semeado em LIT. A incubação foi realizada a 28°C por 10 dias e as coletas realizadas a cada 2 dias de incubação. T0 - dia da incubação; T1 - 2 dias; T2 - 4 dias; T3 - 6 dias; T4 - 8 dias; T5 - 10 dias; CN - controle negativo; CP - controle positivo. Os produtos de 188 bp foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. MM - marcador molecular de 100 pb.

Verificou-se que tanto para a polpa de açaí como para o caldo de cana, foi possível amplificar o DNA do parasita apenas até 2 dias de incubação.

Da mesma maneira, os resultados da PCR em tempo real (em valores de C_T) mostraram que, para ambos os alimentos houve discreto aumento na concentração do DNA de *T. cruzi* somente após 2 dias de cultura em meio LIT (**Figura 18**).

Para a polpa de açaí, a concentração de *T. cruzi* variou consideravelmente durante o período do experimento. Após dois dias de incubação a quantidade de DNA aumentou, entretanto nos demais dias houve diminuição da concentração de material genético amplificado na qPCR. Para o caldo de cana a variação na concentração de DNA do parasita não foi significativa, portanto não houve aumento da carga parasitária conforme esperado. Esses resultados demonstram que a cultura dos alimentos em LIT não é viável para potencializar a detecção de *T. cruzi*, mas mantém os parasitas vivos por um tempo suficiente para o alimento ser transportado para o local de análise.

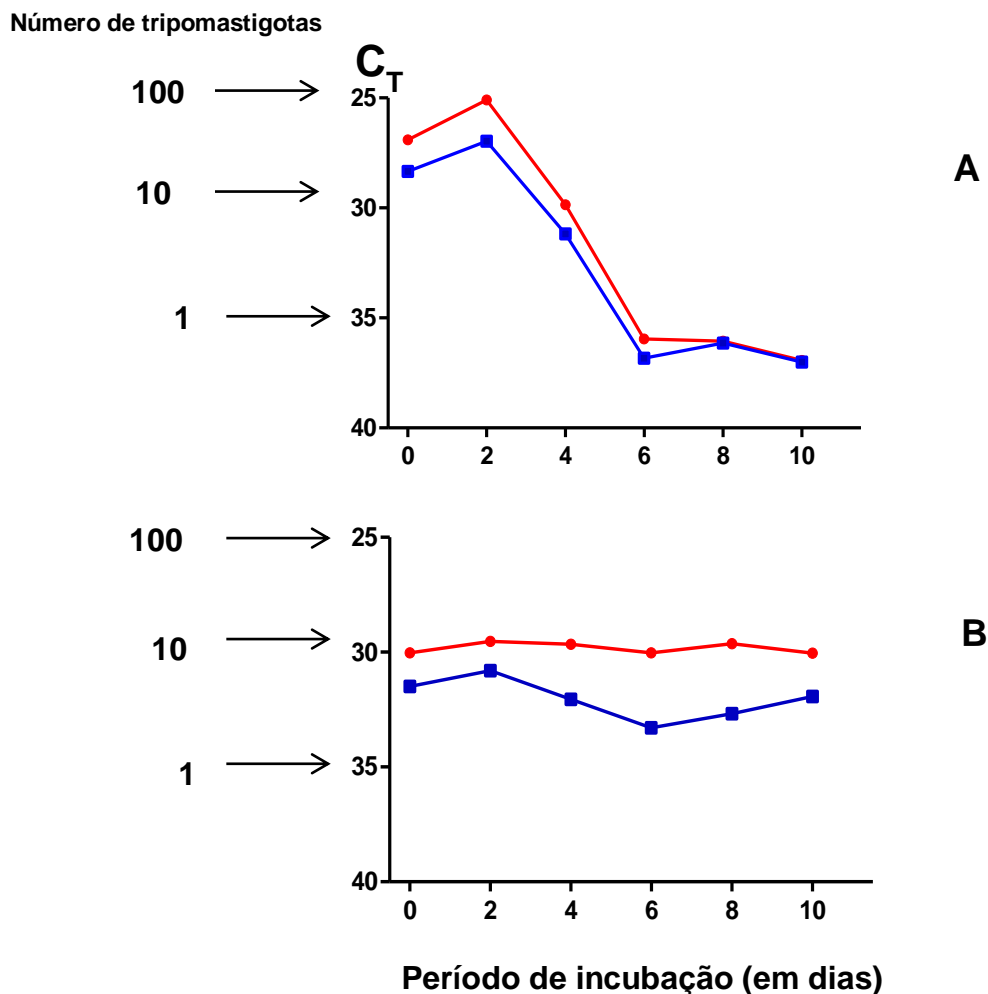


Figura 18: Resultados de qPCR utilizando amostras de DNA de polpa de açaí (A) e caldo de cana (B) contaminadas com 6×10^3 tripomastigotas/50g, semeadas em LIT (100 mL) e incubadas a 28°C, em períodos a que se refere (em dias). Os resultados são apresentados como média de “cycle threshold” (C_T) obtido a partir de cada concentração em duplicata de DNA de cada período, utilizando 3 µL (círculos vermelhos) e 1 µL (quadrados azuis).

4.3 Análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com os alimentos

A análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com polpa de açaí e caldo de cana foi realizada por microscopia. Como controle foi utilizada uma alíquota de tripomastigotas em meio de cultura cujos parasitas se mantiveram móveis e ativos até o final do experimento. Para este experimento, foram feitas medidas do pH dos

alimentos, que estavam em 4,8 e 5,1 para polpa de açaí e caldo de cana, respectivamente.

Nos testes preliminares para definir a quantidade de cada alimento que seria utilizada para o experimento, verificou-se que a observação do parasita nos alimentos somente foi possível quando utilizada uma alíquota de 500 µl do alimento contaminado com cerca de 10⁶ formas tripomastigotas.

Os resultados dos testes podem ser observados nas **Tabelas 6 e 7**. A maior parte dos tripomastigotas mantiveram-se móveis e ativos em caldo de cana até o final do experimento (24 horas). Contudo, em polpa de açaí, após 4 horas da contaminação, para a amostra a temperatura ambiente, os parasitas já apresentaram alteração em seu movimento, tornando-se mais lentos e após 8 horas alteração em sua forma, tornando-se arredondados (amastigota "like").

Em ambos alimentos, o processo de refrigeração contribuiu para a manutenção das formas móveis e ativas do parasita por mais tempo. O caldo de cana apresentou muitas leveduras, que foram aumentando ao longo do experimento. Em observações posteriores ao período de 24 horas para o caldo de cana, foram encontrados parasitas móveis e ativos em um período superior a 7 dias para a amostra mantida sob refrigeração e por até 48 horas a temperatura ambiente (dados não mostrados).

Tabela 6: Análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com polpa de açaí, no período de 24 horas.

Período pós contato (em horas)	Refrigerado		Temperatura Ambiente	
	Morfologia	% formas móveis	Morfologia	% formas móveis
2	Normal / ativos	98	Normal / ativos	78
4	Normal / ativos	93	Normal / lentos	54
8	Normal / lentos	58	Arredondados / lentos	20
24	Arredondados	0	Arredondados	0

Tabela 7: Análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com caldo de cana, no período de 24 horas.

Período pós contato (em horas)	Refrigerado		Temperatura Ambiente	
	Morfologia	% formas móveis	Morfologia	% formas móveis
2	Normal / ativos	97	Normal / ativos	97
4	Normal / ativos	96	Normal / ativos	95
8	Normal / ativos	95	Normal / ativos	91
24	Normal / ativos	95	Normal / ativos	58

4.4 Contaminação dos alimentos com triatomíneos infectados com *T. cruzi* artificialmente

Esse experimento foi realizado simulando-se a situação real, onde triatomíneos infectados podem ser triturados com os alimentos no momento do preparo do suco, com a finalidade de testar se o método padronizado previamente seria eficiente para a detecção de *T. cruzi* proveniente deste tipo de contaminação.

Os resultados dos métodos moleculares padronizados para a detecção de *T. cruzi* em alimentos contaminados com triatomíneos infectados com o parasita, estão mostrados na **Figura 19** e **Tabela 8**.

O DNA extraído dos parasitas foi detectado pela cPCR em ambos os alimentos, sendo o fragmento de 188 pb mais perceptível no sedimento, igualmente aos resultados obtidos na padronização do método.

Semelhante aos resultados da cPCR, a qPCR demonstrou que foi eficiente para amplificar o DNA de *T. cruzi* em ambos os alimentos, apresentando melhor detecção no sedimento do que no sobrenadante, conforme ocorreu na padronização do método.

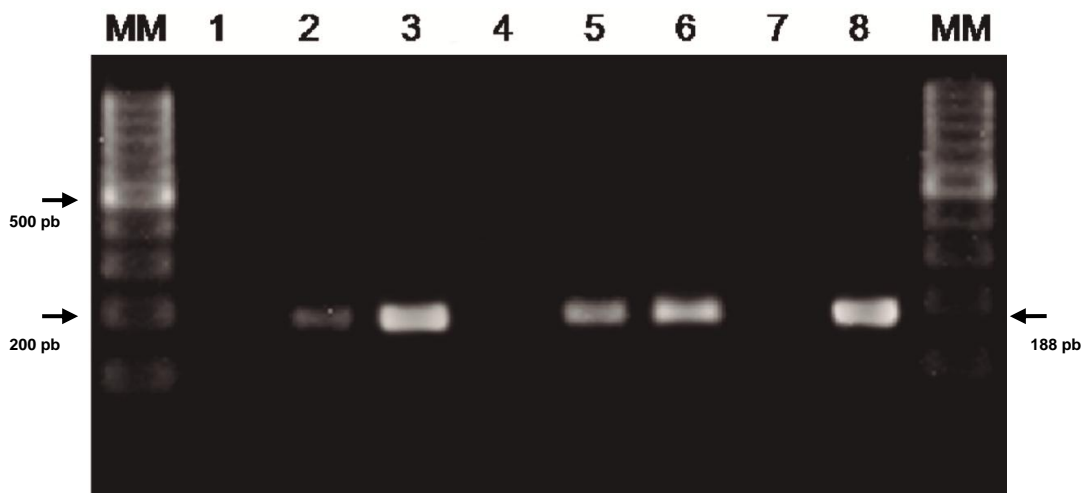


Figura 19: Recuperação de DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostras de caldo de cana (1 a 3) e polpa de açaí (4 a 6) após inserção de triatomíneos infectados com *T. cruzi* nos alimentos, trituração e centrifugação das amostras. 1 - caldo de cana sem contaminação com triatomíneos; 2 - sobrenadante do caldo de cana contaminado; 3 - sedimento do caldo de cana contaminado; 4 - polpa de açaí sem contaminação com triatomíneos; 5 - sobrenadante da polpa de açaí contaminada; 6 - sedimento da polpa de açaí contaminada. Os produtos de 188 pb de uma região repetitiva nuclear de *Trypanosoma cruzi* foram amplificados pelo marcador molecular TCZ1/TCZ2 e analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. MM - marcador molecular de 100 pb. Controles negativo (7) e positivo (8).

Tabela 8: Resultados da qPCR para amostras de polpa de açaí e caldo de cana contaminadas com triatomíneos infectados com *T. cruzi*. Amostras dos alimentos sem infecção apresentaram C_T indeterminado e Controle positivo apresentou valor médio de C_T 18,73.

Alimento	Alíquota	Produto	Valor C_T	Nº aproximado de parasitas/mL de acordo com a curva padrão
Polpa de açaí	3 μ L	Sobrenadante	27,81	10^2
	1 μ L	Sobrenadante	30,33	10
	3 μ L	Sedimento	22,60	10^3
	1 μ L	Sedimento	24,60	10^2
Caldo de cana	3 μ L	Sobrenadante	28,51	10
	1 μ L	Sobrenadante	33,26	10^{-1}
	3 μ L	Sedimento	16,69	10^4
	1 μ L	Sedimento	22,51	10^3

4.5 Pesquisa de sujidades leves nos alimentos contaminados com triatomíneos e coleópteros

Os métodos de extração de sujidades leves permitiram a recuperação e visualização dos fragmentos dos triatomíneos (*T. infestans*) triturados com os alimentos, bem como a comparação destes com fragmentos de coleópteros (*Sitophilus* sp e *Tribolium* sp) (**Figuras 20 a 24**).

Quando comparados, os fragmentos dos triatomíneos, ao toque da agulha utilizada na leitura, apresentaram-se mais flexíveis, mais opacos e de coloração mais acinzentada. Já os fragmentos dos coleópteros apresentam superfície brilhante, coloração marrom, são firmes e quebradiços (**Figuras 20 e 21**).

A visualização dos fragmentos em microscopia estereoscópica e ótica possibilitou notar que o fragmento do triatomíneo mais facilmente caracterizável foi o tegumento que se mostrou repleto de dobras, com leve inclinação e com pontuações distribuídas aleatoriamente (**Figuras 22 e 23**).

Foi observado, tanto nos coleópteros como nos triatomíneos, presença de célula tricógena, que são inclusões epidérmicas similares a pelos. Essa estrutura foi observada nos fragmentos de ambos os insetos utilizados no experimento, entretanto apresentaram-se morfológicamente diferentes (**Figura 24**).

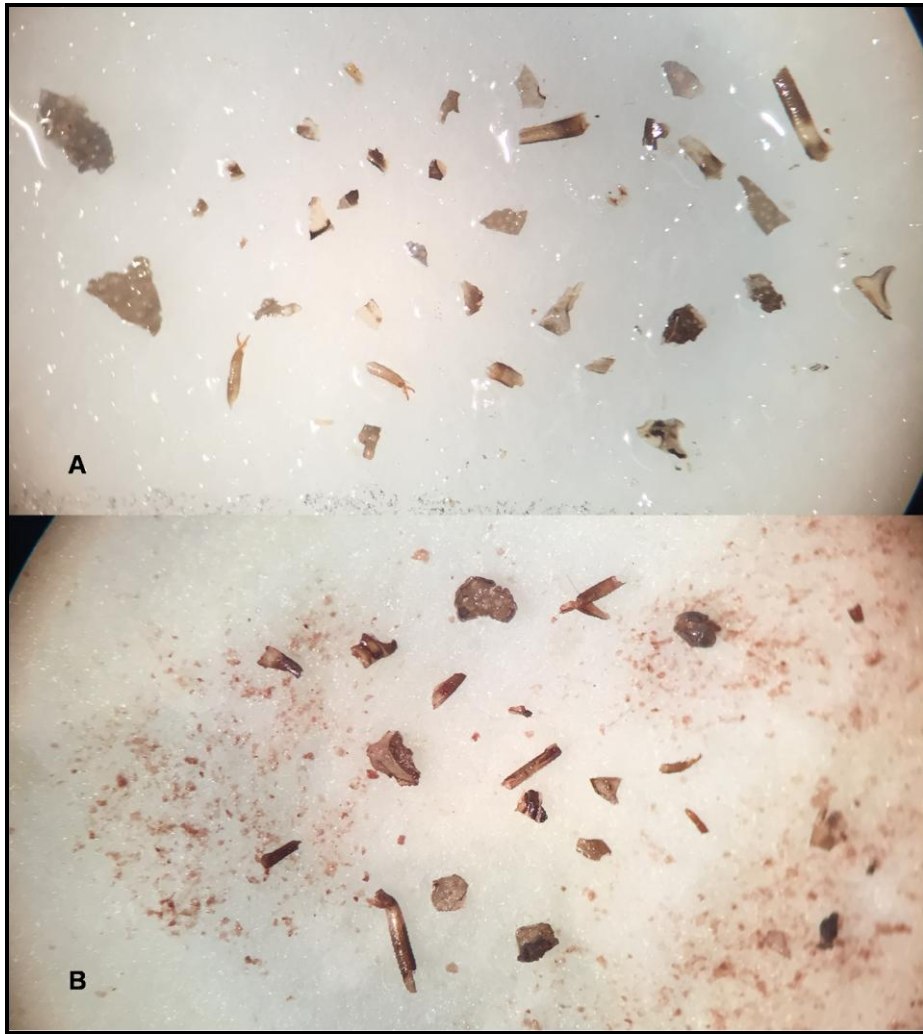


Figura 20 - Fragmentos de *Triatoma infestans* (ninfas de 3º estágio) recuperados nas técnicas de pesquisa de sujidades leves nas amostras de alimentos. A - caldo de cana; B - polpa de açai



Figura 21 - Fragmentos de *Sitophilus* sp e *Tribolium* sp recuperados nas técnicas de pesquisa de sujidades leves nas amostras de alimentos.



Figura 22 - Fragmento do tegumento de *Triatoma infestans* (ninfas de 3° estágio), recuperado na técnica de pesquisa de sujidades leves nas amostras de alimentos, sob microscópio estereoscópio, aumento de 40x.

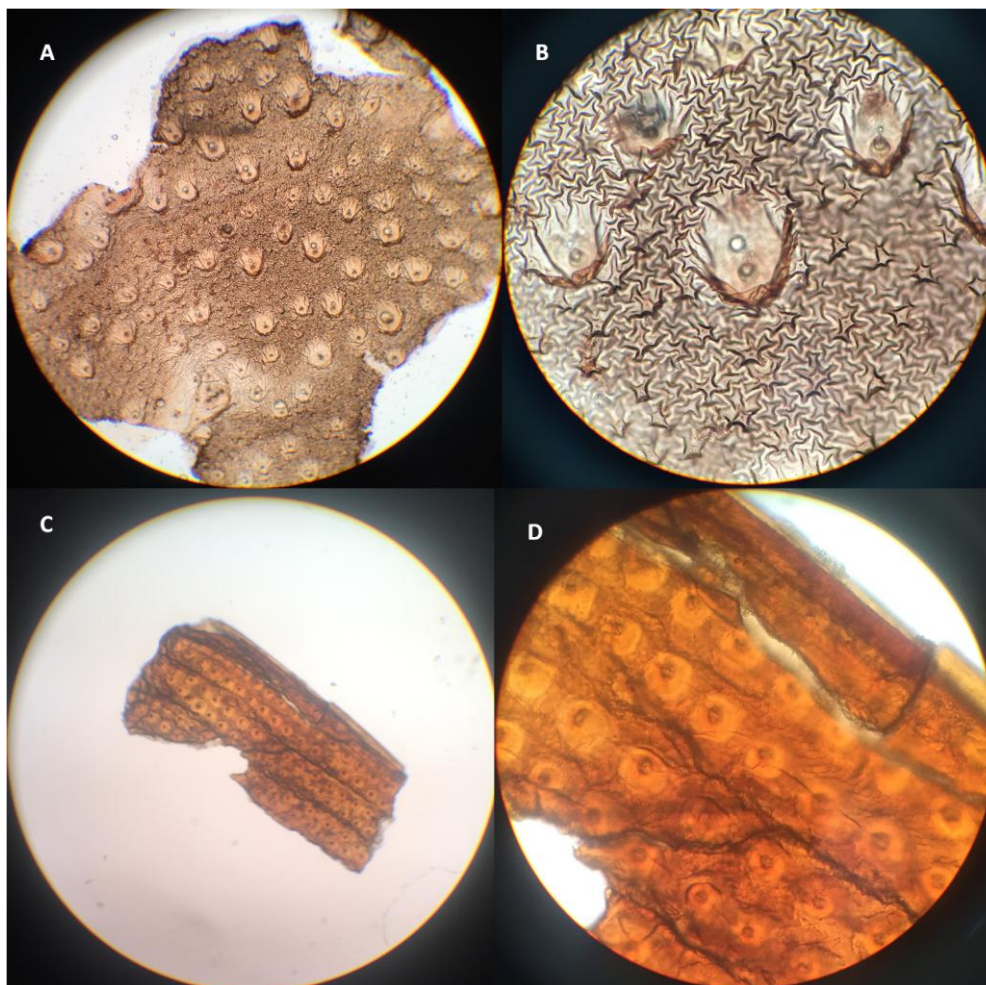


Figura 23 - Comparação da análise microscópica do fragmento de tegumento de *Triatoma infestans*, em aumentos de 100x (A) e 400x (B) e élitro de *Sitophilus* sp, em aumentos de 100x (C) e 400x (D), triturados em polpa de açáí.

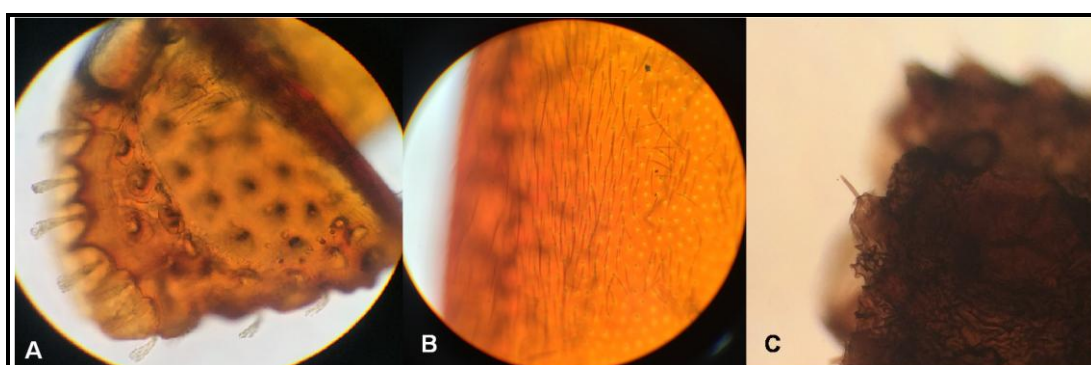


Figura 24 - Presença de célula tricógena (pelos) nos fragmentos dos élitros de *Sitophilus* sp (A), *Tribolium* sp (B) e no tegumento de *Triatoma infestans* (C).

5 DISCUSSÃO

A associação do processo de centrifugação e extração de DNA das amostras de alimentos contaminados experimentalmente com diversas concentrações de *T. cruzi* utilizando-se um kit comercial para a matriz fezes, foi altamente eficaz para a detecção do parasita, possibilitando a amplificação do seu DNA, inclusive nos alimentos com baixas cargas parasitárias.

Barbosa (2010) testou alguns métodos para isolamento de tripomastigotas em polpa de açaí e, dentre as técnicas testadas, a que se mostrou adequada foi a tamisação forçada. Os resultados demonstraram que a pequena pressão exercida sobre a mistura facilitou a separação das fases sólida e líquida da polpa. Paralelamente, a técnica proporcionou a livre passagem dos parasitas ao longo da coluna e permitiu que eles fossem obtidos em sua totalidade junto na fase líquida, por meio da coleta do eluato.

Vieira (2015), em seu trabalho, verificou que a lise direta das células de *T. cruzi* presentes em polpa de açaí, por aquecimento ou mesmo por lise com detergente, não possibilitou a amplificação do DNA do parasita por PCR, já o método de flutuação em sulfato de zinco foi capaz de detectar *T. cruzi* na polpa de açaí.

No trabalho desenvolvido por Vieira (2015), os testes com as amostras de açaí inoculadas com *T. cruzi* permitiram concluir que não podem ser colocadas diretamente na PCR sem tratamento prévio, diferentemente dos resultados obtidos no presente trabalho, no qual as amostras de alimentos não foram tratadas com reagentes químicos. Estas foram somente centrifugadas, demonstrando resultados positivos na PCR após extração direta com kit comercial.

Ferreira et al. (2016) testaram 4 métodos para extração de DNA de amostras de polpa de açaí contaminadas experimentalmente e revelaram que o DNA extraído utilizando um kit comercial (NucleoSpin®) não foi eficiente para mostrar leitura da concentração em espectrofotômetro. Os outros 3 métodos testados mostraram concentração suficiente de DNA para

a detecção por PCR. Embora o DNA extraído pelo método DNazol tenha produzido 4 vezes mais quantidade de material genético do que os 2 métodos que utilizaram brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), o eluato apresentou coloração marrom devido à ineficiência do método para eliminar os pigmentos presentes no açaí, levando a uma concentração de DNA superestimada e/ou inibição da PCR.

Os métodos de extração de DNA mais amplamente utilizados são baseados em detergentes e nos kits comerciais que utilizam colunas à base de sílica ou esferas magnéticas. Entre os primeiros, o método de extração de CTAB tem sido considerado eficaz para uma larga gama de alimentos derivados de plantas, especialmente devido à separação dos polissacarídeos de DNA. Foi originalmente descrito por Doyle e Doyle (1987) e têm sido propostas algumas variações deste método para melhorar a qualidade do DNA, dependendo da matriz da amostra (Branquinho et al., 2012).

Atualmente, um grande número de kits comerciais está disponível para a extração de DNA a partir de diferentes matrizes, mas apenas um número limitado pode ser usado para o isolamento de material genético a partir de produtos alimentícios processados (Branquinho et al., 2012).

A escolha do método de isolamento do parasita e extração do seu DNA é de grande importância e constitui um pré-requisito para análise molecular. A amplificação do DNA por PCR é influenciada pela integridade estrutural deste material genético e a presença de inibidores da matriz ou de reagentes da extração pode reduzir a eficiência da reação.

Nos alimentos, os problemas mais frequentemente ligados à extração de DNA incluem contaminação por fenóis e polissacarídeos, entre outros. O açaí é composto por lípidos, carboidratos, fibras, vitamina E, proteínas, sais minerais (Mn, Fe, Zn e Cu) e compostos antioxidantes, tais como antocianinas e compostos fenólicos, que representam um grande desafio para a extração de DNA dos parasitas nesta matriz alimentar complexa (Ferreira et al., 2016).

Muitos estudos foram publicados para determinar o método de extração mais apropriado para cada matriz de alimento, especialmente para detecção de alimentos geneticamente modificados, a fim de minimizar a influência da extração na variabilidade de amplificação de DNA, principalmente na quantificação do alvo quando há baixo número de cópias, utilizando qPCR (Peano et al., 2004; Smith et al., 2005; Cankar et al., 2006; Corbisier et al., 2007; Ferrari et al., 2007; Smith e Maxwell, 2007).

Neste estudo, a cPCR foi mais eficiente para amplificação do DNA no sedimento dos dois alimentos testados, apresentando limites de detecção de 1×10^1 e 1×10^2 tripomastigotas na polpa de açaí e caldo de cana, respectivamente.

Na qPCR para ambos os alimentos os resultados foram positivos em todas as concentrações e alíquotas testadas, com limite de detecção de 10 tripomastigotas, tanto para o sedimento como para o sobrenadante, sendo mais eficaz de forma geral, que a PCR convencional. Corroborando com os resultados obtidos na cPCR, o desempenho do método foi evidentemente melhor para as amostras das alíquotas dos sedimentos, onde os pontos ficaram mais uniformes e os valores de C_T mais condizentes com as concentrações de parasitas.

A análise e detecção direta de parasitas em fontes alimentares de forma geral são raras, uma vez que os sintomas surgem alguns dias após a ingestão do alimento contaminado, período em que os alimentos suspeitos já foram descartados. Além disso, não há atualmente protocolos padronizados para a realização desta investigação em amostras alimentares suspeitas (Toso et al., 2011).

No trabalho desenvolvido por Vieira (2015) o teste de detecção de *T. cruzi* em açaí por qPCR permitiu amplificação de amostras com até 1×10^3 parasitas e o limite de detecção para a cPCR foi 1×10^4 parasitas, embora tenham sido utilizados *primers* diferentes dos usados no presente trabalho.

Dias (2006) relatou em seu trabalho que experimentos conduzidos com cobaias, mostraram que entre 1×10^4 a 1×10^5 parasitas introduzidos por via oral são suficientes para desencadear a infecção por esta via. Neste

contexto, o método desenvolvido e relatado neste trabalho seria capaz de diagnosticar a presença de *T. cruzi* em alimentos envolvidos em surtos de doença de Chagas aguda.

O principal desafio no desenvolvimento de um método de detecção de *T. cruzi* em alimentos é a padronização de um protocolo com robustez suficiente para se evitar resultados falsos negativos em função de problemas na amostragem, os interferentes presentes nos diferentes tipos de alimentos e bebidas, bem como as variações técnicas na realização do método (erros humanos).

Outro ponto crítico no desenvolvimento de método para detecção de *T. cruzi* em alimentos é a alíquota do alimento a ser utilizada. Vieira (2015) trabalhou com alíquotas de 10 mL de polpa de açaí. Já Ferreira et al. (2011b) utilizaram amostras liofilizadas, embora não tenham mencionado a alíquota. No presente estudo, optamos por trabalhar com 50 g de cada alimento, considerando que a distribuição do parasita no produto alimentício não é homogênea e, normalmente, os surtos são provenientes de amostras contaminadas produzidas em grandes quantidades. Dessa forma, julgamos que alíquotas maiores possibilitam uma chance maior de detectar o parasita na amostra.

Uma desvantagem da PCR é que este método não distingue a amplificação de DNA de organismos vivos ou mortos e, por conseguinte, um resultado positivo não implica na viabilidade do patógeno. Métodos para avaliar a viabilidade de *T. cruzi* com base na detecção de RNA não são rotineiramente utilizados devido à sua elevada complexidade de manuseio. Da mesma forma, a cultura apresenta baixa sensibilidade e leva muito tempo para fornecer resultados conclusivos (Cancino-Faure et al., 2016).

Recentemente corantes fotoquímicos foram desenvolvidos para serem aplicados em combinação com a PCR para detectar células viáveis, com base na integridade da membrana celular. Etídio monoazido (EMA) e propídio monoazido (PMA) se ligam a moléculas de DNA ou RNA livre. Contudo, não marcam material genético contido no núcleo celular, pois são corantes impermeáveis à membrana celular. No caso de células danificadas

ou mortas, os corantes se ligam covalentemente por ligação cruzada entre moléculas orgânicas, incluindo DNA, e sob exposição à luz, indicam a inviabilidade da célula. A eficiência desta técnica depende de uma variedade de fatores, incluindo o tipo e concentração do corante, a fonte de luz, as condições de incubação e o microrganismo. Além disso, este método tem suas limitações, como o valor dos reagentes, a necessidade de pessoal altamente treinado para a sua aplicação e nem sempre está disponível nos laboratórios (Cancino-Faure et al., 2016).

Os métodos moleculares para o controle de qualidade de alimentos são uma realidade e, como tal, merecem uma atenção especial no que diz respeito à sua disponibilidade para a regulamentação dos produtos sujeitos à vigilância sanitária (Ferreira et al., 2016).

O desenvolvimento de métodos de detecção e isolamento em grande escala para *T. cruzi* em produtos alimentícios é essencial para servir como evidência epidemiológica e suporte para certificar que o alimento em questão é realmente contaminado com o parasita. Ao mesmo tempo, apesar do fato de que a identificação de DNA em alimentos em si não constitui uma metodologia para avaliar a viabilidade do parasita, pode se tornar uma ferramenta de avaliação para garantir a correta aplicação das boas práticas de fabricação (Ferreira et al., 2016).

Muitos surtos de doença de Chagas aguda associados à transmissão oral, inclusive em outros países, são definidos pelas características epidemiológicas e sinais clínicos, não tendo a confirmação laboratorial da fonte de contaminação (Rueda et al., 2014).

Esse trabalho da vigilância em saúde para identificar a fonte de infecção e interromper a cadeia de transmissão da doença se dá por meio de inspeções em estabelecimentos que atuam com o processamento dos alimentos, verificando as condições de produção. Associando as inspeções sanitárias a uma tecnologia acessível e de fácil aplicabilidade para o controle da qualidade poderia tornar mais seguro o consumo dos produtos alimentícios nas regiões endêmicas, contribuindo para a segurança alimentar global (Vieira, 2015).

No caso da doença de Chagas aguda por transmissão oral, isso reflete a necessidade de novos estudos epidemiológicos que incluem informações mais detalhadas sobre a fonte de contaminação e vetores silvestres nos focos de infecção, e como este conhecimento contribuirá para a tomada de medidas preventivas contra a possível transmissão oral em uma determinada área (Rueda et al., 2014).

Análises epidemiológicas moleculares de amostras humanas e ambientais são rotineiramente usadas para concluir a origem de surtos causados por agentes patogênicos de origem alimentar. Os marcadores moleculares de alta resolução desenvolvidos e validados para *T. cruzi*, se utilizados em conjunto com amostragem adequada, podem contribuir para identificar a fonte de surtos de origem alimentar (Segovia et al., 2013).

Dessa maneira, novas perspectivas para o estudo da transmissão oral da doença de Chagas devem ser apontadas (OPAS, 2009), como a avaliação do metabolismo respiratório do parasito *in vitro* após o contato com a polpa de açaí, a demonstração da metaciclogênese na própria polpa e, principalmente, a padronização de testes moleculares com propósitos diagnósticos para o desenvolvimento de uma metodologia de isolamento e detecção, em larga escala, de *T. cruzi* em produtos alimentícios (PANAFTOSA, 2006).

No caso da polpa de açaí, esses testes permitirão a identificação de possíveis contaminações durante a cadeia produtiva e são de grande importância, uma vez que a transmissão oral agrava o caráter epidemiológico da doença, ao descartar os processos de refrigeração e congelamento como métodos de controle na transmissão oral da doença de Chagas aguda (Labello Barbosa, 2015).

De acordo com o Programa de Controle da Doença de Chagas da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS, 2011) não se tem previsto como procedimento para investigação de casos e/ou surto a pesquisa de *T. cruzi* em alimentos. Tal documento somente prevê a definição da procedência e destino do alimento relacionado com o surto,

interdição do produto alimentar suspeito e o diagnóstico clínico e tratamento das pessoas envolvidas.

Para testar o rendimento da cultura de alimentos contaminados experimentalmente com *T. cruzi*, verificamos que, utilizando meio LIT com antibiótico, a concentração de DNA do parasita aumentou somente após 2 dias de incubação, tendo diminuído ao longo do período restante de incubação, resultado verificado pelas reações de PCR convencional e em tempo real, para os dois alimentos testados (polpa de açaí e caldo de cana), não sendo, portanto, um método aplicável no sentido de aumentar a quantidade de parasitas para melhorar sua detecção.

A queda na concentração de *T. cruzi* pode ser explicada pelo fato de que as amostras de alimentos estavam contaminadas por bactérias e fungos que podem competir com o parasita dificultando o seu cultivo.

O meio LIT foi desenvolvido por Camargo, em 1964, e até os dias de hoje continua sendo amplamente utilizado, além de ter servido de base para o desenvolvimento de outros meios de cultura (Camargo, 1964).

Em um dos trabalhos sobre crescimento e diferenciação de *T. cruzi* em meio líquido, datado de 1978, foram apresentados os diversos meios de cultura utilizados na época para cultura deste parasita, e na ocasião já era mencionado o meio LIT como um dos mais eficientes para crescimento rápido do protozoário (Lustosa, 1978). O autor menciona ainda que vários fatores podem influenciar no crescimento de *T. cruzi*, tais como: pH, composição do meio, temperatura, idade das cepas, bem como fatores intrínsecos que não puderam ser discutidos na época do estudo.

Uma importante vantagem da cultura é que, por estimular o processo natural de replicação de material genético, produz resultados positivos que indicam necessariamente a presença de parasitas viáveis na amostra (Bezerra e Amato Neto, 2010). Considerando isso, uma possibilidade que explicaria o fato da utilização de LIT para aumentar a carga parasitária de *T. cruzi* em alimentos não ter sido eficiente é que, após o contato do parasita com o alimento, sua viabilidade pode ter sido alterada e, dessa forma, seu crescimento possa ter sido inibido.

Em condições ideais, a composição do meio usado deverá oferecer a *T. cruzi* um ambiente pelo menos tão favorável à sua multiplicação quanto o encontrado no tubo digestivo do vetor (Bezerra e Amato Neto, 2010).

A cultura de *T. cruzi*, ainda é objeto de frequentes investigações, porém sua sensibilidade ainda não está bem definida. As fontes de variação dos seus resultados não foram suficientemente analisadas e podem fazer variar amplamente sua sensibilidade, como por exemplo no estudo de Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda (2003) onde as porcentagens de culturas positivas situaram-se entre 0% e 94% quando usadas diferentes técnicas.

Em relação à observação direta de *T. cruzi* nas amostras de alimentos, especificamente em polpa de açaí, no presente estudo utilizando-se a alíquota de 50 g de alimento com uma grande concentração de parasitas, não foi possível a visualização de tripomastigotas por microscopia óptica comum. Esta observação somente foi possível quando utilizado um volume de 500 µl do alimento contaminado com cerca de 10^6 formas tripomastigotas.

Corroborando com o nosso resultado, Sousa (2009) realizou um experimento que objetivava observar a presença e o potencial de penetração de *T. cruzi* nos tecidos da cana de açúcar e constatou que não foi possível essa observação por microscopia óptica.

Ainda em conformidade com os nossos achados, Barbosa (2010) verificou que o depósito de 1×10^5 tripomastigotas diretamente na polpa de açaí também não permitiu a visualização dos parasitas durante a inspeção microscópica, com e sem coloração vital pelo Azul de *Trypan*.

Este mesmo autor testou ainda a visualização de parasitas após a centrifugação da polpa infectada e relatou que foi possível a observação dos parasitos em ensaios com volumes reduzidos da mistura, porém o rendimento dessa técnica foi muito baixo e, por isso, a metodologia em questão não se mostrou eficiente no isolamento dos parasitas, resultado similar ao do presente estudo.

A não visualização dos parasitas diretamente na polpa de açaí íntegra durante a inspeção microscópica pode ser associada principalmente

à sua coloração escura, dada a grande quantidade de matéria orgânica e antocianinas (Rogez, 2000).

Entretanto, Barbosa (2010) constatou que a utilização do sobrenadante da polpa de açaí permitiu a visualização dos parasitos com sua motilidade característica. A observação de 100% dos tripomastigotas bem ativos indicou que o contato com a polpa não promoveu a morte imediata do parasito, tampouco nos 15, 30, 45 e 60 minutos seguintes. Apesar de o pH ideal para o parasita estar entre 7,2 e 7,3 e haver morte celular em meios muito ácidos ou alcalinos, o parasita sobreviveu em meio ácido na polpa *in natura* de açaí (pH 5,3) produzida em Belém (PA).

Em razão dos elevados índices de matéria orgânica, especialmente fibras vegetais, e das características físico-químicas da polpa de açaí íntegra, Passos et al. (2012) desenvolveram uma metodologia para o isolamento e observação de formas tripomastigotas na polpa, no qual uma tamisação realizada sob pressão resultou em um eluato que permitiu a quantificação exata e visualização da motilidade dos tripomastigotas.

Em relação à análise da morfologia e mobilidade das formas tripomastigotas após contato com os alimentos, no presente estudo a maior parte dos tripomastigotas mantiveram-se móveis e ativos no caldo de cana por mais de 24 horas e na polpa de açaí somente até 8 horas de contato, mantidos tanto à temperatura ambiente como refrigerados.

O experimento revelou ainda que na polpa de açaí, os parasitas, após 8 horas de contato com o alimento a temperatura ambiente, começaram a se apresentar mais arredondados, forma que chamamos de "amastigota like", diferentemente do que ocorreu no caldo de cana onde os parasitas não apresentaram alteração em sua morfologia.

Pesquisas relacionadas com o estudo da sobrevivência de *T. cruzi* em alimentos diversos vêm sendo desenvolvidas desde décadas passadas.

Em 1980, Lainson et al. conduziram um trabalho onde misturaram suspensão de epimastigotas de *T. cruzi* com leite pasteurizado, feijão cozido, peixe, carne bovina, arroz, suco de manga, queijo e farinha de

mandioca e observaram que o parasita sobreviveu durante 3 horas nos alimentos mantidos a temperaturas entre 26°C e 28°C (Lainson et al., 1980).

Soares et al. (1987) verificaram a sobrevivência do parasita em caldo de cana por até 24 horas. Já Pinto et al. (1990) em trabalho sobre viabilidade de *T. cruzi* também em caldo de cana verificaram que, após infecção experimental de alíquotas de 2 mL de caldo de cana com o parasita, foi possível observar formas vivas após os períodos de incubação de 1, 2 e 4 horas, tempo inferior ao observado em nosso estudo, considerando a sua mobilidade.

Cardoso et al. (2006) avaliaram a sobrevivência de *T. cruzi* presente em cana de açúcar contaminada com o parasita, utilizando para a infecção experimental o conteúdo intestinal de triatomíneos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, e revelaram que, na análise direta, os resultados foram positivos até 12 horas e, após centrifugação, ocorreu positividade somente até as 4 horas.

Añez e Crisante (2008) registraram a sobrevivência de *T. cruzi* em diversos alimentos, entre eles, banana, pêssago, cana de açúcar, mamão, maçã, batata, cenoura e tomate, todos armazenados a temperatura de 26°C e os resultados indicaram que, em 73% das amostras, os parasitas permaneceram vivos por um período entre 6 e 72 horas, sendo estimado o maior número de parasitas vivos entre 6 e 18 horas após a contaminação. Apenas em abacaxi contaminado (pH 3) não houve sobrevivência de *T. cruzi*.

Mais recentemente, Barbosa (2010) manteve uma mistura de polpa de açaí e plasma com *T. cruzi* (1:3) contendo 10^5 tripomastigotas à temperatura ambiente por 6, 18, 24, 42 e 48 horas para a observação de parasitas em movimento. Os resultados demonstraram que após 6 horas de incubação, 100% dos tripomastigotas estavam bem ativos; após 18 horas, 70,0% estavam bem ativos e 30,0% ativos; após 24 horas, 60,0% estavam ativos e 40,0% lentos; após 42 horas foram encontrados 33,3% ativos e 66,7% lentos e após 48 horas, 100% lentos. Ressalta-se que para esta

observação foi realizada uma tamisação forçada da mistura para a análise do eluato, o que pode ter contribuído para uma sobrevivência maior do parasita.

De acordo com Neves et al. (2015), em experimento realizado com polpa de açaí para verificar as alterações em alguns parâmetros físico-químicos em um período de 5 dias de incubação, houve uma tendência de redução do pH ao longo do período de armazenagem sob refrigeração, o que poderia justificar a queda na viabilidade das formas tripomastigotas do presente estudo. Também revelaram que os níveis de açúcares sofreram redução na polpa de açaí durante o período de estudo que foi de 5 dias, contribuindo para que o ambiente se torne mais hostil aos parasitas. Este estudo levou à conclusão de que para os parâmetros físico-químicos avaliados, tais como: pH, acidez titulável e sólidos solúveis, a polpa de açaí mostrou alterações na maioria dos fatores.

Nesse mesmo contexto, Sousa et al. (2006), avaliando polpas de açaí comercializadas em Manaus, encontraram valores de pH de 5,4, mostrando que especificidades referentes às áreas de produção, como, por exemplo, a temperatura, a umidade relativa, o tipo de solo e a própria composição química dos solos, podem influenciar nas características físico-químicas dos frutos e, conseqüentemente, de suas polpas.

No presente trabalho, as amostras de alimentos apresentaram valores de pH baixos e, conforme os estudos apontam, a possível redução destes valores, ao longo do período de contato com *T. cruzi*, pode ter sido um dos fatores que influenciaram na mobilidade e morfologia do parasita.

Os estudos de sobrevivência e integridade de *T. cruzi* tem importância epidemiológica à medida que mostra que os processos de congelamento e descongelamento podem não ser suficientes para matar *T. cruzi* e impedir a sua transmissão para o homem (Araujo, 2012).

Como proposta deste trabalho, para a verificação da eficácia do método padronizado para a detecção de *T. cruzi* em alimentos, foi realizada uma simulação da contaminação dos alimentos com triatomíneos infectados e posterior trituração destes junto com polpa de açaí e caldo de cana e, em

seguida, estes alimentos infectados foram submetidos ao método padronizado.

Os resultados deste experimento demonstraram que a sequência dos procedimentos: centrifugação das amostras, extração de DNA com kit comercial para matriz fezes e amplificação do DNA por PCR convencional e PCR em tempo real, foi eficiente para detecção do parasita em ambos os alimentos, sendo melhor quando utilizado o sedimento ao invés do sobrenadante.

Desde a década de 90 foram desenvolvidos estudos sobre extração de DNA e detecção de *T. cruzi* em fezes de triatomíneos por métodos moleculares, com bons resultados quando comparados ao método de detecção direto (microscopia) (Russomando et al., 1996; Shikanai-Yasuda et al., 1996; Silber et al., 1997; Pinto et al., 2000), entretanto não há relatos sobre a aplicação de técnicas para tal detecção quando a matriz é composta de fezes de triatomíneos e alimentos.

Estruturas presentes nos artrópodes podem interferir no processo de extração, já que o DNA está protegido por muitos componentes biológicos. Uma destas estruturas é a cutícula, que apresenta uma composição complexa e é composta de polissacarídeos (quitina), lipídeos e proteínas, potenciais inibidores da PCR (Andersen et al., 1995).

Neves (2010) em um trabalho sobre comparação de 12 métodos de extração de DNA de *T. cruzi* a partir de ninfas e triatomíneos adultos infectados, concluiu que o mesmo kit comercial utilizado em nosso trabalho (QIAamp DNA Stool Mini Kit da marca Qiagen®) apresentou melhores resultados em relação à concentração, grau de pureza e amplificação do DNA por PCR, além de ser mais econômico e demandar menos tempo na sua execução quando comparado com os demais protocolos testados.

No trabalho acima citado foi adotada uma pré-etapa de lise celular física através da maceração dos espécimes de triatomíneos em todos os protocolos, visando uma ruptura satisfatória da cutícula dos insetos para a liberação do DNA. Em nosso experimento, a trituração dos triatomíneos com os alimentos foi suficiente para quebrar o exoesqueleto quitinoso dos insetos

e permitir que a execução dos procedimentos para extração com kit comercial fosse eficiente para a posterior amplificação do DNA do parasita, tanto pela cPCR como pela qPCR.

Além do teste para verificação da eficácia do método padronizado para detecção de *T. cruzi*, após a simulação da contaminação dos alimentos com triatomíneos infectados, os alimentos foram submetidos à técnica para pesquisa de sujidades leves objetivando recuperar e caracterizar os fragmentos de inseto oriundos da contaminação experimental, além de compará-los com fragmentos de coleópteros, insetos considerados pragas de campo e armazenamento.

A presença de fragmentos de insetos é um indicador importante que pode auxiliar no diagnóstico da possível presença de *T. cruzi* em amostras de alimentos que possam estar envolvidas nos casos de surtos de doença de Chagas aguda.

Normalmente são observados pedaços de élitros, de tórax, de mandíbulas, de pernas, de antenas, de cápsulas cefálicas e, raramente, insetos inteiros (Vargas e Almeida, 1996).

No presente estudo, foi possível recuperar grande quantidade de fragmentos, entretanto, em virtude do diminuto tamanho dos fragmentos de inseto recuperados pelas técnicas utilizadas, não seria possível identificar o gênero e espécie do inseto a qual pertencem os fragmentos, exceto pelo tegumento do triatomíneo que se manteve mais íntegro e mostra-se bem diferente das estruturas encontradas nas pragas comuns das culturas, campos e grãos armazenados, tal como os élitros dos coleópteros (carunchos).

Sousa et al. (1999) não encontraram nenhum tipo de sujidade em 18 amostras de polpa de açaí analisadas na cidade de Macapá (AP), possivelmente pela utilização de metodologia não adequada para este tipo de matriz.

Fregonesi et al. (2010) em trabalho sobre características microscópicas de polpa de açaí revelaram que 50% das amostras apresentaram sujidades como fragmentos de insetos, ácaros, cristais de

areia e pelo humano, que indicam a existência de falhas na adoção e/ou manutenção das Boas Práticas de Fabricação. Tais fragmentos comumente não são identificados devido ao tamanho reduzido, como nos resultados obtidos no presente estudo, porém essa constatação corrobora ainda mais com a possibilidade do açaí ser contaminado com insetos diversos como, por exemplo, barbeiros que podem estar eventualmente contaminados com o protozoário *T. cruzi*, tornando o produto um veículo da transmissão oral da doença de Chagas aguda.

Atui et al. (2012) em pesquisa de matérias estranhas realizada em polpas de açaí recuperaram fragmentos de insetos, tais como asa, aparelho sugador e perna, entretanto nenhum característico de triatomíneos.

Sobre a presença de matérias estranhas em caldo de cana, Prado et al. (2010) realizaram uma avaliação do perfil microbiológico e microscópico do caldo de cana *in natura* comercializado por ambulantes no município de Ribeirão Preto (SP) e os resultados revelaram que 32,2% das amostras analisadas estavam em desacordo com a legislação em vigor principalmente em virtude da presença de fragmentos de insetos e de insetos inteiros pertencentes às ordens Hymenoptera (abelhas e formigas), Díptera (moscas domésticas, varejeiras e drosófilas) e Arachnida (aranha). Foi evidenciada ainda a presença de pelos de roedores em 4,4% das amostras indicando falhas na proteção das matérias-primas, utensílios, equipamentos ou mesmo na higiene e limpeza dos veículos de transporte ou barracas fixas que são utilizadas para a comercialização da garapa, acontecendo dessa forma a contaminação acidental.

Atui et al. (2014) fizeram um estudo sobre a presença de sujidades leves em polpas de goiaba, tomate, morango e manga, durante as 4 estações do ano e revelaram a presença de fragmentos de insetos em todas as polpas, sendo 93% em goiaba, 77% em tomate, 93% em morango e 48% em manga, com maior frequência durante o verão.

Estudos dessa natureza, que avaliam a contaminação por pragas e vetores, contribuem de maneira significativa para a melhoria de alimentos/bebidas à base de vegetais, principalmente quando esses

produtos considerados de risco podem servir como veículos da transmissão oral da doença de Chagas.

A pesquisa em parasitologia no contexto da ciência dos alimentos é uma área recém reconhecida e que se encontra em expansão, tornando-se um grande desafio durante as próximas décadas mundialmente, dada a importância econômica e para a saúde pública dessas doenças transmitidas por alimentos, que afetam a economia em termos de comércio de alimentos e custos com tratamento médico e hospitalização (Labello Barbosa, 2015).

Ressalta-se, por fim, a importância do presente estudo como referência para utilização imediata do método desenvolvido, pelos laboratórios de saúde pública para o esclarecimento dos surtos de doença de Chagas aguda, contribuindo com os serviços de vigilância em saúde, bem como por laboratórios particulares que atuem no controle de qualidade de alimentos.

6 CONCLUSÕES

- O método padronizado, contemplando etapa de centrifugação e extração de DNA com kit comercial para matriz fezes, foi eficiente para a amplificação do material genético de *T. cruzi* em amostras de polpa de açaí e caldo de cana, sendo que a cPCR apresentou limite de detecção em polpa de açaí de 10 tripomastigotas/mL e no caldo de cana 100 tripomastigotas/mL. A qPCR mostrou ser a metodologia ideal, pois apresentou limite de detecção de 10 tripomastigotas/mL para ambos os alimentos, sendo que o desempenho dos dois métodos moleculares foi melhor quando as amostras a serem analisadas foram centrifugadas e os ensaios foram feitos no sedimento.
- A semeadura de alimentos contaminados com *T. cruzi* em meio de cultura LIT revelou que, após 2 dias de incubação, houve aumento da concentração do DNA do parasita, entretanto para os demais dias de incubação não houve mais detecção do material genético do protozoário.
- A maior parte dos tripomastigotas mantiveram-se móveis e ativos nas amostras de caldo de cana por mais de 24 horas, tanto a temperatura ambiente como sob refrigeração. Em amostras de polpa de açaí os parasitas apresentaram-se móveis e ativos por até 8 horas, sendo, portanto, o caldo de cana mais propício à sobrevivência do parasita.
- O método molecular padronizado, testado nas amostras de alimentos contaminados com triatomíneos infectados, foi eficiente para detectar *T. cruzi*, com melhor desempenho para o sedimento dos alimentos.
- A pesquisa de matérias estranhas em alimentos é de grande valia como análise auxiliar nos esclarecimentos de surtos de doença de

Chagas aguda, possibilitando a confirmação da presença de fragmentos de triatomíneos.

7 REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA . Informe Técnico nº35, de 19 de junho de 2008. Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. [Acesso 21 jan 2016]. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35_190608.pdf

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Portaria nº 5, de 21 de fevereiro de 2006. Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, define doenças de notificação imediata, relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional e normas para notificação de casos. Diário Oficial da União, Brasília, 22 fev 2006. Seção 1, p.34

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 14 de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Diário Oficial União, Brasília, 31 mar 2014, nº 61. Seção 1, p. 58

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA . Resolução RDC nº 218, de 29 de julho de 2005. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Higiênico-Sanitários para Manipulação de Alimentos e Bebidas Preparados com Vegetais. Oficial da União, Brasília, 01 ago 2005. Seção 1, p. 119

Aguilar M, Yépez R. Evolución epidemiológica de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. In: Proceedings of the International Workshop on Populations Genetics and Control of Triatominae; 24-28 set 1995; Santo Domingo de los Colorados, Ecuador. p. 30-8.

Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J. Infect. Dis.* 2010; 201(9):1308-15.

Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2015; 110(3):377-386

Alasalvar C, Al-Farsi M, Quantick PC, Shahidi F, Wiktorowicz. Effect of chill storage and modified atmosphere packing (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. *Food. chem.* 2005; 89:69-76.

Alexandre D, Cunha RL, Hubinger MD. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2004; 24(1):114-119

Amunárriz M, Chico ME, Guderian RH. Chagas disease in Ecuador: a sylvatic focus in the Amazon region. *J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 94(3):145-9.

Andersen SO, Hojrup P, Roepstorff P. Insect Cuticular Proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1995; 25:153-76.

Añez N, Crisante G. Supervivencia de formas de cultivo de *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados. *Bol. malariol. salud ambient.* 2008; XLVIII (1):91-94

Anônimo. Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(Suppl. I):429-432

Araujo-Jorge TC, Castro SL. Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]. Rio de Janeiro (RJ): FIOCRUZ; 2000

[acesso em 2017 mar 27]. Disponível em: SciELO Books <http://books.scielo.org>.

Araújo PF. Estudo genético, imunológico e parasitológico das infecções pelo *Trypanosoma cruzi* em famílias do estado do Pará, Brasil. [Tese]. Brasília (DF): Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília; 2012.

Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Official Methods of Analysis os AOAC International. 19^aed. Maryland: AOAC; 2011.

Atui MB, Nogueira MD, Silva AM, Marciano MAM. Manual de Análise Microscópica em Polpas de Frutas. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2012.

Atui MB, Mendes AS, Marciano MAM, Franco VA, Chasin LB, Ferreira AR, Fioravanti MIA, Mattos EC, Nogueira MD. Monitoring the extraneous matters in pulps of tomato, guava, mango and strawberry marketed during the seasons of the year. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2014; 73(4):325-30

Barbosa RL. Transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* pela polpa de açaí em camundongos. [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia; 2010.

Barrosa KH, Pinto EG, Tempone AG, Martins EG, Lago JH. Alchornedine, a new anti-trypanosomal guanidine alkaloid from *Alchornea glandulosa*. Planta Med. 2014; 80(15):1310-4.

Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. Clin. microbiol. rev. 2011; 24(4): 655-681

Bezerra VS. Açaí congelado. 1ª edição. Brasília (DF): Embrapa Informação Tecnológica; 2007.

Bezerra RC, Amato Neto V. *Trypanosoma cruzi*, hemocultura: uma abordagem prática. Rev. Bras. Clin. Med. 2010; 8(3):205-7

Branquinho MR, Ferreira RTB, Cardarelli-Leite P. Use of real-time PCR to evaluate two DNA extraction methods from food. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas. 2012; 32(1): 112-118

Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa Nº 1, de 07 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta. Diário Oficial da União, Brasília, 10 jan 2000. Seção 1, p. 54

Brasil. Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. Regulamento Técnico sobre Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial União, Brasília, 01 ago. 1997. Seção 1, p. 40

Brasil. Ministério da Saúde - MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica, caderno 10:19-30, Brasília: Ministério da Saúde, 7ª Ed, 2009.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. 1962; 4:389-96

Brener Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct features. In: Chagas' Disease, Pan American Health Organization, Scientific Publication n.º 347:11-21,1977.

Brener Z, Andrade Z, Barral-Neto M. Book review - *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2000.

Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104(Suppl 1):122-35.

Brumpt, E. Précis de parasitologie. Paris: Masson; 1931.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al.. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 2009; 55:611–622. doi: 10.1373/clinchem.

Cáceres DNR, Corredor A, Gualdrón L, Slait E, Dib JC. Investigación de un brote de síndrome febril con miocarditis aguda en Guamal, Magdalena, 7 a 11 de junio de 1999. Biomédica (Bogotá). 1999; 19(3):253-9.

Calvo-Méndez ML, Noguera-Torres B, Alejandre-Aguilar R, Cortés-Jiménez M. Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* através de agua y alimentos contaminados. Rev. Latinoam. Microbiol. 1994; 36(1):67-69

Camargo EP. Doenças tropicais. Estudos Avançados. 2008; 22 (64):95-110.

Camargo ME. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. 1964; 12:93-100

Campos FP, Pansard HM, Arantes LC, Rodrigues AT, Daubermann MF, Azambuja MF et al. A case of Chagas' disease panniculitis after kidney transplantation. J. Bras. Nefrol. 2016; 38(1):127-131

Cancino-Faure B, Fisa R, Magdalena Alcover M, Jimenez-Marco T, Riera C. Detection and Quantification of Viable and Nonviable *Trypanosoma cruzi* Parasites by a Propidium Monoazide Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2016; 94(6):1282–1289

Cankar K, Stebih D, Dreo T, Zel J, Gruden K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. BMC biotechnol. 2006; 6:37-51

Cardoso AVN, Lescano SAZ, Amato Neto V, Gakiya E, Santos SV. Brief Communication - Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. Rev. Inst. Med. Trop. 2006; 48(5):287-289

Cardoso RCV, Leite CC, Guimarães AG, Mascarenhas J, Boulhosa RSS, Costa GOB et al. Análise microbiológica de caldos de cana vendido em distritos sanitários da cidade de Salvador-BA. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos - ENAAL; 10 a 13 de Junho de 2007; Fortaleza, CE Resumo expandido em CD-ROM.

Carvalho LR, Magalhães JT. Avaliação da qualidade microbiológica dos caldos de cana comercializados no centro de Itabuna – BA e práticas de produção e higiene de seus manipuladores. Rev. Baiana Saúde Públ. 2007; 31(2):238-45.

Castanho REP, Martins LPA, Godoy CAP, Rosa RM. Infecção experimental de camundongos através da ingestão de caldo de cana contaminado por *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. 2002; 35(1): 176

Centers for Diseases Control and Prevention. American Trypanosomiasis [Internet]. American Trypanosomiasis. [acesso em 15 out 2016]. Disponível em <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Indicadores da Agropecuária - Observatório Agrícola. 2016; 8:20-22.

Corbisier P, Broothaerts W, Gioria S, Schimmel H, Burns M, Baoutina A et al. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 1. Effect of DNA extraction methods on the quantitative determination of Bt 176 corn by Real-Time PCR. J. Agric. Food Chem. 2007; 55:3249-3257

Coura JR. Relatório apresentado ao Instituto Nacional de Endemias Rurais, Ministério da Saúde, sobre surto de doença de Chagas Aguda ocorrido em Teutônia, Município de Estrela, Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro; 1966.

Coura JR, Moreira CJC, Junqueira ACV. Enfermidade de Chagas na Região Amazônica. [acesso em 15 set 2016]. Disponível em http://cspace.eportuguese.org/tiki-download_file.php?fileId=379

Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Outlook: Chagas Disease [série online]. 2010; 465 (7301 suppl.): S3-S22. [acesso em 10 out 2016]. Disponível em <http://www.nature.com/outlooks>

De Á Santos LA, Cavalheiro AJ, Tempone AG, Correa DS, Alexandre TR, Quintiliano NF, Rodrigues-Oliveira AF, Oliveira-Silva D, Martins RC, Lago JH. Antitrypanosomal Acetylene Fatty Acid Derivatives from the Seeds of *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae). Molecules. 2015; 20: 8168-8180

Dias E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1934; Tomo XXVIII, Fascículo 1

Dias JCP, Amato Neto V, Luna EJA. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2011; 44(3):375-379

Dias JCP. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006; 39(4): 370-375

Dias JCP, Amato Neto V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2011; 44(Supl II):68-72

Diaz-Ungría C. Estudio experimental del *Trypanosoma cruzi* en el perro y otros vertebrados. El problema de la transmisión. Kasmera (Venezuela). 1968; 3:73-88

Diaz-Ungría C. La mosca doméstica como transmisora del *Trypanosoma cruzi*. Rev. Fac. Med. Univ. Zulia. 1969; 44:114-119

Diaz-Ungría C, Bracho JS. Camino que sigue el *Trypanosoma cruzi* en perros infectados por la vía bucal: nuevos estudios. Rev. Vet. Vziana. 1970; 29:271-278

Diaz-Ungría C, Zeuss M. Transmisión del *Trypanosoma evansi* a partir de heces de animales infectados por vía bucal. Rev. Vet. Vziana. 1971; 30:187-193

Donadio LC, Mouro FV, Servidone A A. Frutas brasileiras. 2ª ed. Jaboticabal: Novos Talentos; 2004.

Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 1987; 19:11-15

FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2014. Multicriteria-based ranking for risk management

of food-borne parasites. Microbiological Risk Assessment Series No. 23. Rome.

Ferrari CS, Valente LL, Brod FCA, Tagliari C, Sant'Anna ES, Arisi ACM. Evaluation of polymerase chain reaction and DNA isolation protocols for detection of genetically modified soybean. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2007; 42:1249-1255

Ferreira DD. Reposicionamento de fármacos e estudo de novas combinações terapêuticas no tratamento etiológico da doença de Chagas. [Dissertação]. São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2014

Ferreira ILM, Silva TPT. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39(5):507-509

Ferreira LF, Jansen AM, Araújo A. Chagas disease in prehistory. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2011a; 83(3):1041-4.

Ferreira RTB, Melandre AM, Branquinho MR, Fracalanza SAP, Cardarelli-Leite P. Uso da técnica de PCR na detecção de *Trypanosoma cruzi* em alimentos contendo açaí. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia; 2 a 6 de outubro de 2011b; Foz do Iguaçu (PR). Resumo:914-1

Ferreira RTB, Branquinho MR, Leite PC. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. *Vig Sanit Debate.* 2014; 2(04):4-11

Ferreira RTB, Melandre AM, Cabral ML, Branquinho MR, Cardarelli-Leite P. Extraction of *Trypanosoma cruzi* DNA from food: a contribution to the

elucidation of acute Chagas disease outbreaks. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2016; 49(2):190-195

Food and Drug Administration - FDA [Internet]. FDA approves first U.S. treatment for Chagas disease. 2017. [acesso em 04 set 2017]. Disponível em:

<https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm573942.htm>.

Fregonesi BM, Yokosawa CE, Okada IA, Massafra G, Braga Costa TM, Prado SPT. Polpa de açaí congelada: características nutricionais, físicoquímicas, microscópicas e avaliação da rotulagem. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2010; 69(3): 387-95.

Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS). Programa de Controle da Doença de Chagas - Plano Operativo Amazonas. Amazonas: ASCOM; 2011.

Neves DP, Melo AL, Linardi PM. Parasitologia humana. 12^a. ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2011.

Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000; 95:557–565.

Galhardo MCG, Martins IA, Hasslocher- Moreno A, Xavier SS, Coelho JMC, Vasconcelos ACV, Ribeiro RS. Reativação da infecção por *Trypanosoma cruzi* em paciente com síndrome de imunodeficiência adquirida. Revista da Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1999; 32(3): 291-294.

Hotez PJ, Dumonteil E, Cravioto MB, Bottazzi ME, Tapia-Conyer R, Meymandi S, Karunakara U, Ribeiro I, Cohen RM, Pecoul B. An Unfolding

Tragedy of Chagas Disease in North America. PLoS Negl. Trop. Dis. 2013; 7(10): 1-4.

Jansen AM, Deane MP. *Trypanosoma cruzi* infection of mice by ingestion of food contaminated with material of the anal gland of the opossum *Didelphis marsupialis*. In: Reunião sobre Pesquisa Básica em Doenças de Chagas; 1985; Caxambu (MG). Anais do evento; 1985. p. 39

Kierszenbaum F, Gottlieb CA, Budzko DB. Antibodyindependent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. J. Parasitol. 1981; 67:656–660.

Kirchhoff LV, Gam AA, Gilliam FC. American trypanosomiasis (Chagas' disease) in Central American immigrants. Am. J. Med. 1987; 82(5): 915-20

Kuskoski EM, Fett P, Asuero AG. Antocianos: un grupo de pigmentos naturales. Aislamiento, identificación y propiedades. Alimentaria. 2002; 2(61): 61-74.

Labello-Barbosa R. Perspectives on foodborne parasites. Adv. Food. Technol. Nutr. Sci. Open J. 2015; 1(4):82- 83.

Lainson R, Shaw JJ, Naiff RD. Chagas' disease in the Amazon Basin: speculation on transmission per os. Rev. Inst. Med. Trop. 1980; 22:294-7.

Liarte DB. Desenvolvimento de uma PCR multiplex capaz de detectar e classificar cepas de *Trypanosoma cruzi* em amostras clínicas e de campo. [Dissertação]. Belo Horizonte (MG): Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas René Rachou; 2006.

Lima JN. Co-infecção da doença de Chagas e da síndrome da imunodeficiência adquirida: frequência de casos em acompanhamento, perfil

clínico, laboratorial e evolução dos pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP. [Tese]. Campinas (SP): Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas; 2001

Lustosa ES. Crescimento e diferenciação do *Trypanosoma cruzi* em meio líquido. Rev. Pat. Trop. 1978; 7(3,4):183-192

Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. *Trypanosoma cruzi*: Genetic Structure of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2004; 99(1):1-12

Machado DC, Gomes RB, Cardoso RL, Batista DVS, Tavares JTQ. Esterilização e engarrafamento de caldo de cana: avaliação sensorial e físico-química. Enciclopédia Biosfera. 2013; 9(16):2771-2777

Marcondes CB, Dias JCP, Guedes LA, Ferrai Filho AN, Rodrigues VLCC, Mendonça DD. Estudo epidemiológico de fontes de alimentação sanguínea dos triatomíneos da Fazenda Aroeira (Catolé do Rocha, Paraíba) e Circunvizinhanças. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1991; 24:137-140

Martins AV, Gomes AP, Mendonça EG, Fietto JLR, Santana LA, Oliveira MGA et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. Infectio. 2012; 16(1):45-58

Martins LPA, Castanho REP, Nogueira AB, Silva OT, Gusmao AS. Incidence of *Trypanosoma cruzi* transmission through breastfeeding during acute experimental Chagas disease. Braz. J. Infect. Dis. 2011; 15(2): 116-118

Mazza S, Montana A, Benitez C, Janzi E. Transmisión del *Schizotripanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas. MEPRA. 1936; 28:41-49

Meirelles MN, Souza W. Killing of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*, and survival of *Toxoplasma gondii*, in chicken macrophages *in vitro*. J. Submicrosc. Cytol. 1985; 17:327–334.

Menezes SEM, Deliza R, Chan HL, Guinard JX, Rosenthal A. Opinião de consumidores brasileiros e norte-americanos sobre açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.). Journal of Fruits and Vegetables. 2015; 1(1):88-92

Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Tóye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature. 1978; 272:819 - 821. doi:10.1038/272819a0

Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN). Doença de Chagas Aguda Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2004

Ministério da Saúde. Brasil. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Doença de Chagas: Textos de apoio. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 1989

Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Estado da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 7ªed. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2009a.

Ministério da Saúde. Brasil. Vigilância em saúde: Zoonoses, Série B, Textos Básicos de Saúde, Cadernos de Atenção Básica. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2009b. n. 22

Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 2014. [Acesso em 10 jan 2017]. Disponível em

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_unificado.pdf

Miranda DLC, Sanquetta CR, Costa LGS, Corte APD. Biomassa e Carbono em *Euterpe oleracea* Mart., na Ilha do Marajó – PA. Floresta e Ambiente. 2012; 19(3):336-343

Monteiro S. Açaí: Da fruta exótica à vedete de consumo. Frutas e Derivados. 2006; 1(2): 29-32

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. J. clin. microbiol. 1989; 27(7):1477-1482

Muñoz-Calderon A, Diaz-Bello Z, Valladares B, Noya O, Lopez MC, Alarcón de Noya B, et al. Oral transmission of Chagas disease: typing of *Trypanosoma cruzi* from five outbreaks occurred in Venezuela shows multiclonal and common infections in patients, vectors and reservoirs. Infect. Genet. Evol. 2013; 17:113–22.

Nattan-Larrier L. Infections à Trypanosomes et voies de penetrations des virus. Bull. soc. pathol. exotique. 1921; 14:537-542

Neves DP, Melo AL, Linardi PM. Parasitologia humana. 12^a. ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2011.

Neves LTBC, Campos DCS, Mendes JKS, Urnhani CO, Araújo KGM. Qualidade de frutos processados artesanalmente de açaí (*Euterpe oleracea* MART.) e bacaba (*Oenocarpus bacaba* MART.). Rev. Bras. Frutic. 2015; 37(3):729-738

Neves VC. Avaliação de protocolos de extração de DNA empregados na detecção de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 por PCR em triatomíneos. [Dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Oswaldo Cruz; 2010.

Nicholls RS, Cucunubá ZM, Knudson A, Florez AC, Montilla M, Puerta CJ, et al. Acute Chagas disease in Colombia: a rarely suspected disease. Report of 10 cases presented during the 2002-2005 period. *Biomedica*. 2007a; 27(Suppl 1):8–17.

Nicholls RS, Cucunubá ZM, Flórez C, Montilla M. Enfermedad de Chagas agudo: Un incremento en el número de casos ocurridos en 2006. Colombia: Ministerio de Salud. 2007b;367-78.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. *Emerg. infect. dis.* 2009; 15(4):653-655

Oliveira LR, Assis LLT, Maltos AL, Calil MCFR, Moraes-Souza H. Reativação da doença de Chagas com envolvimento do sistema nervoso central durante tratamento de linfoma não Hodgkin. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010; 32(3):269-272

Oliveira MSP, Carvalho JEU, Nascimento WMO, Müller CH. Cultivo do açaizeiro para produção de fruto. Circular Técnica 26. Belém: EMBRAPA; 2002.

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. Rio de Janeiro (RJ): PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS; 2009

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) / Organização Mundial da Saúde (OMS). [Internet]. Enfermedad de Chagas. [Acesso em 17 out 2016]. Disponível em http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es

PANAFTOSA. Relatório Técnico - Consulta Técnica em Epidemiologia, Prevenção e Manejo da Transmissão da Doença de Chagas como Doença Transmitida por Alimentos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006; 39(5):512-514

Pará (Estado). Decreto nº 2.475, de 10 de setembro de 2010. Dispõe sobre a implementação do Programa Estadual de Qualidade do Açaí, e dá outras providências. Diário Oficial do Estado, Pará, 13 set 2010. Executivo I, p. 5

Pará (Estado). Decreto nº 326, de 20 de janeiro 2012. Estabelece regras para cadastramento dos batedores artesanais de açaí e bacaba; padrões para instalações, materiais, máquinas e equipamentos; condições higiênico-sanitárias e boas práticas de processamento, e atividades de inspeção e fiscalização. Diário Oficial do Estado, Pará, 24 jan 2012. Executivo I, p. 5

Passos LAC, Guaraldo AMA, Barbosa RL, Dias VL, Pereira KS, Schmidt FL, Franco RMB, Alves DP. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo in vitro e in vivo. Epidemiol. Serv. Saúde. 2012; 21(2):223-232

Peano C, Samson MC, Palmieri L, Gulli M, Marmiroli N. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extract from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. J. Agric. Food Chem. 2004; 52:6962-6968

Pereira PC, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 2013; 19(1):34.

Pinto AS, Lana M, Britto C, Bastrenta B, Tibayrenc M. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. Int. J. Parasitol. 2000; 30:843-8.

Pinto EG, Pimenta DC, Antoniazzi MM, Jared C, Tempone AG. Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 2013; 135(4): 655-60

Pinto PLS, Amato Neto V, Nascimento SAB, Souza HBWT, Miyamoto A, Moreira AAB, Braz LMA. Observações sobre a viabilidade do *Trypanosoma cruzi* no caldo da cana. Rev. Inst. Med. Trop. 1990; 32(5):325-327

Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. Rev. Saúde Pública. 2003; 37(1):107-15

Prado SPT, Bergamini AMM, Ribeiro EGA, Castro MCS, Oliveira MA. Avaliação do perfil microbiológico e microscópico do caldo de cana *in natura* comercializado por ambulantes. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2010; 69(1):55-61

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. THE LANCET Infectious Diseases. 2001; 1:92-100

Queiroz M, Cunha SC, Rogez H. Impacto da pasteurização no suco de açaí (*Euterpe Oleracea* Mart.) sobre a atividade da peroxidase. In: Congresso da Associação Brasileira de Química; 21 a 25 de Setembro 1998; São Luís (MA). Resumo QA 99. p.171-172.

Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, Silva AJ. Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. PLoS Negl. Trop. Dis. 2012; 6(7)(e1689):1-8

Ramirez JD, Montilla M, Cucunuba ZM, Florez AC, Zambrano P, Guhl F. Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia. PLoS Negl. Trop. Dis. 2013; 7,e2041.

Rey L. Bases da parasitologia médica. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Rodriguez, B, Maya, B, Blanco, M, Nicholls, S, Hernández, CA, Gualdrón, LE. Estudio de un brote de carditis chagásica aguda en una población adulta. Acta Méd. Colomb. 1992; 17(Supl 1):280.

Rogez H. Açai: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação. Belém:UFPA; 2000

Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. Biomédica. 2014; 34(4):631-641

Russomando G, Rojas de Arias A, Almiron M, Figueredo A, Ferreira ME, Morita K. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *T. infestans*. Exp. Parasitol. 1996; 83:62-6.

Sangenis LHC, Nielebock MAP, Santos CS, Silva MCC, Bento GMR. Transmissão da doença de Chagas por consumo de carne de caça: revisão sistemática. Rev. Bras. Epidemiol. 2016; 19(4):803-811

Santos MF, Harper PM, Williams DE, Mesquita JT, Pinto ÉG, da Costa-Silva TA, Hajdu E, Ferreira AG, Santos RA, Murphy PJ, Andersen RJ, Tempone AG, Berlinck RG. Anti-parasitic Guanidine and Pyrimidine Alkaloids from the Marine Sponge *Monanchora arbuscula*. *J. Nat. Prod.* 2015; 78(5):1101-12.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica.* 2010; 115(1-2):14-21

Schofield CJ. *Trypanosoma cruzi*. The Vector-parasite Paradox. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2000; 95(4):535-544

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2005; 38 (Supl III)

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Ministério da Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Bol. epidemiol.* 2015; 46(21)

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Ministério da Saúde. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2016; 25 (Espec.): 7-86

Segovia M, Carrasco HJ, Martínez CE, Messenger LA, Nessi A, Londoño JC, Espinosa R, Martínez C, Alfredo M, Bonfante-Cabarcas R, Lewis MD, Noya BA, Miles MA, Llewellyn MS. Molecular Epidemiologic Source Tracking of Orally Transmitted Chagas Disease, Venezuela. *Emerg. infect. dis.* 2013; 19(7):1098-1101

Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev. Saúde Públ.* 1969; 3(2):153-157

Shikanai-Yasuda MA, Brisola Marcondes C, Guedes LA, Siqueira GS, Barone, AA, Dias JCP et al. Possible oral transmission of acute Chagas disease in Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. 1991; 33:351-7.

Shikanai-Yasuda MA, Ochs DE, Tolezano JE, Kirchhoff LV. Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1996; 90:649-51.

Silber AM, Búa J, Porcel BM, Segura EL, Ruiz AM. *Trypanosoma cruzi*: Specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. Exp. Parasitol. 1997; 85:225-32.

Silva RA, Mercado VTC, Barbosa GL, Rodrigues VLCC, Wanderley DMV. Situação atual da vigilância entomológica da doença de Chagas no Estado de São Paulo. Bepa 2011; 8(87): 4-13

Siqueira-Batista R, Gomes AP, Corrêa AD, Geller M. Moléstia de Chagas. 2^a ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio; 2007

Smith DS, Maxwell PW. Use of quantitative PCR to evaluate several methods for extracting DNA from corn flour and cornstarch. Food Control. 2007; 18:236-242

Smith DS, Maxwell PW, De Boer SH. Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato-derived products. J. Agric. Food Chem. 2005; 53:9848-9859

Soares VA, Dias JCP, Marsden PD, Garcia-Zapata MT. Sobrevivência do *T. cruzi* em caldo de cana. Resultados preliminares. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1987; 20(supl 2):38

Soccol CR, Schwab A, Kataoka CE. Avaliação microbiológica do caldo de cana (garapa) na cidade de Curitiba. Bol. Centro Pesq. Process. Aliment. (CEPPA). 1990; 8(2):116-25.

Sousa CL, Melo GMC, Almeida SCS. Avaliação da qualidade do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) comercializado na cidade de Macapá – AP. Boletim Centro Pesq. Process. Aliment (CEPPA).1999; 17(2):127-136

Sousa ESM. Avaliação experimental e revisão sistemática da transmissão do *Trypanosoma cruzi* pela cana de açúcar contaminada. [Dissertação]. Goiás (GO): Universidade Federal de Goiás; 2009

Sousa MAC, Yuyama LKO, Aguiar JPL, Pantoja L. Suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): avaliação microbiológica, tratamento térmico e vida de prateleira. Acta amaz. 2006; 36(4):483-496

Tomaz MA, Amaral JFT, Oliveira FL, Coelho RI. Tópicos especiais em produção vegetal IV [recurso eletrônico]. 1ª ed. Alegre (ES): CAUFES; 2013 [acesso em 2016 out 15]. Disponível em <http://www.producaovegetal.ufes.br>

Toso AM, Vial FU, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev. Med. Chile. 2011; 139:258-266

Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. Int. J. Parasitol. 1998; 28:85-104.

Valadares HMS. Análises populacionais em *trypanosoma cruzi* baseadas em microssatélites polimórficos de DNA. [Tese]. Belo Horizonte (MG): Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais; 2007

Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN. Epidemiologia e transmissão oral da doença de Chagas na Amazônia Brasileira. In: PANAFTOSA, editor. Consulta Técnica en Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA). Rio de Janeiro (RJ): PANAFTOSA; 2006. p.21-26

Varela MT, Dias RZ, Martins LF, Ferreira DD, Tempone AG, Ueno AK, Lago JH, Fernandes JP. Gibbilimbol analogues as antiparasitic agents-Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* (L.) *infantum*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016; 26(4):1180-1183

Vargas CHB, Almeida AA. Identificação dos insetos infestantes de alimentos através da micromorfologia de seus fragmentos. Revta. Bras. Zool. 1996; 13(3):737-46

Vieira ARA. Desenvolvimento e padronização de métodos para detecção de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*). [Dissertação]. Brasília (DF): Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília; 2015

Xavier SCC, Roque ALR, Bilac D, de Araújo VAL, Neto SFC, Lorosa ES, Silva LFCF, Jansen AM. Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. PLoS Negl. Trop. Dis. 2014; 8(5):e2878:1-8

Woody NC, Woody HB. American trypanosomiasis (Chagas' disease): first indigenous case in the United States. J Am Med Assoc. 1955; 159(7):676-7.

World Health Organization (WHO). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Weekly epidemiological record. 2015; 90(6):33–44.

World Health Organization (WHO). Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. Brasília (DF): World Health Organization; 2002.

Yeo, M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA et al. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol.* 2005; 35:225–233.

Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009; 104(1):101-107

Zambrano PCZ, Montilla M, Flórez A, Edgar P, Ramirez AN, Echeverría L, et al. Brotes de Síndrome Febril Asociado a Miocarditis Aguda Chagásica de Posible Transmisión Oral en el Departamento de Santander, Colombia, diciembre de 2008 a mayo de 2009. *Inf. Quinc. Epidemiol. Nac.* 2010;15:17-32.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro. 2009; 104(7):1051-1054.