

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Renata Trotta Barroso Ferreira

**DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM AÇAÍ: CONTRIBUIÇÃO  
PARA O ESTUDO DA TRANSMISSÃO ORAL DA DOENÇA DE  
CHAGAS**

Rio de Janeiro

2016

Renata Trotta Barroso Ferreira

**DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM AÇAÍ: CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA TRANSMISSÃO ORAL DA DOENÇA DE CHAGAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Paola Cardarelli-Leite  
Maria Regina Branquinho

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Ferreira, Renata Trotta Barroso

Detecção de *Trypanosoma cruzi* em açaí: contribuição para o estudo da transmissão oral da Doença de Chagas / Renata Trotta Barroso Ferreira. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2016.

161 f. : il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)– Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

Orientadoras: Paola Cardarelli Leite; Maria Regina Branquinho

1. Contaminação de Alimentos. 2. Euterpe. 3. Parasitologia de Alimentos. 4. *Trypanosoma cruzi*. 5. Doença de Chagas. 6. Reação em Cadeia da Polimerase. 7. Técnicas de Genotipagem. 8. Vigilância Sanitária de Produtos. I. Título

*Trypanosoma cruzi* detection in açaí: contribution to the study of oral transmission of Chagas Disease

Renata Trotta Barroso Ferreira

**DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM AÇAÍ: CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA TRANSMISSÃO ORAL DA DOENÇA DE CHAGAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Silvana do Couto Jacob (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

---

Edna Maria Morais Oliveira (Doutora)  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

---

Maria de Fátima Madeira (Doutora)  
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ)

---

Paola Cardarelli-Leite (Doutora) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

---

Maria Regina Branquinho (Doutora) – Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

Dedico aos meus pais por completar o sonho que tinham de ter duas filhas “doutoras”. Minha irmã através da Medicina, eu com a conclusão deste trabalho

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me impulsionar a trilhar novos caminhos, por estar comigo em todos os momentos e por me amar de maneira incondicional.

Aos meus pais, Reynaldo (*in memoriam*) e Aida, pela maneira intensa de me amar, por dedicarem suas vidas em prol de nossa família e por oferecer o que não possuíam quando crianças.

Ao meu marido, Cláudio, pelo amor, amizade e infinita paciência que sempre demonstra por mim.

Aos meus filhos, Matheus e Pedro Lucas (herança que Deus deixou para mim), pelo amor e alegria que me oferecem diariamente.

Aos meus irmãos, Rosane e Robson pelo amor, cuidado e carinho e meus queridos cunhados Lair, Rosane, Ronaldo e Rose pela amizade.

Aos meus queridos sobrinhos Fábio, Raphael, Larissa, Raphaele, Luisa e Ryan pela alegria quando estamos todos reunidos.

Às minhas orientadoras, Dr<sup>a</sup> Paola Cardarelli e Dr<sup>a</sup> Maria Regina Branquinho, pela orientação, incentivo e amizade.

À Dr<sup>a</sup> Paola Cardarelli por me receber em sua equipe de laboratório quando ainda era bolsista PIBIC e me impulsionar para o serviço público e para a área acadêmica. Sinceramente, não poderia imaginar que chegaria até aqui. Sou muito grata por isso!

À bolsista Aline Melandre e sua substituta Maria Luíza Cabral, pela preciosa ajuda na execução dos ensaios

Aos colegas do setor de Alimentos, Rafael Lawson e Sylvia, pela amizade e cooperação, principalmente nas dicas de formatação. Especialmente, ao Rafael pelo apoio na bancada.

Aos membros da banca, Dr<sup>a</sup> Silvana Jacob, Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Madeira, Dr<sup>a</sup> Edna Moraes, Dr<sup>a</sup> Lúcia Maria Jaeger, Dr<sup>a</sup> Célia Romão, Dr Antônio Eugênio pela contribuição nas bancas de exame de qualificação e seminários durante o curso de doutorado.

À Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Madeira, do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ), pela amizade e prontidão em ajudar todas as vezes que foi requisitada e pelo cultivo dos tripanosomatídeos.

Ao Dr<sup>o</sup> Otacílio Moreira (IOC) e seu aluno Ronald Sodré, pela colaboração com nosso trabalho na realização da genotipagem.

À Dr<sup>a</sup> Lúcia Maria Jaeger e sua aluna de doutorado Daniela pela colaboração nos ensaios de irradiação do açaí.

À Dr<sup>a</sup> Silvana Jacob, enquanto coordenadora do então Grupo Técnico de Alimentos (GT-AI) do INCQS, pelo interesse e incentivo ao desenvolvimento dessa linha de pesquisa.

A atual coordenadora do Núcleo Técnico de Alimentos (NT-AI) do INCQS, Rosane Alves, por intermediar e acordar os programas com as VISAs do RJ e Pará.

À chefe do departamento de Microbiologia, Suely Fracalanza pela amizade e permissão para fazer o curso de doutorado.

Ao vice-diretor de Vigilância Sanitária do INCQS, Sérgio Luiz da Silva pelo interesse e reconhecimento da importância do trabalho para o instituto.

Aos Laboratório Central do Estado do *Pará* LACEN-PA, Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Rio de Janeiro (SES/RJ) e Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará (SESPA), pelas coletas de amostras de alimentos.

Às coleções pertencentes a FIOCRUZ: “Trypanosoma de mamíferos silvestres, doméstico e vetores” (COLTRYP), “de Leishmania” do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), “de Protozoários” (COLPROT), “de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS), e ao Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) pelo fornecimento das cepas utilizadas nesse estudo.

Aos colegas Raphael Vasconcelos e Fernanda Sabagh pela amizade e cuidado para comigo quando nos aventuramos a coletar açaí de madrugada em Belém.

À amiga, Carla Rosas, pela oportunidade de ingresso na Fiocruz. Muito obrigada por receber meu currículo!

Aos colegas do departamento de Microbiologia, Aline, Ana Paula, Antônio, Carla Carlos, Carolina, Cátia Chaia, Cátia Cristina, Eliana, Esther, Marcelo, Márcia, Mariana, Marília, Nathália, Silvia, Valéria, pela amizade e incentivo.

Aos colegas que passaram pelo INCQS, mas que ainda estão guardados em meu coração, Érica, Glaucia, Priscila, Fernanda e Alessandra.

À Dr<sup>a</sup> Silvia Brício pela preciosa ajuda na formatação do manuscrito.

À Maria Fernanda Urbano pela edição das fotos enviadas para publicação na revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS, Dra. Kátia Christina Leandro, secretaria e demais funcionários, por todos os serviços e orientação prestados no decorrer deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária por compartilharem ensinamentos preciosos.

Ao serviço de Biblioteca do INCQS, em especial a Alexandre Medeiros e Vinícius pelo pronto atendimento na obtenção dos artigos.

Você não precisa ver toda a escada,  
apenas suba o primeiro degrau.

Martin Luther King, Jr.

## RESUMO

No Brasil, dentro e fora da Amazônia, vários casos de doença de Chagas aguda (DCA) foram registrados como surtos caracterizados por grupos de indivíduos reunidos em um só lugar, que, ao ingerir o mesmo tipo de alimento, adoeceram quase simultaneamente com febre e manifestações gerais de uma infecção sistêmica. Até o ano de 2004, a ocorrência da DCA por transmissão oral, relacionada ao consumo de alimentos, constituía um evento pouco conhecido ou investigado. Atualmente tornou-se frequente na região amazônica e está relacionada à ocorrência de surtos recentes em diversos estados brasileiros. Os recentes casos de DCA no Brasil estão relacionados com o consumo de suco de açaí onde a contaminação da própria fruta ou polpa ocorre através de resíduos de animais reservatórios ou insetos vetores infectados com o *Trypanosoma cruzi* em áreas endêmicas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de análise baseada na PCR para que produtos à base de açaí pudessem ser analisados quanto à presença de DNA de *T. cruzi*. Foram testados quatro métodos de extração de DNA e cinco pares de iniciadores para o ensaio de PCR. O método baseado no tampão CTAB foi escolhido e posteriormente uma validação desse método foi realizada. O método com o alvo nas sequências subteloméricas dos tripanosomatídeos foi escolhido para os ensaios de PCR e para isso foram realizados testes para avaliação de desempenho do método (limite de detecção, seletividade e estudo matriz). Após implantação do método, 140 amostras de alimentos à base de açaí foram coletadas no comércio dos estados do Rio de Janeiro e Pará. Treze amostras apresentaram resultado positivo para presença de *T. cruzi*. A caracterização molecular foi realizada seguindo o método da PCR *multilocus* e o resultado das amostras mostrou a prevalência dos genótipos TcI, TcIII e TcV. Este trabalho mostra pela primeira vez uma avaliação higiênico-sanitária quanto à presença de *T. cruzi* em amostras de alimentos à base de açaí coletadas no comércio do Pará e Rio de Janeiro, bem como a caracterização genotípica dessas amostras. A disponibilidade de um método para detecção de *T. cruzi* em alimentos será uma ferramenta poderosa na investigação epidemiológica de surtos, transformando evidências epidemiológicas em dados comprobatórios de que alimentos estejam efetivamente contaminados com *T. cruzi*. Além disso, facilitará o controle da qualidade

dos alimentos e a avaliação das boas práticas de fabricação que envolvem produtos à base de açaí. Apesar de existirem importantes estratégias sendo implementadas, o Brasil ainda se encontra num estágio embrionário e pontual no combate à doença de Chagas transmitida pelo consumo de açaí. São necessárias ainda estratégias para garantir a inocuidade do açaí mantendo suas propriedades sensoriais e nutricionais. Assim as Boas Práticas de Higiene, Boas Práticas de Manufatura e a aproximação entre instituições de ciência e os produtores de açaí são essenciais para contribuir na solução deste problema.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Açaí. Transmissão Oral. PCR. Genotipagem. Vigilância Sanitária

## ABSTRACT

In Brazil, inside and outside the Amazon region, several cases of acute Chagas disease (ACD) have been recorded as an outbreak characterized by a group of individuals gathered in one place who, by ingesting the same type of food, became sick almost simultaneously with fever and general manifestations of a systemic infection. Up to the year 2004, the occurrence of ACD by oral transmission, as associated with food consumption, constituted a scarcely known or investigated event. By the same token, what was originally considered a sporadic and circumstantial occurrence has now become frequent in the Amazon region, which is associated with the occurrence of recent outbreaks in several Brazilian states. Recent cases of ACD in Brazil are related to the consumption of açai juice where contamination of fruit itself or pulp occurs through waste reservoir animals or insect vectors infected with *Trypanosoma cruzi* in endemic areas. The aim of this study was to develop a methodology based on PCR for açai-based products could be analyzed for the presence of *T. cruzi*. We tested four *T. cruzi* DNA extraction methods and five pairs of primers for the PCR assay. The method based on CTAB buffer was chosen and then a validation of this method was performed. The method with the target in subtelomeric sequences of trypanosomatides was chosen for PCR assays and tests were carried out for evaluation of method performance (detection limit, selectivity and matrix *study*). After implementation of the method, 140 samples of food the açai based were collected in trade in the states of Rio de Janeiro and Pará. Thirteen samples were positive for the presence of *T. cruzi*. Molecular characterization was performed following the method of *multilocus* PCR and the results of the samples showed the prevalence of genotypes TcI, TcIII and TcV. This work shows, for the first time, a hygiene and health evaluation for the presence of *T. cruzi* in food samples açai-based collected in trade of Pará and Rio de Janeiro, as well as the genotypic characterization of these samples. The availability of the method for *T. cruzi* detection in food introduces a powerful tool in the epidemiological investigation of outbreaks as it turns epidemiological evidence into supporting data that serve to prove that foods are actually infected with *T. cruzi*. Furthermore, it facilitates both food quality control and the assessment of good manufacturing practices involving açai-based products. Although there are important

strategies being implemented by Brazil to combat Chagas disease transmitted via food, there is still a need for incentives to search for that knowledge generated assist in understanding the oral transmission of this parasite and its better interpretation of epidemiological, prevention and control. Besides the implementation of Good Hygiene Practices, Good Manufacturing Practices and the rapprochement between science institutions and producers of acai to contribute in solving this problem.

Keywords: Chagas Disease. *Trypanosoma cruzi*. Açai. Oral Transmission. Health Surveillance

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial da doença de Chagas.....	24
Figura 2 - Diferentes estágios de desenvolvimento do <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	25
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> e transmissão vetorial para hospedeiro mamífero. ....	26
Figura 4 - Distribuição epidemiológica das DTUs em humanos da América do Sul. Prevalência das formas cardíaca e assintomática nos países ao Norte da linha pontilhada e das formas cardíaca, digestiva e assintomática, ao Sul. ....	28
Figura 5 - Distribuição geográfica aproximada das DTUs nos ciclos selvagens e domésticos .....	29
Figura 6 - Rotas de migração da América Latina e estimativa do número de pessoas infectadas com <i>T.cruzi</i> em países não endêmicos.....	33
Figura 7 - Açazeiros, destacando infrutescência à direita. ....	36
Figura 8 - Frutos inteiros e descerrados açai do <i>Euterpe oleracea Mart.</i> .....	37
Figura 9 - Processamento industrial do açai .....	42
Figura 10 - Células de <i>T. cruzi</i> invadindo o epitélio da mucosa gástrica.....	48
Figura 11: Desenho esquemático da contaminação artificial do açai com células de <i>T. cruzi</i> .....	69
Figura 12: Representação esquemática para extração de DNA, mostrando as etapas da distribuição do açai, da contaminação artificial do açai e o processo de liofilização.....	72
Figura 13. Fluxograma para caracterização molecular por PCR <i>multilocus</i> de <i>T. cruzi</i> em DTUs. ....	80
Figura 14 - Gel de agarose a 2% com amplificações de cepas de referência com os iniciadores TCZ3 e TCZ4. ....	83
Figura 15: Gel de agarose a 2% com amplificações de cepas de referência com os iniciadores Tc189F e Tc189. ....	84
Figura 16: Gel de agarose a 2% com amplificações de DNA contaminado artificialmente com células de <i>T. cruzi</i> com os iniciadores Tc189F e Tc189R.....	86
Figura 17: Gel de agarose a 2% com amplificações de DNA contaminado artificialmente com células de <i>T. cruzi</i> com os iniciadores Tc189F e Tc189R:.....	87

Figura 18: Gel de agarose a 2% com ampliações de DNA de diferentes vegetais com os iniciadores VPRBCP1 e VPRBCP2. ....	88
Figura 19: Gel de agarose a 2% com ampliações de diferentes tipos de açaí com os iniciadores VPRBCP1 e VPRBCP2. ....	88
Figura 20: Gel de agarose a 2% com bandas de 100 pb das 18 extrações de DNA obtidas da validação com os iniciadores Tc189F e Tc189R. ....	89
Figura 21: Gel de agarose a 2% com ampliações de diferentes diluições de DNA de <i>T. cruzi</i> com 240 ng de DNA de açaí com os iniciadores Tc189F e Tc189R:.....	91
Figura 22: Gel de agarose a 2% com ampliações de cepas de referências com os iniciadores Tc189F e Tc189R .....	92
Figura 23: Gel de agarose a 2% mostrando ausência de amplificação de cepas de bactérias e fungos com os iniciadores Tc189F e Tc189R.....	93
Figura 24: Gel de agarose a 2% mostrando as ampliações com diferentes tipos de produtos com açaí.....	94
Figura 25: Gel de agarose a 2% com ampliações de amostras de açaí com os iniciadores Tc189F e Tc189R.....	95
Figura 26: Resultado das amostras coletadas no Rio de Janeiro em 2010. ....	97
Figura 27: Resultado das amostras coletadas no Pará em 2010.....	97
Figura 28: Resultado das amostras coletadas no Rio de Janeiro no período entre 2011 e 2012. ....	98
Figura 29: Resultado das amostras coletadas no Pará no período entre 2012 e 2015. ....	99
Figura 30: Gel de agarose a 3 % com ampliações de amostras de açaí com os iniciadores TCac e UTCC para a região SL-IR ac.....	101
Figura 31: Gel de agarose a 3 % com ampliações de amostras de açaí com os iniciadores TC1 e TC2 para a região SL-IR I e II.....	101
Figura 32: Gel de agarose a 3 % com ampliações de amostras de açaí com os iniciadores D71 e D76 para a região 24Sα.....	102
Figura 33: Curva de <i>melting</i> com ampliações dos controles positivos as cepas Y (Referência DTU TcII) e CL Brener (Referência DTU TcVI) e duas amostras de açaí com os iniciadores PR1 e Pr3 para a região do fragmento nuclear A10. ....	102
Figura 34: Curva de <i>melting</i> mostrando os controles positivos de <i>T. cruzi</i> e as amostras de açaí positivas.....	105

Figura 35: Gel de agarose mostrando a amplificação de DNA extraído de amostras consideradas positivas. ....	107
Figura 36 - Gel de agarose mostrando a amplificação de DNA extraído de amostras consideradas positivas. ....	108
Figura 37: Exposição da célula à solução contendo o detergente CTAB.....	113

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Informações nutricionais por 100g de Polpa de Açaí. ....	45
Quadro 2 - Surtos de doença de Chagas pela transmissão oral fora da Amazônia brasileira, no período de 1965 a 2009. ....	50
Quadro 3 - Surtos de doença de Chagas pela transmissão oral na Amazônia brasileira, no período de 1968 a 2010. ....	51
Quadro 4 - Relação de tripanosomatídeos utilizados neste estudo. ....	61
Quadro 5: Relação de bactérias e fungos usados no estudo. ....	63
Quadro 6: Iniciadores utilizados na avaliação ....	67
Quadro 7: Condições de PCR para a tipagem molecular. ....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado da quantificação de DNA em ng/ $\mu$ L das cepas de tripanosomatídeos, bactérias e fungos utilizados no estudo. ....	82
Tabela 2 - Média dos dados obtidos das extrações de DNA com CTAB e DNAzol com os respectivos desvios padrão e coeficientes de variação (%).....	85
Tabela 3: Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L), das 18 réplicas extraídas em 3 dias .....	89
Tabela 4: Resultado das amostras coletadas no Rio de Janeiro e Pará em 2010. ...	96
Tabela 5: Resultados das amostras coletadas nos anos de 2011 e 2012 no Rio de Janeiro. ....	98
Tabela 6: Resultado das amostras coletadas no Pará, no período de 2012 a 2015. ...	99
Tabela 7: Resultado da genotipagem em amostras de açai. ....	103

## SIGLAS E ABREVIATURAS

ACD – acute Chagas disease

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BDA - ágar batata dextrose

BHI - caldo infusão cérebro-coração

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

BPA - Boas Práticas Agrícolas

BPF – Boas Práticas de Fabricação

BR - Brasil

CLIOC - Coleção do Instituto Oswaldo cruz

CMRVS - Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância

COLPROT - Coleção de Protozoários

COLTRYP - Coleção de Trypanosoma de mamíferos silvestres, doméstico e vetores

CRE – controle dos reagentes de extração

CRM – controle dos reagentes do *mix*

CTAB - brometo de cetil-trimetil-amônio

DCA – doença de Chagas aguda

DM - Departamento de Microbiologia

DNA - ácido desoxirribonucleico

DO - densidade óptica

DTU - Discrete Typing Unit

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

g – grama

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INI - Instituto Nacional de Infectologista Evandro Chagas

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

JRC - Joint Research Centre

kGy - quilogray

L - Litro

*L. braziliensis* - *Leishmania braziliensis*

LABIMDOE - Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas

LACEN - Laboratório Central

M - molar

mL- mililitros

mM - miliMolar

MS - Ministério da Saúde

NaCl - cloreto de sódio

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NIH - National Institute of Health

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PA - Pará

PANAFTOSA - Centro Pan-Americano de Febre Aftosa

PAS - Programa Alimento Seguro

pb – pares de base

PBS - Tampão fosfato de sódio

PCR - reação em cadeia pela polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

PM – peso molecular

RJ - Rio de Janeiro

RNA - ácido ribonucleico

rpm - rotação por minuto

RS - Rio Grande do Sul

SC - Santa Catarina

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às micro e pequenas Empresas

SENAI - Serviço Nacional de Aprendizado Industrial

SESPA - Secretaria Estadual de Saúde Pública

SVS - Secretaria de Vigilância Sanitária

*T. cruzi* - *Trypanosoma cruzi*

T<sub>m</sub> - Temperatura de *melting*

*T. rangeli* - *Trypanosoma rangeli*

Tris-HCl - *Tris* (hidroximetil) aminometano

TSA - ágar triptona de soja

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

UK - United Kingdom

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

VISA – Vigilância Sanitária

WHO - World Health Organization

YMA - meio de extrato de levedura, extrato de malte

YPD - meio de extrato de levedura, peptona e dextrose

°C - grau Celsius

% - percentual

µL - microlitro

x g - força g

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	22
1.1 DOENÇA DE CHAGAS .....	22
1.1.1 Breve Histórico .....	22
1.1.2 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
1.1.3 Organização molecular, diversidade genética e caracterização molecular do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	27
1.1.4 Manifestações clínicas e tratamento da doença de Chagas .....	31
1.1.5 Vias de transmissão .....	32
1.2 AÇAÍ.....	35
1.2.1 Denominação .....	35
1.2.2 Colheita .....	37
1.2.3 Processamento .....	40
1.2.3.1 Processamento industrial .....	40
1.2.3.2 Processamento artesanal.....	42
1.2.4 Valor nutricional.....	44
1.3 DOENÇA DE CHAGAS TRANSMITIDA POR VIA ORAL E REGISTROS DE SURTOS ENVOLVENDO ALIMENTOS.....	46
1.4 ESTRATÉGIAS E AÇÕES GOVERNAMENTAIS PARA REDUZIR OS NÚMEROS DE CASOS DE DCA POR TRANSMISSÃO ORAL.....	51
1.5 MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS NAS ANÁLISES DE ALIMENTOS ..	54
1.6. JUSTIFICATIVA .....	56
2. OBJETIVOS .....	59
2.1 OBJETIVO GERAL: .....	59
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	59
3. METODOLOGIA.....	60

3.1 CEPAS UTILIZADAS NO ESTUDO .....	60
3.1.1 Cepas de <i>Leishmania</i> e de <i>Trypanosoma</i> .....	60
3.1.1.1 Cultivo .....	61
3.1.1.2 Extração de DNA.....	62
3.1.2 Cepas de bactérias e fungos.....	62
3.1.2.1 Cultivo das bactérias e fungos .....	63
3.1.2.2 Extração de DNA.....	64
3.2 ALIMENTOS UTILIZADOS NO ESTUDO DE AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS ....	64
3.2.1 Extração de DNA.....	65
3.3 AMOSTRAS DE ALIMENTOS COLETADAS NOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E PARÁ PARA SEREM ANALISADAS COM A METODOLOGIA DESENVOLVIDA .....	65
3.4 ESCOLHA DOS INICIADORES PARA PADRONIZAÇÃO DA PCR .....	66
3.4.1- Avaliação “ <i>in silico</i> ” da especificidade dos iniciadores .....	67
3.4.2 - Avaliação experimental da especificidade dos iniciadores.....	67
3.5 PROCEDIMENTO PARA ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> NA MATRIZ DE AÇAÍ. ....	68
3.5.1 Preparo do açaí.....	68
3.5.2 Contaminação artificial do açaí .....	69
3.5.3 Extração de DNA com quatro diferentes métodos .....	69
3.5.4 Avaliação da concentração e da pureza do DNA extraído .....	72
3.6 VERIFICAÇÃO DA AMPLIFICABILIDADE DO DNA EXTRAÍDO DE AÇAÍ.....	73
3.7 - AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DOS MÉTODOS SELECIONADOS .....	73
3.7.1 Validação do método de extração de DNA selecionado.....	73
3.7.2 Limite de Detecção.....	74
3.7.3 Seletividade.....	74
3.7.4 Estudo matriz .....	75

3.8 DETECÇÃO DO DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> POR PCR NAS AMOSTRAS DE AÇAÍ COLETADAS NO MERCADO.....	76
3.8.1 Preparo de acordo com tipo de amostra .....	76
3.8.1.1 Açaí, polpa de açaí, açaí com frutas, sorvete, picolé, mingau e néctar.....	76
3.8.1.2 Bombom e docinho.....	76
3.8.1.3 Semente e fruto de açaí .....	76
3.8.2 Metodologia de análise.....	77
3.9 GENOTIPAGEM POR PCR <i>MULTILOCUS</i> DE <i>T. cruzi</i> PROVENIENTES DE DNA EXTRAÍDOS DE AMOSTRAS DE AÇAÍ.....	77
3.10 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PELO SISTEMA SYBR® GREEN.....	80
4 RESULTADOS.....	82
4.1 EXTRAÇÃO DE DNA DAS CEPAS DE TRYPANOSOMATÍDEOS, BACTÉRIAS, FUNGOS E ALIMENTOS UTILIZADOS NO ESTUDO PARA AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS.....	82
4.2 ESCOLHA DOS INICIADORES PARA PADRONIZAÇÃO DA PCR .....	83
4.3 ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA .....	84
4.4 VERIFICAÇÃO DA AMPLIFICABILIDADE DO DNA EXTRAÍDO DE AÇAÍ.....	87
4.5 - AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DOS MÉTODOS SELECIONADOS .....	89
4.5.1 - Validação do método selecionado para extração de DNA .....	89
4.5.2 - Limite de detecção .....	90
4.5.3 Seletividade.....	91
4.5.4 Estudo matriz .....	93
4.6 DETECÇÃO DO <i>Trypanosoma cruzi</i> NAS AMOSTRAS DE AÇAÍ POR PCR CONVENCIONAL.....	94
4.7 GENOTIPAGEM POR PCR <i>MULTILOCUS</i> DE <i>T. cruzi</i> PROVENIENTES DE DNA EXTRAÍDOS DE AMOSTRAS DE AÇAÍ.....	100
4.8 PCR EM TEMPO REAL COM SISTEMA SYBR GREEN PARA DETECÇÃO DE <i>T. cruzi</i> EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS CONTENDO AÇAÍ.....	104

4.9 RESULTADOS DE COLABORAÇÕES COM OUTROS INSTITUTOS .....	105
4.9.1 Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ).....	106
4.9.2 Laboratório de Tecnologia e Análise Instrumental de Alimentos (Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia / Universidade Federal do Rio de Janeiro).....	108
5. DISCUSSÃO .....	109
6 CONCLUSÕES .....	125
7. PERSPECTIVAS.....	127
REFERÊNCIAS.....	128
APÊNDICE A - Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária	
APÊNDICE B - Extraction of <i>Trypanosoma cruzi</i> DNA from food: a contribution to the elucidation of acute ACD outbreaks	

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE CHAGAS

### 1.1.1 Breve Histórico

A transmissão natural da doença de Chagas começou há milhares de anos como uma enzootia, particularmente entre os animais silvestres, que ainda persistem em áreas, principalmente, como a região amazônica. Quando o homem invadiu os ecótopos naturais, a transmissão da doença para o homem aconteceu acidentalmente como uma antropozoonose. Como resultado do desmatamento para atividade da agricultura e pecuária na América Latina nos últimos trezentos anos, triatomíneos que eram incapazes de alimentar-se devido o deslocamento de animais silvestres começaram a colonizar áreas ao redor e dentro de casas. Eles adaptaram-se a este novo nicho, alimentando-se de sangue de humanos e animais domésticos como uma zoonose (COURA, 2007).

A doença de Chagas ou tripanossomose americana foi descoberta em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1878-1934), no município de Lassance, interior do Estado de Minas Gerais (CHAGAS, 1909).

O processo da descoberta iniciou-se em 1907, quando Chagas, pesquisador do Instituto Soroterápico Federal Manguinhos, chegou a Lassance, no norte de Minas Gerais, com a missão de combater a malária entre os trabalhadores da Estrada de Ferro Central do Brasil. Seu consultório e laboratório era um vagão de trem estacionado onde tinha oportunidade de ouvir os habitantes locais, assim ele soube que um inseto popularmente conhecido como “barbeiro”, era frequentemente encontrado nas residências precárias daquela região. O tal inseto era hematófago, de hábitos noturnos, que picava, principalmente, a face de crianças adormecidas e indefesas. O médico estudioso sabia que a Tripanossomíase Africana, ou doença do sono, era transmitida pela mosca tse-tsé e, talvez, isto o tivesse feito pensar que o “barbeiro” poderia ser

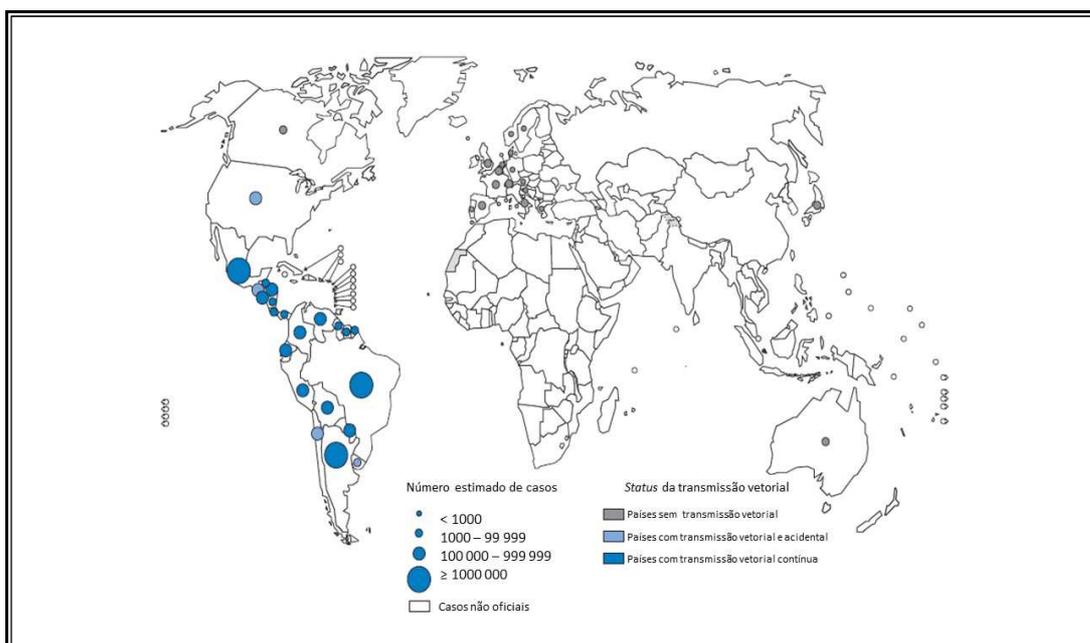
vetor de doença. Ao dissecar o inseto e examiná-lo ao microscópio, Chagas encontrou um protozoário flagelado no sistema digestivo do inseto. Curioso e inteligente, Carlos Chagas enviou barbeiros contaminados para o Instituto Manguinhos (atual Instituto Oswaldo Cruz), no Rio de Janeiro. Seguindo sua recomendação, o conteúdo fecal do intestino do inseto foi inoculado em cobaias, e aquele protozoário flagelado do intestino do inseto foi reencontrado no sangue do animal inoculado, semanas depois (CHAGAS, 1909).

Em 14 de abril de 1909, Chagas descobriu pela primeira vez formas flageladas do protozoário em lâminas com o sangue de uma criança febril, uma menina de dois anos, Berenice, em plena fase aguda da doença. A “Nova entidade mórbida do homem” resultou em um dos maiores feitos da história da medicina. Doutor Chagas identificou o inseto-vetor, o protozoário designado com o nome de *Trypanosoma cruzi* (homenagem ao seu orientador, o eminente sanitaria Oswaldo Cruz), descreveu os ciclos de vida do *T. cruzi* nos hospedeiros invertebrados (Hemiptera: Triatominae) e vertebrado (mamíferos de várias classes), e, ainda, documentou as manifestações clínicas na fase aguda e na fase crônica da doença. E naquele mesmo ano, foi nomeado pesquisador assistente do Instituto Oswaldo Cruz (KROPF et al, 2000).

Passados mais de 100 anos da sua descoberta, a doença de Chagas ainda é considerada uma doença negligenciada e está entre as dezessete doenças tropicais negligenciadas, atingindo cerca de 10 milhões de indivíduos infectados nas Américas, sendo que somente no Brasil há 2 milhões de chagásicos (Figura 1). Das doenças parasitárias, ela é considerada a que provoca o maior impacto sócio-econômico na América Latina, sendo responsável pela perda de produtividade estimada em US\$ 1.2 bilhão por ano (WHO, 2002, 2010, 2013).

HOTEZ et al., 2012 compararam a doença de Chagas como a epidemia do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) das Américas por ser transmitida pela via transfusional, por ter alto custo e pela falta de medicamentos.

Figura 1 - Distribuição mundial da doença de Chagas

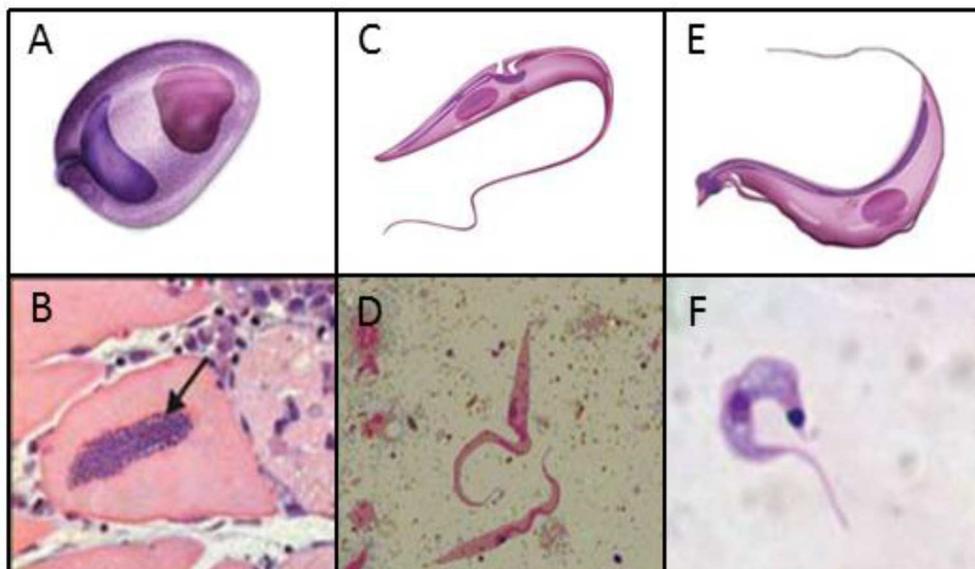


Fonte: WHO, 2010.

### 1.1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

A doença se estabelece por meio de um ciclo biológico complexo e ocorre pela transmissão do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), um protozoário flagelado, da Ordem Kinetoplastida e da Família Trypanosomatidae. Apresenta como formas evolutivas os tripomastigotas metacíclicos (forma infectante para o homem), epimastigotas (formas de multiplicação no vetor e em culturas), tripomastigotas sanguícolas e formas amastigotas que multiplicam-se dentro de células do hospedeiro (MORAES, 1971), como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Diferentes estágios de desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: A, C e E) Esquema das formas do *Trypanosoma cruzi*: amastigota, epimastigota e tripomastigota, respectivamente. B, D e F) Imagens do desenvolvimento do *T. cruzi*: ninho de amastigotas (seta), epimastigotas e tripomastigotas.

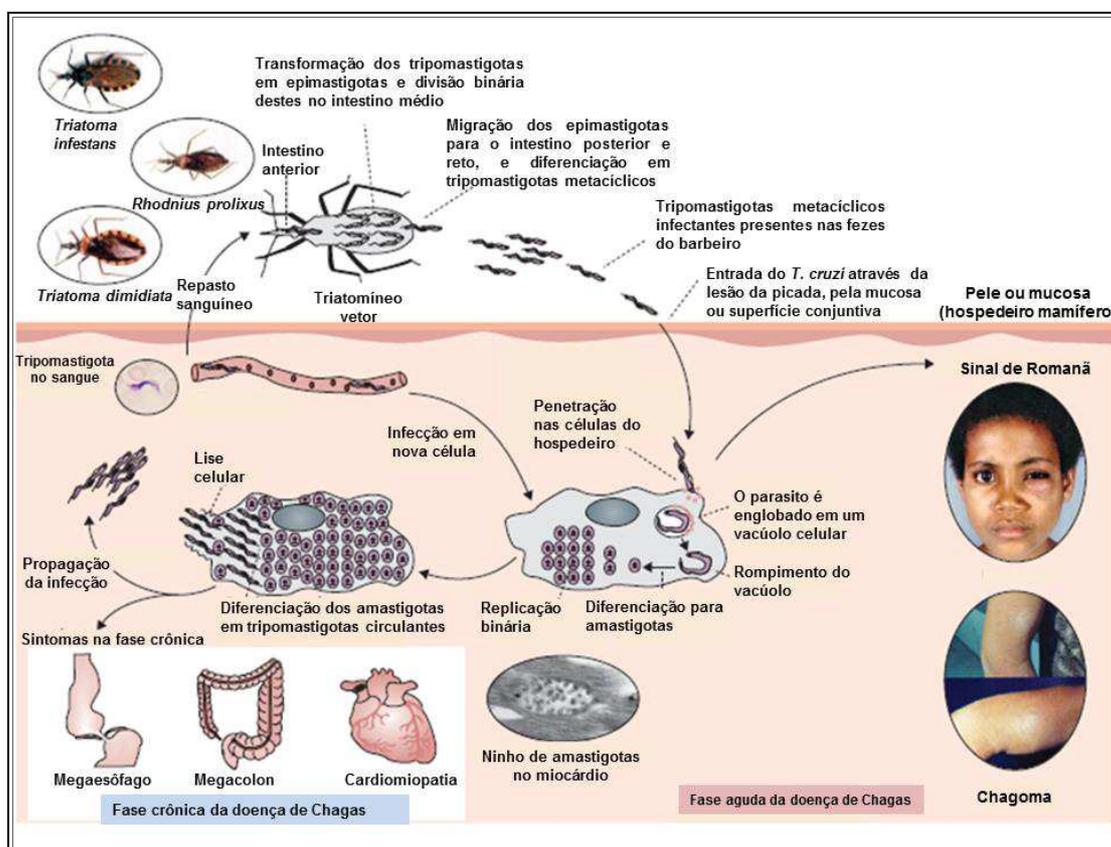
Fonte: Adaptado de Coura, 2012.

O ciclo inclui dois tipos de hospedeiros: o primeiro é um inseto hemíptero e hematófago, popularmente conhecido como barbeiro (triatomíneo), e o segundo, um mamífero reservatório que pode pertencer a diversas classes, como marsupiais e roedores (DEANE et al., 1984).

O ciclo de vida do *T. cruzi* relacionado à transmissão vetorial em mamíferos está representado na Figura 3. No intestino médio do triatomíneo infectado ocorre a multiplicação dos epimastigotas por divisão binária, em seguida, os parasitas se locomovem para a porção posterior do intestino e para o reto onde sofrem diferenciação para a forma infectante tripomastigota metacíclica. No momento do repasto sanguíneo os barbeiros liberam as suas excretas na pele do hospedeiro. Uma vez ocorrendo o contato dos dejetos contaminados com a região da picada ou com alguma mucosa, as formas tripomastigotas infectantes entram na corrente sanguínea e infectam diversos tipos celulares por processos como fagocitose, endocitose ou penetração ativa, sendo englobadas por um vacúolo parasitóforo. Ocorre a diferenciação para formas amastigotas e, após vários ciclos de replicação, os amastigotas se

transformam em tripomastigotas circulantes e rompem as células hospedeiras gerando um extravasamento dessa forma parasitos na corrente sanguínea. Com essa liberação, os protozoários infectam outras células do hospedeiro gerando uma grande propagação da infecção. O ciclo retoma a sua origem quando um inseto vetor não contaminado se alimenta do sangue infectado com tripomastigotas circulantes. Após passar pelo intestino anterior do barbeiro, o *T. cruzi* na forma tripomastigota se diferencia para epimastigota e depois para tripomastigota (RASSI JR et al., 2010; BARRIAS et al., 2013).

Figura 3 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e transmissão vetorial para hospedeiro mamífero.



Fonte: Adaptado de RASSI JR et al., 2010.

### 1.1.3 Organização molecular, diversidade genética e caracterização molecular do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* apresenta seu genoma organizado em uma região de DNA nuclear e outra extranuclear caracterizada, no caso dos membros da ordem Kinetoplastida, por uma mitocôndria única e alongada, constituindo o cinetoplasto (MYLER et al., 1993).

Em 2005 foi publicado o sequenciamento genômico da cepa de referência CL Brener do *T. cruzi*, classificada como TcVI, onde foi revelado que o genoma diploide do parasito possui aproximadamente 22.570 proteínas e que pelo menos 50% da sua composição consiste em sequências repetitivas, famílias de genes de proteína de superfícies e repetições teloméricas (EL-SAYED et al., 2005).

Baseado na genética molecular, em características ecoepidemiológicas e na patogenicidade, atualmente, foi reconhecido que as cepas de *T. cruzi* podem ser distinguidas em seis unidades de tipagem discretas (DTUs – *discrete typing units*), que levam a nomenclatura de TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI. DTU é definido como um conjunto de isolados geneticamente semelhante entre si, os quais podem ser identificados por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (ZINGALES et al., 2012).

De acordo com a classificação em DTUs, correlações com propriedades biológicas do parasito, clínicas e ecoepidemiológicas da doença de Chagas podem ser observadas.

Com relação à capacidade de multiplicação e sobrevivência em cultura celular, acelular e vetores, a capacidade de infectar animais de experimentação, e maior resistência a drogas tanto *in vivo* como *in vitro*, os isolados pertencentes a DTU TcI apresentaram maior capacidade. Em contraste, os isolados pertencentes a DTU TcII apresentaram valores menores em relação a essas variáveis, enquanto os isolados da DTU TcV apresentaram características intermediárias (BRENER et al., 1977, TOLEDO et al., 2002; MARTINS et al., 2006).

Segundo ZINGALES (2011), em uma revisão parcial da literatura sobre a distribuição das DTUs em humanos, há uma prevalência da DTU TcI em

pacientes do México, América Central, países do Norte da América do Sul e Amazônia. Nestes pacientes são observadas as formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas. Para outros países da América do Sul, a distribuição das DTUs em humanos é mostrada na Figura 4, onde se indica a prevalência das manifestações cardíaca e digestiva (CARRANZA et al, 2009).

As principais conclusões destas observações foram que as DTUs apresentam distribuição geográfica distinta; todas as DTUs são capazes de promover a doença em humanos; a DTU TcI não favorece a forma digestiva; as DTUs TcII e TcV aparentemente seriam mais “patogênicas”, promovendo as manifestações cardíaca e digestiva.

Figura 4 - Distribuição epidemiológica das DTUs em humanos da América do Sul. Prevalência das formas cardíaca e assintomática nos países ao Norte da linha pontilhada e das formas cardíaca, digestiva e assintomática, ao Sul.

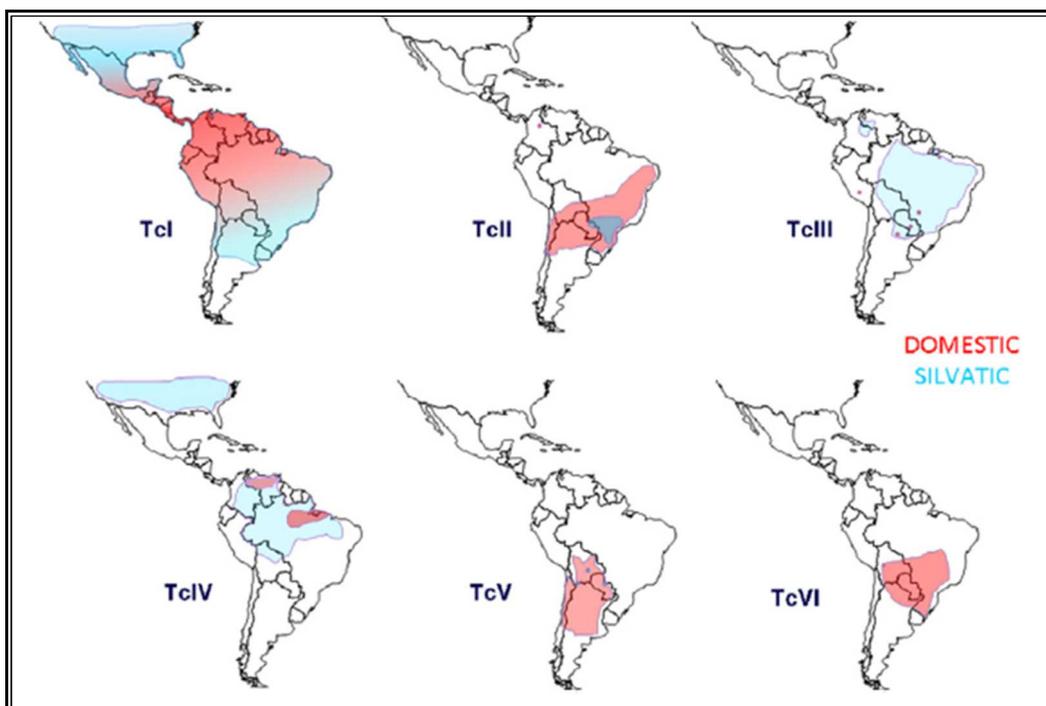


Fonte: Adaptado de ZINGALES, 2011

No que diz respeito às variações geográficas quanto à distribuição das DTUs nos ciclos domésticos e selvagens, ZINGALES et al., 2012 resumiram as associações das DTUs com nichos ecológicos, reservatórios, vetores e

manifestações da doença, como apresentadas a seguir e observadas na Figura 5.

Figura 5 - Distribuição geográfica aproximada das DTUs nos ciclos selvagens e domésticos



Fonte: ZINGALES et al.,2012.

Ainda, de acordo com Zingales e colaboradores (2012), o genótipo TcI é encontrado nas Américas do Norte, Central e América do Sul. No norte da Amazônia e em países do cone sul são observados pacientes com a forma cardíaca da doença. Os vetores silvestres onde este genótipo é encontrado são triatomíneos das espécies de *Rhodnius*, *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Eratyus*. Ele apresenta ainda como reservatórios animais arbóreos e semi-arbóreos como gambás, roedores, primatas, tamanduás e roedores terrestres. Os principais ecótopos são palmeiras, frestas de árvores, seguidos de rochas e parte terrestre na Amazônia.

O genótipo TcII é raro no ciclo selvagem, mas pouco se sabe sobre seus nichos ecológicos. Apresenta como reservatórios os primatas da Mata Atlântica, gambás e tatus do gênero *Euphactus* (Paraguai). Os triatomíneos são os vetores

silvestres onde foram encontrados até hoje. Este genótipo é encontrado no Cone Sul e de forma mais esporádica ao norte do Atlântico. Na região central e atlântica do Brasil são observados pacientes que apresentam a forma cardíaca e portadores de mega síndrome decorrentes da doença de Chagas.

O genótipo TcIII apresenta nichos ecológicos terrestre e fossorial, cujos reservatórios selvagens são tatus dos gêneros *Dasypus*, *Chaetophactus* e *Euphractus*, além de gambás, primatas e quatis. Os triatomíneos da espécie *Panstrongylus geniculatus* são seus vetores silvestres e estão distribuídos na América do Sul. São raros em humanos e cães domésticos. Os casos agudos estão localizados na Amazônia brasileira com apresentação clínica pouco conhecida.

O genótipo TcIV está distribuído nas Américas do Norte e do Sul. Possui nicho ecológico arbóreo, com alguns reservatórios terrestres no norte da América. Está associado a vetores dos gêneros *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma*. Seus reservatórios selvagens são primatas e quatis. É a causa secundária da doença de Chagas na Venezuela e casos esporádicos em outras partes da América do sul.

O genótipo TcV é encontrado no cone sul, extremo sul do Brasil e região do Gran Chaco. Os nichos ecológicos são raros em ciclos silvestres. Os hospedeiros selvagens são pouco conhecidos, os mais comuns são tatus dos gêneros *Dasypus*, *Euphractus* e roedores do gênero *Octodon*. Pouco se sabe sobre os vetores selvagens. Pacientes são encontrados no cone sul apresentando a forma cardíaca e portadores de mega síndrome decorrentes da doença de Chagas.

O genótipo TcVI apresenta raros nichos ecológicos nos ciclos silvestres com reservatórios e vetores selvagens pouco conhecidos. Sua distribuição restringe-se ao cone sul e Gran Chaco. Pacientes são encontrados no cone sul apresentando a forma cardíaca e portadores de mega síndrome decorrentes da doença de Chagas.

#### 1.1.4 Manifestações clínicas e tratamento da doença de Chagas

A doença apresenta duas fases distintas dependendo das manifestações clínicas: a inicial ou aguda e a crônica. Entretanto, na grande maioria dos casos a infecção permanece assintomática ao longo da vida do paciente, sendo diagnosticada apenas ocasionalmente pelo exame médico ou pela triagem em banco de sangue (PRATA, 2001).

Na fase aguda, cerca de 95% dos pacientes não apresentam sintomas clínicos e a infecção subclínica assintomática pode não ser diagnosticada, gerando subnotificação de novos casos. Nos demais casos, os sintomas observados vão de febre, dores musculares e articulares, mal-estar, diarreia, distúrbios respiratórios, cianose, coma, podendo culminar em morte, em menos de 5% dos casos, por miocardite ou meningoencefalite. Nesses casos pode ser observado sinal de porta de entrada do *T. cruzi*, o chagoma na pele ou sinal de Romaña com edema endurecido, bipalpebral, unilateral (Figura 3). No início da infecção aguda altos níveis de parasitemia são detectados pelos testes parasitológicos, e os testes sorológicos mostram anticorpos IgM anti-*T. cruzi*. Raramente fatal, os sintomas da fase aguda desaparecem ao longo de quatro a oito semanas e a partir de então os pacientes entram na fase crônica da infecção, clinicamente indeterminada (TEIXEIRA et al, 2006).

Durante a fase crônica, dois terços das pessoas infectadas por *T. cruzi* permanecem assintomáticas ao longo da vida. Passadas duas a três décadas pós infecção inicial, um terço dos indivíduos desenvolvem sintomatologia. Em 94,5 % dos casos ocorrem lesões graves no coração, e os 4,5 % remanescentes desenvolvem a síndrome dos mega, megaesôfago e megacólon, que afeta o sistema digestivo (TEIXEIRA et al, 2006). As manifestações mais severas da doença são arritmias, tromboembolia e insuficiência cardíaca, que pode conduzir à morte súbita (PASSOS, 2010).

O tratamento da doença de Chagas é um assunto bastante controverso, com duas vertentes opostas quanto à a funcionalidade, à eficiência e aos efeitos colaterais do tratamento (KEENAN, 2013). As drogas utilizadas para o tratamento são o Nifurtimox e o Benzonidazol, nitroderivados com ação anti-tripanosoma. A eficiência de ambas no tratamento de recém-nascidos e durante

a fase aguda, tem sido relatada pela Organização Mundial de Saúde, enfatizando o limitante do tratamento durante a fase crônica (WHO, 2012).

Um novo medicamento está sendo desenvolvido pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC) em parceria com o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) e outras unidades da Fiocruz. Trata-se de um medicamento à base de selênio, um elemento químico com ação anti-oxidante, com a finalidade de reduzir em até 50% as taxas de evolução da cardiopatia nos pacientes crônicos. (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2015).

O projeto está na fase de ensaio clínico com pacientes crônicos. Este projeto surge como decorrência natural de resultados pré-clínicos anteriores, indicando que a redução nos níveis séricos de selênio pode ser um co-fator da gravidade da miocardiopatia chagásica. Estudos demonstram que a suplementação com 100 mg de selênio pode prevenir a morte por arritmias, cardiomegalia, e proporcionar aumento da fração de ejeção ventricular em modelos animais de infecção de doença de Chagas, além de ter efeitos imunestimulantes (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2015).

Estudos mostram ainda a possibilidade de uma candidata vacinal para pacientes na fase crônica da doença a fim de reverter os sintomas cardíacos da doença (PEREIRA et al, 2015).

#### 1.1.5 Vias de transmissão

A transmissão do *T. cruzi* para o ser humano pode ocorrer pelas principais vias: vetorial, transfusional, congênita, acidentes em laboratórios e via oral.

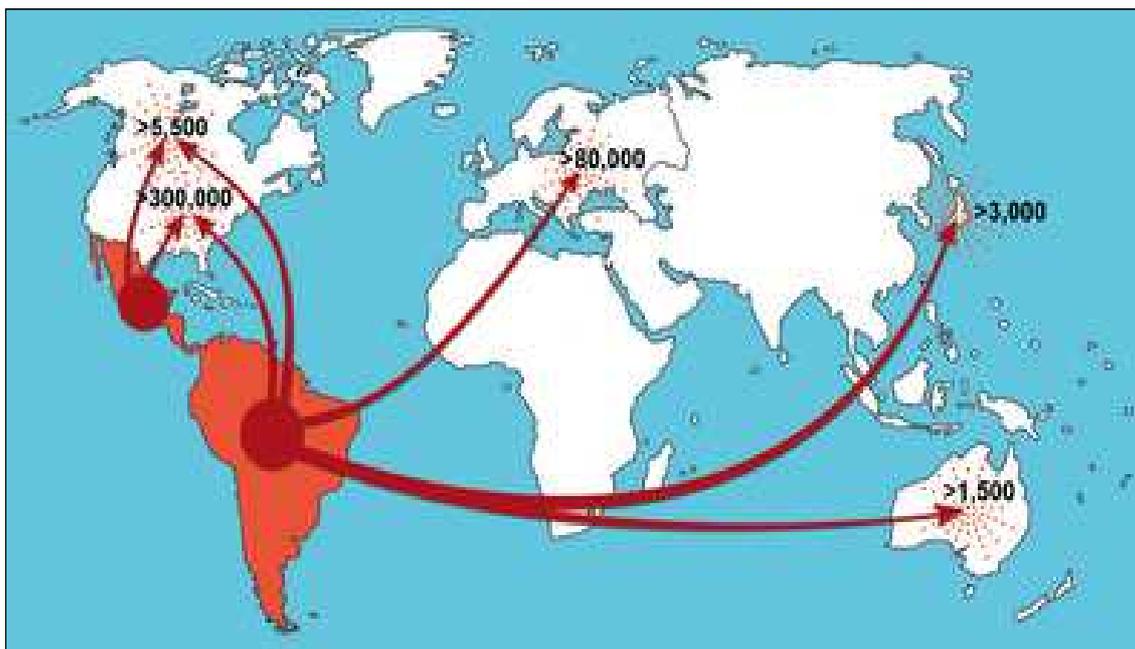
Em áreas endêmicas, a principal forma de transmissão do *T. cruzi* é através de um inseto vetor. A transmissão vetorial ocorre no momento do repasto sanguíneo quando os barbeiros liberam as suas excretas na pele do hospedeiro. Uma vez ocorrendo o contato dos dejetos contaminados com a região da picada ou com alguma mucosa, as formas tripomastigotas infectantes entram na corrente sanguínea. Apesar da transmissão vetorial ser um evento característico de áreas endêmicas foram relatados na bibliografia casos de infecção autóctone em países não endêmicos como nos Estados Unidos (DORN et al, 2007), sendo

recentemente detectados triatomíneos infectados com *T. cruzi* em áreas domiciliares e peridomiciliares (KJOS et al, 2013).

A doença que primariamente era uma infecção rural passou a ser uma doença urbana também transmitida por transfusão sanguínea. No mundo, a transmissão via transfusão pode ser considerada a segunda forma mais frequente de contaminação pelo *T. cruzi* (SCHMUNIS, 2007). A via transfusional, devido ao eficiente sistema de triagem de doadores nos bancos de sangue, sofreu redução significativa no Brasil (DIAS et al., 2008). Por outro lado, esta via vem assumindo importância nos Estados Unidos e na Europa pela crescente imigração de latinos de países endêmicos e a falta de controles específicos nos bancos de sangue (KJOS et al., 2013, STRASEN et al, 2013).

Coura e Viñas (2010) abordam essa problemática e demonstram através de uma estimativa do número de pessoas infectadas com *T. cruzi* em países não endêmicos para doença de Chagas: mais de 300 mil pessoas nos Estados Unidos, mais de 5 mil e quinhentas no Canadá, mais de 80 mil na Europa e região oeste do Pacífico, mais de 3 mil no Japão e mais de mil e quinhentas na Austrália, como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Rotas de migração da América Latina e estimativa do número de pessoas infectadas com *T. cruzi* em países não endêmicos.



Fonte: COURA e VIÑAS, 2010.

A ocorrência de casos de infecção da doença de Chagas via placenta não se restringe apenas às mulheres da zona rural de áreas endêmicas. Jackson e colaboradores (2009) relataram casos de transmissão congênita na Suíça e Lazarte e colaboradores (2012) descreveram o primeiro caso nos Estados Unidos. Apesar dos relatos, não há uma avaliação da incidência da transmissão congênita em áreas não endêmicas, contudo, na América Latina estima-se que a contaminação ocorra em mais de 15.000 nascidos por ano (CARLIER et al., 2011). Em geral, as gestantes chagásicas são crônicas e assintomáticas, contudo, podem apresentar um aumento no risco de parto prematuro, de bebê com baixo peso ou de natimorto (HOWARD et al., 2013). No Brasil, a prevalência da doença de Chagas na transmissão congênita está entre 0% e 5,2% (MARTINS- MELO et al., 2014).

A contaminação acidental de pessoas em jornada de trabalho já foi descrita tanto em países endêmicos como não endêmicos e, em geral, se resume a infecção de técnicos, médicos ou pesquisadores que trabalham com material contaminado, tais como cultura do parasito, sangue de pacientes e animais infectados (WHO, 2002).

Casos de transmissão do *T. cruzi* via aleitamento materno já foram descritos, contudo, como a grande maioria das mães já se encontra na fase crônica e apresenta baixa parasitemia, o aleitamento não deve ser proibido, em decorrência do seu extremo benefício quanto à saúde geral do bebê. É importante ressaltar que sangramento de mamilos durante amamentação pode indicar suspensão da amamentação (NORMAN e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

A transmissão pela via oral ocorre principalmente por ingestão de carne crua ou mal cozida de animais silvestres, ingestão de alimento contaminado com triatomíneos infectados ou suas fezes, ou ainda pelas secreções de alguns mamíferos infectados, popularmente conhecido como gambá (COURA, 2006). Esta via de transmissão vem apresentando altos índices entre populações de áreas endêmicas (Cone Sul: Brasil e Argentina) e países do norte da América do Sul (norte do Brasil, Bolívia, Colômbia e Venezuela), com grande importância pela sua frequência, dificuldade de controle, falta de reconhecimento e necessidade de novas estratégias de prevenção, uma vez que as demais vias encontram-se controladas, devido a medidas profiláticas e controle de vetores nas regiões endêmicas.

No caso dos alimentos, o açaí tem sido apontado como o mais frequente alimento envolvido nos casos de doença de Chagas aguda (DCA) por transmissão oral no Brasil (PASSOS et al., 2010).

## 1.2 AÇAÍ

### 1.2.1 Denominação

A palavra açaí é de origem tupi – yá-çai - e significa fruto que chora, ressuma ou deita água (BRAGA, 1976), provavelmente relacionado ao fato de que durante o processo de extração da polpa, esta flui lentamente, em forma de grandes gotas, tanto quando extraída manualmente como quando extraída em pequenas máquinas despulpadoras, de largo uso na Amazônia.

Segundo a lenda, há muitos anos vivia uma tribo indígena onde, hoje, está situada a cidade de Belém. Numa determinada época a escassez de alimentos se tornou um problema para seus habitantes, levando o cacique a decretar a proibição de nascimentos. Por ironia do destino, a filha do cacique, que se chamava laça, ficou grávida. O cacique não voltou atrás em sua decisão e mandou matar seu próprio neto. laça chorava dia e noite a perda do filho, até que uma noite ouviu o choro do filho vindo da direção de uma árvore que tinha umas frutinhas cor de vinho. No dia seguinte a índia laça foi encontrada morta, abraçada ao tronco dessa árvore. O cacique pediu, então, que os cachos da fruta fossem apanhados, tirando daí o vinho para alimentar os índios da tribo. Às frutinhas ele chamou Açaí, em homenagem à sua filha laça (açaí ao contrário), e acabou que revogou o decreto que proibia o nascimento de crianças, pois o açaí bastava para alimentar a todos (MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI, 2003).

Embora na terminologia vulgar seja mais conhecida como açaí, outras denominações são de uso frequente nas áreas de ocorrência na Amazônia brasileira, porém de forma mais restrita, destacando-se os seguintes nomes: açaí do Pará, açaí do baixo amazonas, açaí de touceira, açaí de planta, juçara e juçara de touceira (CALZAVARA, 1972). Os dois últimos nomes são bastante

usados no Estado do Maranhão, mas cientificamente é classificado como *Euterpe oleracea* Mart.

O epíteto genérico é uma homenagem a Euterpe, deusa da mitologia grega (MARCHIORI, 1995) e traduzido do grego significa “elegância da floresta”, em alusão à beleza da planta (STRUDWICK e SOBEL, 1986) como pode ser observada na Figura 7. Já o nome específico “oleracea” significa que parece ou exala odor semelhante ao do vinho, devido à cor e ao aroma da polpa, principalmente quando em início de fermentação.

Figura 7 - Açazeiros, destacando infrutescência à direita.



Fonte: FOLHA DO JURUÁ, 2016.

Convém ressaltar, ainda, que as outras espécies, do mesmo táxon genérico, ocorrentes na Amazônia, são igualmente denominadas de açáí, daí *E. oleracea* ser também chamada, em alguns locais, de açáí verdadeiro.

O açazeiro produz uma baga globosa, fibrosa com 0,5 cm de diâmetro, de cor pardo-violácea, contendo uma polpa oleaginosa e comestível, a semente possui o endocarpo duro e fibroso. Quando completamente maduro, é recoberto por uma capa branco-acinzentada (Figura 8).

Figura 8 - Frutos inteiros e descerrados açáí do *Euterpe oleracea* Mart



Fonte: RABELO, 2013.

### 1.2.2 Colheita

O açazeiro ocorre, espontaneamente, no Brasil, nos Estados do Amapá, Maranhão, Pará (CALZAVARA, 1972), Tocantins e no Mato Grosso (BALICK, 1986). Rompendo as fronteiras brasileiras, é encontrado na Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela (CALZAVARA, 1972) e Colômbia (BALICK, 1986). Distribuição mais ampla é apresentada por HENDERSON e GALEANO (1996), que assinalam a presença dessa palmeira, também, no Panamá, Equador e Trinidad.

As maiores áreas ocupadas com essa espécie, porém, encontram-se na Amazônia Oriental brasileira, mais precisamente na região do estuário do rio Amazonas, considerada como seu centro de origem e onde encontram-se densas e diversificadas populações, ocupando, com maior frequência, terrenos que, em função do fluxo e refluxo das marés, estão submetidos a inundações periódicas. É também encontrado em áreas permanentemente alagadas e em terra firme embora em densidades bem menores.

O açazeiro inicia seu ciclo de produção de frutos com a idade entre 3 e 4 anos. A sua inflorescência é formada por um conjunto de ramos com números variáveis de flores masculinas e femininas que, após o desenvolvimento dos frutos, é conhecido por cacho.

O florescimento ocorre durante todos os meses do ano, com o pico entre os meses de fevereiro e julho. Após a abertura (antese) e fecundação das flores, são necessários, aproximadamente, de 5 a 6 meses para os frutos atingirem a fase de colheita (EMBRAPA, 2008).

A produção anual de cachos frutíferos depende da fertilidade e umidade do solo, e da luminosidade. Cada cacho, frequentemente, contém algumas centenas de frutos que, quando maduros, têm a coloração roxo-escura, por isso muitas vezes é denominado de roxo ou preto, sendo exceção o açazeiro do tipo branco, com a coloração verde.

Na Região do Estuário Amazônico se destacam duas épocas perfeitamente diferenciadas para a produção de frutos de açazeiro. A safra de inverno corresponde à época das chuvas e os frutos, nesse período, normalmente são colhidos em diferentes estágios de maturação, têm a coloração roxo-azulada e o açaí produzido é considerado de qualidade inferior. A safra de verão ocorre no período de estiagem, com um volume de produção de duas a três vezes maior que a safra de inverno. Os cachos apresentam maior homogeneidade quanto ao estágio de maturação e o açaí obtido tem a coloração vermelho-arroxeadada, o qual é considerado de melhor qualidade sensorial.

No Estado do Amapá a produção de frutos é mais acentuada no período compreendido entre janeiro e junho, com picos de produção de fevereiro a abril e, no Estado do Amazonas, a produção vai de janeiro a agosto. Portanto, existem variações entre as diferentes regiões produtoras quanto ao período de produção de frutos (HOMMA et al., 2006).

A colheita se inicia aos 180 dias após a antese, ocasião em que o epicarpo apresenta uma coloração roxo-escura ou verde-escura, ambas recobertas por uma camada acinzentada (OLIVEIRA et al., 1998). A colheita é uma operação onerosa e difícil, pois os estipes atingem facilmente de 10 a 15 metros de altura, com o perigo de quebra ou tombamento dos mesmos.

O colhedor escala o estipe com auxílio de uma peçonha e corta o cacho, na sua base, tendo o cuidado para que não se desprenda uma quantidade elevada de frutos das ráquias. Após o corte, o cacho normalmente é depositado ao solo, mas é recomendado fazê-lo sobre lona ou toalha de plástico, pois com essa prática é possível evitar a maior contaminação dos frutos (HOMMA et al., 2006).

Após a colheita dos cachos, ainda no açaizal, são realizadas as operações de debulha e de catação, que consistem da liberação dos frutos dos cachos e da seleção dos frutos de acordo com a coloração ou estágio de maturação (HOMMA et al., 2006).

Os frutos do açazeiro devem ser debulhados, preferencialmente, sobre lonas ou plásticos, ou ainda diretamente nas caixas de plástico, evitando o contato direto dos frutos com o solo ou com qualquer outro contaminante, como combustíveis ou produtos químicos. Nessa operação, é feita a seleção visual e a eliminação de frutos atacados por insetos, doenças ou animais e daqueles contaminados por material fecal de aves (EMBRAPA, 2008).

Os frutos, após a colheita e debulha manual das ráquias, são acondicionados, rusticamente, em cestos ou paneiros, feitos com fibras vegetais. O acondicionamento dos frutos também pode ser feito em caixas de plástico utilizadas na colheita e transporte de outras frutas, as quais possuem aberturas laterais facilitando a aeração. Essas caixas são mais fáceis de higienizar, resistentes e duráveis, além de proteger os frutos contra danos mecânicos, tão comuns nos frutos do açazeiro quando acondicionados em cestos ou paneiros, causado pelo empilhamento desses durante o transporte aos centros consumidores (EMBRAPA, 2008).

Os frutos de açazeiro são muito perecíveis, por isso devem ser despolidos no tempo máximo de 24 horas, após a colheita, quando estocados sob temperatura ambiente. O processo de degradação é acelerado, principalmente, pelas temperaturas elevadas nas áreas de produção e comercialização, o que torna a proteção contra radiação solar direta um fator importante para evitar a perda excessiva de água, prejudicial a despolda, pois provoca a diminuição do rendimento e o açaí obtido apresentará cor inadequada, com restrições da aceitabilidade quando da comercialização (EMBRAPA, 2008).

O horário matutino é fundamental para o transporte, pois os frutos estão com a temperatura mais baixa, o que reduz o processo de degradação. Quando o transporte é realizado nas primeiras horas do dia, garante, dependendo da distância, a chegada dos frutos nos grandes centros consumidores, como Belém, no dia seguinte ao da colheita (EMBRAPA, 2008).

Na Região Amazônica, o meio de transporte mais utilizado é o fluvial, o que facilita o escoamento da produção de frutos de açaizeiro provenientes das áreas de várzeas (EMBRAPA 2008).

### 1.2.3 Processamento

#### 1.2.3.1 *Processamento industrial*

O processamento industrial para extração do açaí envolve diversas etapas que podem ser observadas na Figura 9 e são descritas pela EMBRAPA (2008) a seguir.

Os frutos de açaizeiro chegam às unidades de processamento acondicionados em cestos, paneiros ou caixas de plástico, os quais são pesados e conduzidos para o processo de seleção.

A seleção manual dos frutos, geralmente, é realizada em mesas de aço inoxidável, dotadas de peneiras, cujas dimensões possam reter os frutos, deixando passar as impurezas menores, como os restos de sépalas, fragmentos de ráquilas, terra, frutos desidratados e outras impurezas. Nessa etapa, os frutos verdes e em estado fitossanitário precário, ou mesmo com qualquer outro tipo de defeito, que os torne inadequados ao processamento, devem ser retirados do lote.

Em algumas indústrias de processamento, os frutos passam por um equipamento dotado de ventilador para a retirada das sujidades adquiridas na colheita, no transporte ou oriundas dos próprios frutos.

No processo industrial, os frutos de açaizeiro são transportados para um sistema composto de quatro lavagens em série: na primeira, os frutos são imersos em água para a retirada das sujidades aderidas aos frutos; na segunda, os frutos também são imersos em água para o amolecimento do epicarpo e do mesocarpo, com a finalidade de facilitar o processo de despulpamento; a terceira lavagem é feita com água clorada (20 ppm a 50 ppm de cloro ativo), por cerca

de 20 a 40 minutos. Na quarta, o excesso de cloro é retirado por meio da lavagem por aspersão com água potável.

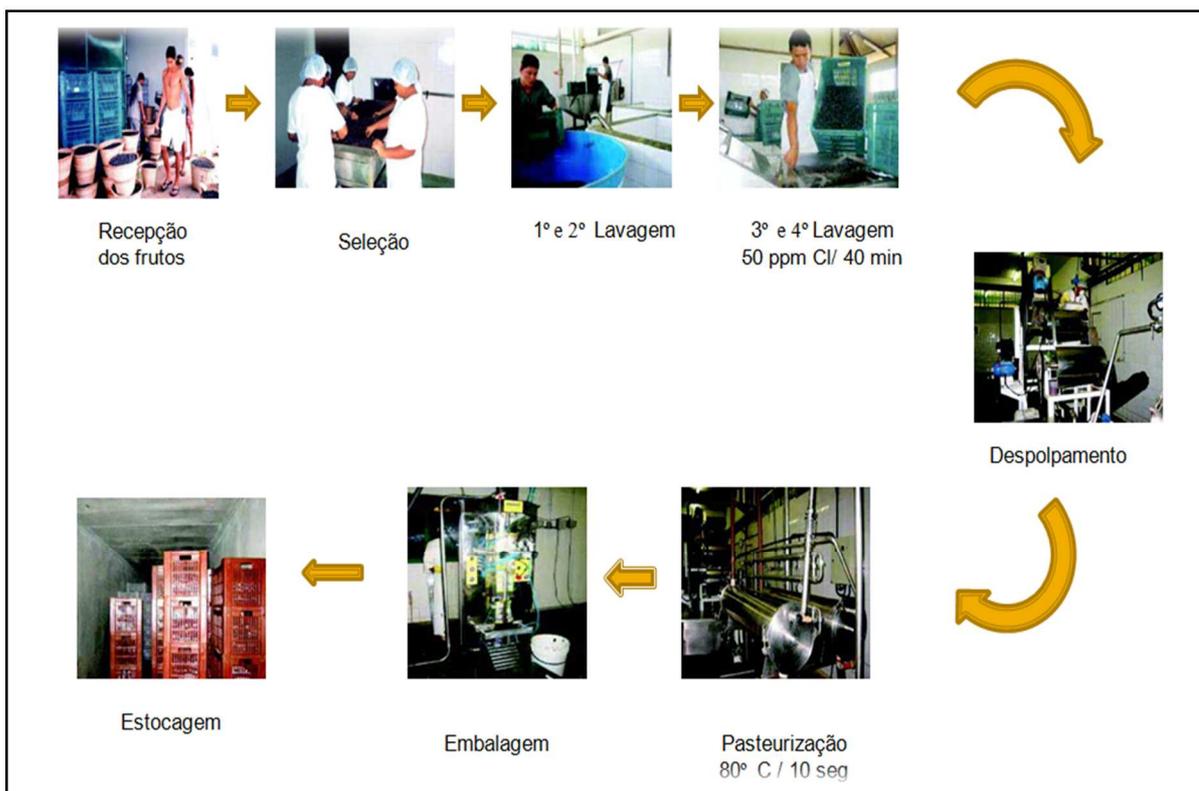
No primeiro estágio do processamento, os frutos, com o auxílio de injeção de água, são despulpados, cuja operação consiste da remoção da polpa do açaí.

Quando o despulpamento é efetuado sem a adição de água, obtém-se a polpa integral de açaí. Essa forma de obtenção do produto, tem sido usada apenas experimentalmente, visa basicamente o atendimento de mercados distantes dos centros de produção, por possibilitar redução substancial nos custos de congelamento e de transporte. No entanto, nenhuma das despulpadoras disponíveis no mercado processa com eficiência o fruto sem adição de água.

O açaí obtido pelo despulpamento pode ser imediatamente embalado e congelado ou passar por tratamento térmico.

No tratamento térmico, por pasteurização, o produto é bombeado para o trocador de calor, do tipo tubular, sob a temperatura de 80°C a 85°C, durante 10 segundos, e imediatamente resfriado no próprio trocador de calor. No final do tratamento, o produto deve ser retirado com a temperatura de 5°C.

Figura 9 - Processamento industrial do açaí



Fonte: Adaptado de EMBRAPA, 2008.

### 1.2.3.2 Processamento artesanal

No processamento artesanal são utilizadas as tradicionais máquinas despoldadeiras ou, popularmente denominadas de batedeiras, construídas em aço inoxidável, modelo vertical, que procede ao despoldamento de bateladas de frutos de açazeiro com a adição de água.

Nos municípios do Pará está sendo realizado pelo Departamento de Vigilância do Estado /SESPA um intenso trabalho de conscientização e treinamento para que as etapas de peneiramento para retiradas de sujidades, lavagens e branqueamento sejam realizadas pelos batedores de açaí, como são chamadas as pessoas que produzem açaí de forma artesanal ou em pequenos estabelecimentos semi-industriais (comunicação pessoal).

O açaí quando não-submetido a processos de conservação, tem a vida de prateleira muito curta, no máximo 12 horas, mesmo sob refrigeração. A sua alta perecibilidade pode estar associada, principalmente, à elevada carga microbiana presente no fruto, causada por condições inadequadas de colheita, acondicionamento, transporte e processamento.

A adoção de boas práticas agrícolas (BPA) e de fabricação (BPF) minimizam a probabilidade de contaminação microbiológica dos frutos do açaí durante o processamento, contribuindo para a conservação do produto.

Resumidamente, o açaí é o produto extraído do epicarpo e do mesocarpo, partes comestíveis do fruto do açaizeiro, após amolecimento obtido por processos tecnológicos adequados e pode ser classificado de acordo com a Instrução Normativa nº 1 de 07/01/2000 (BRASIL, 2000) em:

- Polpa: polpa extraída do açaí, sem adição de água, por meios mecânicos e sem filtração;

- *Açaí grosso ou especial (tipo A)*: polpa extraída com a adição de água, apresenta, após ser filtrada, mais de 14% de sólidos totais e a aparência é muito densa;

- *Açaí médio ou regular (tipo B)*: polpa extraída com a adição de água apresenta, após ser filtrada, de 11% a 14% de sólidos totais e tem a aparência densa;

- *Açaí fino ou popular (tipo C)*: polpa extraída com a adição de água apresenta, após ser filtrada, de 8% a 11% de sólidos totais e a aparência é pouco densa.

Além da forma tradicional de consumo, a polpa de açaí também é largamente usada na produção industrial ou artesanal de sorvetes.

Nos últimos anos diversas outras formas de apresentação do produto têm surgido no mercado tais como: o açaí pasteurizado, o açaí com xarope de guaraná, o açaí em pó, o doce de leite com açaí, a geléia e o licor de açaí.

Já o açaí em pó é indicado para o preparo de sorvetes, pudins, tortas, bolos, biscoitos e doces.

Nas regiões centro-oeste, sul, sudeste e nordeste do Brasil, o padrão de consumo é completamente diferente da Amazônia, onde o açaí é, para grande considerável parte da população, componente importante da refeição principal e bebida puro ou misturado com farinha de mandioca. Na cidade do Rio de Janeiro,

por exemplo, o açaí é consumido, com maior frequência, misturado com xarope de guaraná ou/e outras frutas, tais como banana, morango e acerola.

Além desses usos, são grandes as perspectivas de utilização na indústria de corantes naturais e de bebidas isotônicas. Na culinária doméstica também apresenta multiplicidade de usos sendo usada na elaboração de bolos, tortas, cremes, pudins e mousses.

Assim como outras espécies de palmeiras o açaizeiro possui muitos usos desde a folha às raízes e por isso outras propriedades foram ou estão sendo estudadas e podem ser aplicadas em diversos usos como: cosméticos, biocidas, contraste oral para ressonância e dispositivos biomédicos (ALEXANDRE et al., 2004; SANCHEZ, 2005; SANTOS et al., 2008; GABRIEL, 2012).

#### 1.2.4 Valor nutricional

O fruto do açaizeiro é consumido somente após processamento, pois apresenta escasso rendimento de parte comestível e sabor relativamente insípido, quando comparado com a maioria das frutas tropicais tradicionalmente consumidas como fruta fresca. Além disso, o consumo direto dos frutos, devido à presença acentuada de antocianinas deixa nos lábios, dentes e gengivas manchas de coloração arroxeadas bem acentuadas e de aspecto desagradável, embora facilmente removíveis.

O açaí possui um rico conteúdo nutricional constituído por ácidos graxos polinsaturados, monoinsaturados, saturados, ácidos graxos linoleico, oleico e palmítico,  $\beta$ -sitosteróis, aminoácidos, vitaminas do complexo B, minerais, cálcio, potássio, magnésio e ferro, além de fibras como as lignanas presentes em menores quantidades e também exibindo ação antioxidante (MENEZES et al., 2008). Adicionalmente, apresenta um rico conteúdo em compostos fenólicos como as antocianinas e outros flavonoides (PORTINHO, 2012). A composição nutricional da polpa de açaí apresenta elevado teor energético e bom conteúdo de vitaminas, minerais e fibras, conforme observado no Quadro 1.

Quadro 1 - Informações nutricionais por 100g de Polpa de Açaí.

<b>Calorias</b>	58kcal
<b>Proteínas</b>	0,8g
<b>Lipídios</b>	3,9g
<b>Açúcares totais</b>	6,2g
<b>Fibra</b>	2,6g
<b>Cálcio</b>	35mg
<b>Ferro</b>	0,4g
<b>Potássio</b>	124mg
<b>Fósforo</b>	16mg
<b>Magnésio</b>	17mg

Fonte: TACO, 2011

### 1.3 DOENÇA DE CHAGAS TRANSMITIDA POR VIA ORAL E REGISTROS DE SURTOS ENVOLVENDO ALIMENTOS

Desde a década de 30, diversos estudos experimentais vêm demonstrando a transmissão do *T. cruzi* para animais onívoros ou insetívoros que se alimentam de barbeiros infectados ou que ingerem comida contaminada com o parasito (PEREIRA et al., 2010). Suspeita-se que o primeiro caso descrito de transmissão oral tenha ocorrido ainda durante os estudos de Carlos Chagas juntamente com o Dr. Oswaldo Cruz ao verificar a presença de *T. cruzi* no sangue periférico de saguis *Callithrix* que foram expostos a triatomíneos infectados e, possivelmente, se alimentaram dos insetos (COURA, 2013).

A possibilidade de transmissão da infecção por via oral foi demonstrada experimentalmente, pela primeira vez por Nathan-Larrier (1921 apud DIAS, 2006) ao reproduzir a doença de Chagas em animais de laboratório que receberam formas tripomastigotas do parasito por via oral e por Brumpt (1931 apud DIAS, 2006) colocando fezes de triatomíneos infectados na mucosa bucal de animais, confirmada logo depois, por Kofoid e Donat (1933 apud DIAS, 2006) e por Cardoso (1933 apud DIAS, 2006). Marsden induziu em camundongos a transmissão experimental por via intra-gástrica (1967 apud DIAS, 2006). Na década de 1930, Mazza e colaboradores (1936), relataram a infecção de ratos sadios que devoraram um roedor silvestre infectado, também registrando a infecção experimental de cães que ingeriram moscas domésticas alimentadas com fezes de triatomíneos portadores de *T. cruzi*. Vergani (1952 apud DIAS, 2006) infectou cães por via oral, obrigando-os a comerem moscas alimentadas previamente em sangue infectado. Rykman (1966 apud DIAS, 2006) conseguiu infecções fugazes em lagartos alimentados com fezes de triatomíneos infectados, observando aumento de virulência na cepa recuperada, enquanto Davis e colaboradores (1980), infectaram raposas por via oral, com triturado de barbeiros portadores de parasita. Entretanto, a maior experiência coube a Carlos Diaz Ungría e colaboradores (1960 e 1980 apud DIAS, 2006) na Venezuela que trabalharam com cães, cobaias e roedores, infectando-os por via oral com cepas locais de *T. cruzi* originadas de triatomíneos naturalmente infectados. Importantes conclusões foram verificadas através desse estudo como: os cães

eram facilmente contaminados quando ingeriam leite ou soro contendo fezes infectadas de *Rhodnius prolixus*; o período de incubação era maior pela via oral do que pelas vias intramuscular, subcutânea ou intraperitoneal, sendo o êxito da via oral geralmente dependente de inóculos grandes; comprovação da infecção intestinal de camundongos através da liberação de cápsulas de gelatina contendo fezes de triatomíneos infectados; fezes de triatomíneos infectados produziram pela via oral infecções muito mais intensas que material de cultura e comprovaram sinais de penetração do parasita em mucosa oral, esofagiana, gástrica e intestinal, ressaltando reação local importante, com formação de mesenterite e focos primários no interstício hepático, posteriormente se dispersando o parasita pelo sistema porta (COURA, 2006).

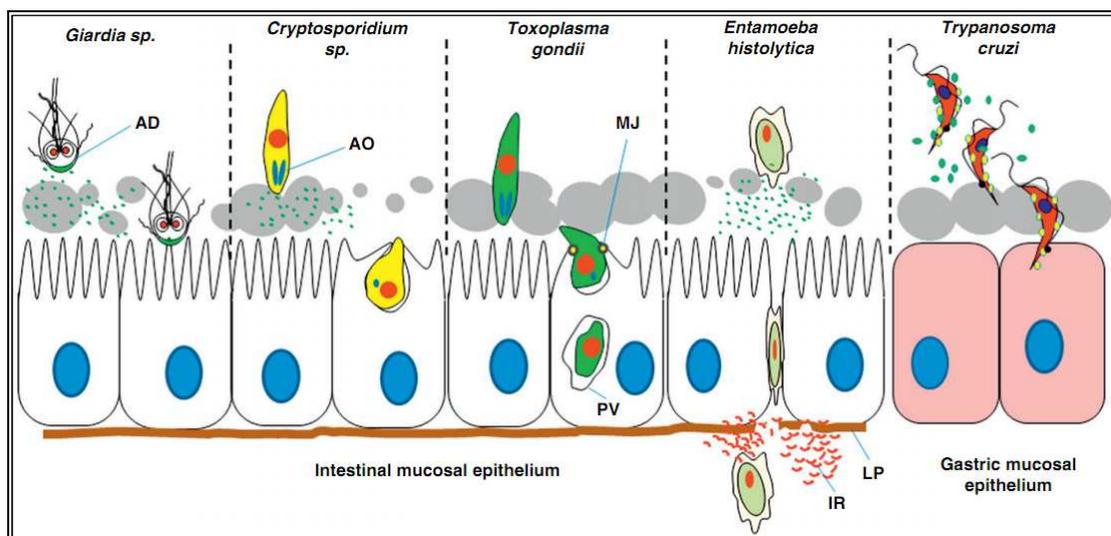
Em 1985, Jansen e Deane constataram a infecção de camundongos que ingeriram alimentos contaminados com excrementos do gambá *Didelphis marsupialis*, ampliando as ações deste marsupial como reservatório e transmissor do *T. cruzi*. (JANSEN e DEANE, 1985)

Em 1994, Calvo-Méndez e colaboradores demonstraram a infecção chagásica por via oral em camundongos pela administração de água potável, leite pasteurizado, carne moída crua ou cozida, queijo fresco e arroz cozido contaminados com fezes de *Triatoma pallidipennis*, concluindo que o leite se apresentou como o meio mais efetivo para a transmissão do *T. cruzi*.

Castanho et al., 2002 relataram a possibilidade da infecção chagásica utilizando caldo de cana contaminado com fezes de *Rhodnius neglectus* contendo *T. cruzi* na alimentação de camundongos.

Em 2008, Yoshida descreveu, através de estudos de infecção experimental por *T. cruzi* 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. A infecção de células da parede do estômago ocorre via ativação de sinais nas células hospedeiras desencadeadas por diferentes moléculas de superfícies de parasitos. A invasão de cepas distintas de *T. cruzi* nas células depende de diferentes glicoproteínas de superfície como gp82, gp30 e gp90 e apresenta variados níveis de invasão. *T. cruzi* é o único micro-organismo conhecido cuja porta de entrada para infecção sistêmica é o epitélio gástrico (Figura 10) (YOSHIDA, 2008, 2011).

Figura 10 - Células de *T. cruzi* invadindo o epitélio da mucosa gástrica.



Fonte: YOSHIDA, 2011.

Legenda: AD, disco adesivo; AO, organelas apicais; IR, resposta inflamatória; LP, lâmina própria; MJ, movimento da junção; PV, vacúolo parasitóforo.

Barbosa-Labello, em 2010, demonstrou em seu trabalho utilizando modelo animal, que o *T. cruzi* foi capaz de sobreviver na polpa de açaí por diferentes períodos de incubação e sob diversos tratamentos térmicos, além de preservar a sua virulência em camundongos.

O primeiro caso de infecção humana pela via oral foi registrado na Argentina por Mazza e colaboradores em 1936 através da ingestão do 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 (STORINO e JÖRG, 1994).

No Equador, Amunarriz et al. (1991) e Aguilar e Yépez (1995) relataram a possibilidade de transmissão oral para os índios através da ingestão de carnes de animais silvestres que é uma importante fonte alimentar para os nativos da região da Amazônia equatoriana.

Na Colômbia, Rodriguez et al. (1992) descreveram um surto entre 6 militares que ingeriram carne de animais silvestres durante um trabalho na selva. Carceres e colaboradores (1999) descreveram 3 óbitos num grupo de 13 pessoas com a doença com suspeita de ingestão de vinho de palma regional.

No Brasil, dentro e fora da região amazônica, muitos casos têm sido registrados em forma de microepidemia caracterizando-se por um grupo de

peças reunidas em um mesmo lugar que ao ingerirem um mesmo tipo de alimento adoecem quase que simultaneamente com quadro febril e manifestações gerais de uma infecção sistêmica, porém com alta taxa de mortalidade (FERREIRA et al., 2014).

Apesar de crescente o número de casos agudos, os relatos dessa fase da doença são escassos na literatura regional. Segundo Teixeira et al. (2001) para cada caso agudo notificado, podem ser estimados de 20 a 100 outros casos, o que potencializa a gravidade da doença.

No período de 1965 até 2009 foram registrados 8 surtos fora da região amazônica brasileira, totalizando 106 casos, conforme Quadro 2.

Quadro 2 - Surtos de doença de Chagas pela transmissão oral fora da Amazônia brasileira, no período de 1965 a 2009.

LOCAL	ANO	N. DE CASOS	N. DE ÓBITOS	ALIMENTO SUSPEITO	REFERÊNCIAS
<b>Teutônia – RS</b>	1965	17	6	ND	Coura, 1966.
<b>Riacho de Santana – BA</b>	1979	20	ND	ND	Barrett et al, 1980.
<b>Catolé da Rocha – PB</b>	1986	26	2	Caldo de cana	Shikanay-Yasuda, 1987.
<b>Navegantes -SC</b>	2005	24	3	Caldo de cana	Brasil (SVS), 2005.
<b>Redenção - CE</b>	2006	8	2	ND	Dias et al, 2008.
<b>Ibitinga e Macaúbas - BA</b>	2006	7	2	Água	Dias et al, 2008.
<b>Axixá do Tocantins - TO</b>	2009	4	ND	Palmito	Oliveira et al, 2009.
<b>TOTAL</b>		106	15		

Fonte: FERREIRA et al., 2014.

Na região amazônica brasileira, o número de surtos é bem maior do que nas regiões apresentadas anteriormente. Foram 149 surtos distribuídos pelos estados do Acre (3), Amapá (22), Amazonas (2), Maranhão (2) e Pará (120), totalizando 423 casos descritos entre os anos de 1968 a 2010. Os surtos estão descritos no Quadro 3.

De fato, as peculiaridades da epidemiologia da DCA nas áreas de ocorrência de casos por esta modalidade de transmissão trazem novos desafios aos países, no que se refere à estruturação de ações voltadas para atenção, vigilância, prevenção e controle, com vistas a respostas oportunas para toda a sociedade (PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, 2009).

Quadro 3 - Surtos de doença de Chagas pela transmissão oral na Amazônia brasileira, no período de 1968 a 2010.

LOCAL	ANO	N. DE CASOS	N. DE ÓBITOS	ALIMENTO SUSPEITO	REFERÊNCIAS
<b>Belém - PA</b>	1968	4	ND	ND	Shaw et al, 1969.
<b>Amapá e Pará</b>	1982 - 2001	149	ND	Açaí	Valente et al, 2002.
<b>Igarapé-Miri - PA</b>	2002	12	2	ND	Pinto et al, 2003.
<b>Belém - PA</b>	2004	3	ND	ND	Valente et al, 2005.
<b>Santarém - PA</b>	2006	21	ND	Bacaba	Crespo et al, 2007.
<b>Região amazônica</b>	2007	88	4	Açaí	Pereira et al, 2009.
<b>Região Norte</b>	2008	129	ND	Açaí	Brasil, 2007.
<b>Rio Negro - AM</b>	2010	17	ND	Açaí	Souza-Lima et al, 2013.
<b>TOTAL</b>		423	06		

Fonte: FERREIRA et al., 2014

#### 1.4 ESTRATÉGIAS E AÇÕES GOVERNAMENTAIS PARA REDUZIR OS NÚMEROS DE CASOS DE DCA POR TRANSMISSÃO ORAL

Em 2005, foi publicado o “Consenso Brasileiro de doença de Chagas” com os objetivos de padronizar as estratégias de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle da doença de Chagas (BRASIL/MS, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC n 218 de 29/07/2005, publicou um regulamento técnico de procedimentos higiênico-sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais (BRASIL, 2005).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), elaborou um procedimento para processamento de açaí, com etapas desde a colheita até congelamento e estoque visando tanto o processamento tradicional quanto o industrial (EMBRAPA, 2008).

Uma consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos ocorreu em 2006 e algumas recomendações foram realizadas: definição de

casos suspeitos, prováveis e confirmados de transmissão oral; fomento à pesquisa básica e aplicada, para que possam ser obtidos conhecimentos que ajudem à compreensão do fenômeno de transmissão oral do *T. cruzi* e conseqüentemente, a sua melhor interpretação epidemiológica e de prevenção/controlar tais como técnicas de detecção do *T. cruzi*, em alimentos, dentre outras (PANAFTOSA, 2006).

A ANVISA elaborou um informe técnico sobre o gerenciamento do risco sanitário na transmissão de doença de Chagas aguda por alimentos e recomendou à comunidade científica que os seguintes temas necessitam ser pesquisados: viabilidade do *T. cruzi* em alimento, técnicas de detecção e de inativação de *T. cruzi* em alimentos, formas de contaminação de *T. cruzi* por alimentos e medidas de controle desenvolvidas por meio de investigações epidemiológicas consistentes. No que refere-se 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. Dentre estas estão o incentivo e o fomento à produção científica, incluir o açaí no programa estadual de monitoramento de alimentos, desenvolver análise de risco sobre o açaí, incentivar a criação de redes de comunicação de surtos pelas regionais e municípios e elaborar um diagnóstico do produto açaí com informações disponíveis sobre produção e mercado (BRASIL, 2008).

Em 2009, um “Guia de vigilância, prevenção, controle e manejo clínico, da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos” foi elaborado destinando-se em particular aqueles gestores e trabalhadores da saúde que exercem suas atividades em regiões onde o acesso à informação é difícil, reduzindo a possibilidade de trocar experiência com outros parceiros, particularmente com a população, e que vem enfrentando uma demanda crescente de casos suspeitos deste agravo, em particular na região amazônica (PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, 2009).

No Estado do Pará, foi criado o Programa Estadual da Qualidade do Açaí, que tem a participação de instituições como Secretaria Estadual de Saúde Pública (SESPA), Serviço Brasileiro de Apoio às micro e pequenas Empresas (SEBRAE-Pará), Serviço Nacional de Aprendizado Industrial (SENAI), ANVISA, EMBRAPA, Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), Instituto Evandro Chagas, entre outras. 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).

Um estudo do Ministério da Saúde em parceria com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), concluiu que os processos de refrigeração da polpa de açaí por até 144 horas e congelamento durante 26 horas não se mostraram efetivos como métodos de controle à transmissão alimentar da DCA e o estresse térmico observado no tratamento combinado com temperatura ambiente e 4°C demonstrou que o parasito tem uma excelente adaptação à polpa de açaí, sendo pouco afetado pelas condições externas. Este fato é relevante, considerando que muitas vezes as condições de transporte são precárias e ainda assim o *T. cruzi* sobrevive e mantém a virulência (PASSOS et. al, 2010).

A manutenção dos progressos alcançados no controle da doença de Chagas dependerá do compromisso político e na retenção de recursos de saúde pública. A Organização Mundial de Saúde (OMS), na 63ª Assembleia Mundial de Saúde em maio de 2010, aconselhou os Estados-Membros, onde a doença é endêmica ou não-endêmica, a controlar todas as vias de transmissão, inclusive a oral e integrar os cuidados de pacientes com todas as formas clínicas da doença nos serviços de atenção primária (WHO, 2010).

A OMS tem sido solicitada a facilitar a criação de redes a nível global e reforçar as capacidades regionais e nacionais com foco no fortalecimento mundial de vigilância epidemiológica da doença; para prevenir todas as formas de transmissão; e promover o acesso precoce ao diagnóstico e tratamento. A OMS também tem sido solicitada a colaborar com os Estados-Membros e iniciativas intergovernamentais com o intuito de estabelecer objetivos e metas para a prevenção e controle da doença; a promover pesquisas relacionadas à prevenção, controle e atenção; a avançar em esforços intersetoriais e colaboração, e a apoiar as mobilizações de recursos nacionais e internacionais, públicos e privadas para esses objetivos (WHO, 2010).

## 1.5 MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS NAS ANÁLISES DE ALIMENTOS

Há uma necessidade urgente na disponibilização de métodos confiáveis para detecção de *T. cruzi* em alimentos, tanto do ponto de vista de investigações epidemiológicas nos casos das microepidemias quanto do controle de qualidade dos produtos comercializados no mercado.

Atualmente não existem métodos oficiais que visem a detecção deste patógeno em alimentos a fim de dar uma resposta rápida para os sistemas de vigilância em saúde.

Os métodos moleculares aplicados ao controle de qualidade de alimentos já são uma realidade e merecem atenção quanto sua disponibilidade aos produtos sujeitos a vigilância sanitária.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é um método bastante utilizado na detecção de patógenos em alimentos. Métodos baseados na PCR tem a vantagem de serem rápidos e devido à sua alta sensibilidade e especificidade conseguem uma identificação precisa do agente patogênico.

Uma das abordagens deste trabalho será a possibilidade de implantação da PCR como ferramenta para detectar a contaminação por *T. cruzi* em alimentos contendo açaí, avaliando dessa forma as condições higiênico-sanitárias desses produtos disponíveis no comércio brasileiro.

Técnicas baseadas na PCR tem sido amplamente utilizadas na detecção de *T. cruzi* em material biológico como o sangue, porém em matriz alimentícia para detecção de *T. cruzi* será pioneira.

Conceituada por Kary Mullis em 1985, a PCR é um processo enzimático, *in vitro*, para amplificação de uma sequência específica de ácido desoxirribonucleico (DNA). A PCR de primeira geração, como desenvolvida por Mullis, está baseada no emprego de dois iniciadores específicos (pequenos fragmentos de DNA fita simples, com orientações opostas) que flanqueiam a sequência de DNA a ser amplificada e, pela ação da enzima DNA polimerase, sintetizam uma cópia da região do DNA delimitada por eles (MULLIS et al., 1987).

Essa técnica envolve três etapas básicas de variação de temperatura e consiste de ciclos repetitivos, ou seja: desnaturação do DNA molde em uma fita simples, anelamento dos iniciadores às regiões complementares no DNA molde e extensão e síntese do fragmento de DNA. Este ciclo é repetido em torno de 20 a 40 vezes, sendo que cada novo fragmento sintetizado serve como molde nos ciclos subsequentes, resultando em aumento exponencial do número de cópias da região do DNA alvo. A principal vantagem da amplificação de DNA é a estabilidade destas sequências que não são afetadas por condições ambientais ou de cultivo.

Na PCR convencional, uma alíquota do produto amplificado é aplicada em gel de agarose, submetida à eletroforese, com corante intercalante e visualizada sob luz ultravioleta. A comparação, entre as amostras, da presença de bandas de mesmo peso molecular e a sua intensidade determinam um resultado qualitativo sobre a presença do alvo amplificado.

A segunda geração de métodos que empregam a PCR, denominada PCR em Tempo Real, vem sendo usada para detecção de patógenos, inclusive os de origem alimentar. Estes métodos combinam as etapas de amplificação e detecção em uma única reação fechada, o que minimiza o risco de contaminação da amostra. A principal diferença entre a PCR convencional e a PCR em Tempo Real é que, nesta última, é possível detectar o aumento do número de cópias do DNA alvo à medida que a reação é realizada. Isto ocorre porque componentes fluorescentes estão presentes na reação e a intensidade da resposta é diretamente proporcional à amplificação do DNA alvo. O desenvolvimento de métodos automatizados baseados em compostos fluorescentes tornou possível a eliminação do processamento pós-PCR para análises dos produtos resultantes da amplificação. Nos sistemas que utilizam as sondas de hibridização, pequenos oligonucleotídeos marcados com corantes fluorescentes hibridizam dentro da região delimitada pelos iniciadores aumentando assim a especificidade da reação de PCR.

A especificidade da técnica de PCR em tempo real depende tanto do sistema químico utilizado para gerar e monitorar a reação como do instrumento usado para monitorar o sinal. Vários sistemas químicos já foram desenvolvidos sendo os mais utilizados os corantes intercalantes como o SYBR Green I; os sistemas baseados em iniciadores marcados com corantes fluorescentes como o

LUX, Amplifluor e Plexor; e as sondas de hibridização TaqMan®, TaqManMinor Grove (MGB), LNA, Molecular Beacons e Scorpions (GAŠPARIČ et al.,2010).

Um dos corantes intercalantes mais utilizados é o SYBR Green I que se liga inespecificamente à dupla fita de DNA, não se ligando à fita simples. Como consequência dessa ligação, a fluorescência é aumentada de 800 até 1000 vezes. À medida que a reação de PCR vai ocorrendo, o aumento da quantidade do DNA sintetizado resulta em um aumento do sinal fluorescente. Deve ser feita uma análise posterior através da curva de dissociação térmica dos produtos resultantes da amplificação (WEIGHARDT, 2004).

Dessa maneira, todas essas características vão ao encontro de muitos critérios importantes de diagnóstico, como rapidez, automação e risco mínimo de contaminação do DNA.

## 1.6. JUSTIFICATIVA

A ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) por transmissão oral, relacionada ao consumo de alimentos até o ano de 2004, constituía um evento pouco conhecido ou investigado. O que era considerado de ocorrência esporádica e circunstancial tornou-se frequente na região amazônica e está relacionada à ocorrência de surtos recentes em diversos estados brasileiros.

Atualmente, 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, embora haja necessidade de mais estudos científicos.

Os casos recentes notificados no Brasil de DCA estão relacionados principalmente ao consumo do suco de açaí, considerado um alimento essencial na dieta da população da Região Norte. O açaí tem sido apreciado tanto por seu valor nutricional, quanto pelo seu sabor característico, deixando de ser consumido somente nas regiões produtoras, estendendo por todo o território brasileiro e até mesmo exportado para outros países. As formas de consumo do açaí são bastante diversificadas, apresentando-se como polpas congeladas e

polpas misturadas com outros frutos como banana, acerola, morango ou com xarope de guaraná ou cana de açúcar. Pode-se encontrar tais preparações em lanchonetes, restaurantes, comércio ambulante ou em supermercados. As plantações de açaí estão localizadas em regiões endêmicas para doença de Chagas, onde o processamento é realizado. Embora existam diretrizes acordadas para a manufatura do fruto a fim de minimizar a contaminação, faz-se necessário o controle de qualidade destes produtos. Para tal devem existir metodologias apropriadas para atender essa demanda, a fim de que um monitoramento destes produtos seja realizado para resguardar a saúde da população.

O Ministério da Agricultura e do Abastecimento através da Instrução Normativa nº 1, de 07 de janeiro de 2000, aprovou o regulamento técnico para fixação dos padrões de Identidade e Qualidade para polpa de frutas, dentre as quais encontra-se a polpa de açaí. Quanto aos ingredientes básicos, a polpa de açaí e o açaí devem ser obtidos de frutas frescas, sãs, maduras, desprovidas de terra, sujidade, parasitas e microrganismos que possam tornar o produto impróprio para consumo (BRASIL, 2000).

Entre as várias recomendações do centro Pan-Americano de Febre Aftosa (PANAFTOSA) realizada em 2006 destaca que os países endêmicos considerem a via de transmissão oral da doença de Chagas como importante para o diagnóstico, prevenção, manejo e controle, dado a sua incidência e morbimortalidade. Recomenda-se também que haja fomento para a pesquisa básica e aplicada no tema que ajude na compreensão do fenômeno de transmissão oral do *T. cruzi* e conseqüentemente a sua melhor interpretação epidemiológica e de prevenção/controle como estabelecimentos de técnicas de detecção do *T. cruzi* em alimentos, entre outras.

Portanto, existem novos desafios para o Brasil no que se refere à estruturação de ações voltadas para atenção, vigilância, prevenção e controle das doenças transmitidas por alimentos, com vistas a respostas oportunas para toda a sociedade.

Considerando-se que há no momento uma série de lacunas no conhecimento técnico específico sobre a transmissão oral da doença de Chagas, o presente trabalho contribuirá nos seguintes aspectos:

- A disponibilização de método para detecção de *T. cruzi* em alimentos será uma ferramenta poderosa na investigação epidemiológica de surtos, transformando evidências epidemiológicas em dados comprobatórios de que alimentos estejam efetivamente contaminados com *T. cruzi*;

- Permitirá o controle da qualidade de alimentos, consumidos em todo território brasileiro, oriundos de regiões endêmicas como é o caso da polpa de açaí;

- Permitirá uma avaliação dos produtos quanto à aplicação das boas práticas de fabricação;

- Permitirá a realização da notificação junto aos fabricantes para que o gerenciamento do risco seja realizado;

- Permitirá uma identificação precisa e rápida do agente patogênico presente na polpa de açaí, através de técnicas moleculares;

Em função da sua missão institucional, o INCQS tem atuado de forma participativa na organização de uma estrutura de Vigilância Sanitária que permita identificar, avaliar e gerenciar riscos à saúde humana. Isto se tornou um grande desafio em função da complexidade dos avanços tecnológicos, principalmente na área de alimentos, o que pode vir a ocasionar situações de risco, de ação e controle muitas vezes ainda desconhecidos. Por esta razão, há uma necessidade evidente de desenvolvimento e implantação de metodologias de ponta como a de detecção de *T. cruzi* por PCR em produtos alimentícios.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL:

Contribuir para o estudo da transmissão oral da doença de Chagas através da padronização do ensaio de PCR para detecção de DNA de *T. cruzi* em açaí.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Testar quatro métodos de extração de DNA genômico em amostras de açaí;
- Estabelecer e validar o método mais adequado para extração de DNA em matriz de açaí;
- Selecionar iniciadores e otimizar a PCR convencional para detecção de DNA de *T. cruzi* em açaí;
- Estabelecer indicadores de desempenho como seletividade, limite de detecção e estudo matriz;
- Aplicar o ensaio de PCR convencional em amostras de alimentos que contenham açaí coletadas nos estados do Pará e Rio de Janeiro;
- Genotipar DNA de *T. cruzi* proveniente das amostras positivas ao ensaio de identificação por PCR;
- Realizar ensaios preliminares de PCR em Tempo Real utilizando o sistema SYBR Green.

### 3. METODOLOGIA

O estudo foi realizado no setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (DM/INCQS/FIOCRUZ/RJ).

Primeiramente, foi desenvolvida uma metodologia para detecção de *T. cruzi*. Para isso, foi implantada uma PCR convencional específica para detecção de *T. cruzi*, e alguns parâmetros de desempenho como limite de detecção, estudo matriz e seletividade foram realizados. Foi selecionado, dentre os quatro métodos testados, um método de extração de DNA de *T. cruzi* em uma matriz de açaí que posteriormente foi submetido à validação.

Após o desenvolvimento do método, amostras de alimentos contendo açaí foram coletadas e submetidas à metodologia desenvolvida. Das amostras que apresentaram resultado positivo, seus DNA foram caracterizados genotipicamente e classificados de acordo com a DTU correspondente.

Com o intuito de futuramente desenvolver uma metodologia mais sensível com a PCR em tempo real utilizando sondas, foram realizados ensaios utilizando PCR em Tempo Real com SYBR Green para uma avaliação das amostras com resultados positivos e negativos obtidos na PCR convencional.

#### 3.1 CEPAS UTILIZADAS NO ESTUDO

##### 3.1.1 Cepas de *Leishmania* e de *Trypanosoma*

As cepas de *Leishmania* e de *Trypanosoma* foram fornecidas pelo Instituto Oswaldo Cruz, pertencentes às coleções de “*Trypanosoma* de mamíferos silvestres, doméstico e vetores” (COLTRYP), “de *Leishmania*” do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), “de Protozoários” (COLPROT) e pelo Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) de acordo com o quadro 4.

Quadro 4 - Relação de tripanosomatídeos utilizados neste estudo.

Espécie	Código da cepa Código internacional	Hospedeiro	Origem geográfica
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	IOC-L 575 IFLA/BR/1967/PH8	Flebotomíneos	Brasil
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	IOC-L 565 MHOM/BR/1975/M4147	Homo sapiens	Brasil
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	IOC-L 566 MHOM/BR/1975/M2903	Homo sapiens	Brasil
<i>Leishmania (V.) lainsoni</i>	IOC-L 1023 MHOM/BR/1981/M6426	Homo sapiens	Brasil
<i>Leishmania (V.) naiffi</i>	IOC-L 1365 MDAS/BR/1979/M5533	<i>Dasympus novencictus L.</i>	Brasil
<i>Leishmania (V.) shawi</i>	IOC-L 1545 MCEB/BR/1984/M8408	<i>Cebus apella</i>	Brasil
<i>Trypanosoma mega</i>	COLPROT 029	Não informado	Não informado
<i>Trypanosoma cervi</i>	COLPROT 031	Não informado	Não informado
<i>Trypanosoma lewisi</i>	COLPROT 165	Não informado	Não informado
<i>Trypanosoma rangeli</i>	COLPROT 273	Não informado	Venezuela
<i>Trypanosoma cruzi</i>	COLPROT 295	Não informado	Argentina
<i>Trypanosoma cruzi TCI</i>	COLTRYP 016 MDID/BR/2005/Gambá	<i>Didelphis aurita</i>	Brasil/SC
<i>Trypanosoma cruzi TC II</i>	COLTRYP 043 ITRI/BR/2005/Barbeiro	<i>Triatoma tibimaculata</i>	Brasil/SC
<i>Trypanosoma cruzi TCI</i>	COLTRYP 055 MDID/BR/2008/Gambá	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brasil/PA
<i>Trypanosoma cruzi Z3</i>	COLTRYP 370 IRHO/BR/2008/Barbeiro	<i>Rhodnius pictipes</i>	Abaetetuba/PA Brasil
<i>Trypanosoma cruzi II CL Brener</i>	INI	<i>Triatoma infestans</i>	Brasil/RS

Fonte: Arquivo pessoal

### 3.1.1.1 Cultivo

O cultivo dos tripanosomatídeos foi realizado no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), utilizando garrafas de cultivo celular (TPP – 75cm<sup>2</sup>) contendo meio bifásico NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) / Schneider (Sigma) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibióticos associados (penicilina G potássica: 200 unidades/mL e estreptomicina: 200ug/mL), em estufa incubadora B.O.D. com temperatura de 26-28°C durante cerca de 7 dias. O crescimento parasitário foi acompanhado em microscópio invertido, adicionando-se meio Schneider completo em volumes e intervalos de acordo com o crescimento da amostra, até obtenção de um volume de cultura com cerca de 30-50mL. Após, a cultura foi

transferida para tubos tipo FALCON de 50 mL e centrifugada a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após desprezar o sobrenadante as culturas foram submetidas a duas lavagens utilizando solução tampão de lavagem (NaCl 0,85% adicionada de 0,01M de EDTA, pH 8,0). Na última etapa, o pellet (sedimento de parasitos) foi ressuspenso em 2mL de Tampão Fosfato de Sódio (PBS), sendo em seguida realizada a quantificação parasitaria utilizando câmara de Neubauer. Após a quantificação, houve um ajuste no número de parasitos para serem utilizados nos ensaios.

### *3.1.1.2 Extração de DNA*

O DNA dos tripanosomatídeos foi extraído segundo JRC, 2005.

### *3.1.2 Cepas de bactérias e fungos*

As cepas de bactérias e os fungos foram fornecidos pela Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), de acordo com o quadro 5.

Quadro 5: Relação de bactérias e fungos usados no estudo.

<b>Espécie</b>	<b>Código da cepa</b>	<b>Fonte</b>	<b>Origem geográfica</b>
<i>Bacillus cereus</i>	INCQS 00435 (ATCC 14579)	Não informado	Não informado
<i>Cronobacter Sakazaki</i>	INCQS 00578 (ATCC 29544)	Faringe de criança	Não informado
<i>Escherichia coli</i>	INCQS 00033 (ATCC 25922)	Não informado	Não informado
<i>Staphylococcus aureus</i>	INCQS 00015 (ATCC 25923)	Isolado clínico	Seattle / EUA
<i>Salmonella</i>	INCQS 00150 (ATCC 14028)	Tecido animal	Tennessee / EUA
<i>Alternaria alternata</i>	INCQS 40291 (ATCC 46582)	Não informado	Wisconsin / EUA
<i>Botrytis cinerea</i>	INCQS 41066 (UFPE 2802)	<i>Nicotina tabacum</i>	Alagoas / BR
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	INCQS 40001 (ATCC 2601)	Não informado	Não informado
<i>Ogataea polymorpha</i>	INCQS 40116 (ATCC 34438)	solo	Brasil

Fonte: Arquivo pessoal

### 3.1.2.1 Cultivo das bactérias e fungos

Os micro-organismos foram preservados na CMRVS pelo método de liofilização. A recuperação das cepas liofilizadas foi realizada pela hidratação do líofilo com água purificada estéril (para fungos) e com caldo infusão cérebro-coração (BHI, Merck) (para bactérias), por trinta minutos em repouso, à temperatura de aproximadamente 25°C. As leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Ogataea polymorpha*, foram semeadas em tubos de cultura contendo os meios de extrato de levedura, extrato de malte e ágar (YMA, Difco Laboratories) e incubados a 25°C por 48h e os fungos filamentosos, *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea*, foram semeados em ágar batata dextrose (BDA, Difco Laboratories) e incubados a 25°C por 7dias.

Após crescimento das culturas foi transferida uma pequena quantidade do cultivo em YMA, para as leveduras, e do cultivo em BDA, para os filamentosos, com o auxílio de uma alça bacteriológica, para o meio de extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD, Difco Laboratories), distribuído em frasco

Erlenmeyer de 25 mL, com 12 mL de meio e incubado a 25°C por 24 a 72h, com agitação rotatória de 150 rpm.

O cultivo em meio líquido foi transferido para dois tubos Eppendorf® de 2.0 mL e centrifugados a 6000 x g por 5 min em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em solução fisiológica 0.85% de NaCl e novamente centrifugadas. O processo de lavagem das células foi repetido três vezes. Posteriormente, as células foram congeladas a -70°C durante a noite e depois liofilizadas.

As bactérias foram semeadas em placas contendo ágar triptona de soja (TSA, Merck), incubados a 37°C por 24h para verificação da pureza. Após isolamento da colônia considerada livre de contaminação, houve transferência para tubo contendo 3 ml de caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Merck) incubados a 37 °C por 24h. O cultivo em meio líquido foi transferido para dois tubos Eppendorf® de 2.0 mL e centrifugados a 10000 x g por 10 min. O sedimento foi utilizado para realizar extração de DNA.

### 3.1.2.2 *Extração de DNA*

As extrações de DNA das bactérias e dos fungos foram realizadas com Kit DNeasy Blood and Tissue (Quiagen), conforme instrução do fabricante e com protocolo que utiliza CTAB/clorofórmio-isoamílico (O'DONNELL et al., 1997), respectivamente.

## 3.2 ALIMENTOS UTILIZADOS NO ESTUDO DE AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS

Os alimentos utilizados neste estudo e coletados no comércio local da cidade do Rio de Janeiro foram: “açai fino”, “açai médio”, “polpa de açai com xarope de guaraná e morangos em pedaços”, “néctar misto de açai e banana”. As amostras contendo açai foram utilizadas no Estudo matriz, com exceção do açai médio utilizado no ensaio para seleção do método de extração.

A polpa de açaí foi adquirida sob a forma congelada, no comércio da cidade de Belém do Pará. Essa amostra também foi utilizada para o estudo matriz.

Os alimentos descritos acima foram acondicionados e transportadas em bolsas térmicas contendo gelo reutilizável rígido até a chegada ao laboratório onde foram transferidas para *freezer* a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Estavam disponíveis no Setor de Alimentos do INCQS arroz, feijão, soja e milho utilizados no ensaio de PCR com os iniciadores RBCP1 e RBCP2, para verificar a amplificabilidade do DNA.

### 3.2.1 Extração de DNA

O DNA das amostras de soja, milho, arroz e feijão foi extraído segundo Cardarelli-Leite et al, 2005.

## 3.3 AMOSTRAS DE ALIMENTOS COLETADAS NOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E PARÁ PARA SEREM ANALISADAS COM A METODOLOGIA DESENVOLVIDA

Foram coletadas um total de 140 amostras de açaí em duas etapas distintas.

A primeira etapa trata-se de um conjunto de quarenta e sete (47) amostras coletadas de forma aleatória, pela própria equipe do laboratório, em supermercados do Rio de Janeiro (17) e em feiras e comércio do Pará (30). Em agosto de 2010, na cidade do Rio de Janeiro (RJ), foram coletadas 9 amostras de açaí acondicionadas em embalagens plásticas sob a forma congelada e 8 amostras de açaí com guaraná e/ou frutas acondicionadas em frascos plástico sob a forma congelada ou refrigerada. Em novembro de 2010, na cidade de Belém (PA) foram coletadas 2 polpas de açaí, 9 amostras de açaí, 2 sobremesas (1 docinho de açaí e 1 bombom com recheio de açaí), 2 gelados comestíveis (1

picolé de açaí e 1 sorvete de açaí), 2 amostras de mingau (mistura de açaí e arroz cozidos), 2 amostras de sementes de açaí e 11 amostras de fruto de açaí.

Na segunda etapa foram coletadas 93 amostras no comércio dos estados do Rio de Janeiro e Pará, no período de 2012 a 2015.

No Rio de Janeiro, através da Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Rio de Janeiro (SES/RJ), foram coletadas 48 amostras: (27) açaí, (1) polpa, (20) açaí com guaraná e/ou frutas nos anos de 2011 e 2012.

No Pará, foram coletadas pela prefeitura municipal de Belém e encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Pará (LACEN/PA) 44 amostras: (20) polpa, (4) açaí, e (20) fruto. As amostras de polpa e fruto fizeram parte da parceria celebrada entre VISA/SESPA/LACEN-PA e INCQS (Setor de Biologia Molecular/Departamento de Microbiologia) com o objetivo do monitoramento do produto vendido em barracas e comércio popular do Pará nos anos de 2012 e 2013.

Em 2013 foi coletada uma amostra de polpa de açaí em Belém (PA) pela professora Dr<sup>a</sup> Lúcia Maria Jaeger de Carvalho (UFRJ) e enviada para nosso laboratório para realização da análise para detecção de *T. cruzi*.

### 3.4 ESCOLHA DOS INICIADORES PARA PADRONIZAÇÃO DA PCR

Foram avaliados cinco pares de iniciadores com alvos em diferentes regiões do DNA de *T. cruzi*, conforme quadro 6.

Quadro 6: Iniciadores utilizados na avaliação

Sequências dos iniciadores utilizados na reação de PCR	Tamanho do fragmento	Referência
1ª fase (Nested PCR) TCZ1 – (5'CGAGCTCTTGCCACAACGGG3') TCZ2 – (5'CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG3')	188 pb	Piron et al., 2007
2ª fase (Nested PCR) TCZ3 – (5'TGCTGCASTCGGCTGATCGTTTTCGA3') TCZ4 – (5'CARGSTTGTTGGTGTGTCCAGTGT-TGTGA3')	149 pb	Piron et al., 2007
D71 – (5'AAGGTGCGTCGACAGTGTGG3') D72 – (5'TTTTCAGAATGGCCGAACAGT3')	110 pb 125 pb	Souto et al., 1996
DIAZ 1 – (5'CGCAAACAGATATTGACAGA3') DIAZ 2 – (5'TGTTACACACTGGACACCAA3')	195 pb	Virreira et al., 2003
Tc189F – (5'CCAACGCTCCGGGAAAAC3') Tc189R – (5'GCGTCTTCTCAGTATGGACTT3')	100 pb	Chiurillo et al., 2003

Fonte: Arquivo pessoal

#### 3.4.1- Avaliação “*in silico*” da especificidade dos iniciadores

A especificidade dos iniciadores foi avaliada através da análise de homologia utilizando-se a ferramenta Primer-BLAST 2.0 (“Basic Local Alignment Search Tool”), desenvolvida pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), da biblioteca Nacional de Medicina do NIH (National Institute of Health), Maryland, EUA, a qual analisa a especificidade dos iniciadores em relação ao alvo desejado fazendo alinhamentos com sequências depositadas em um banco próprio do NCBI ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)).

#### 3.4.2 - Avaliação experimental da especificidade dos iniciadores

As reações de PCR foram realizadas com os iniciadores selecionados segundo protocolo descrito nos artigos de referência. Os controles da reação de PCR foram realizados utilizando cepas de *T. cruzi* como controle positivo e *T. rangeli* e *L. amazonensis* como controles negativos.

### 3.5 PROCEDIMENTO PARA ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *Trypanosoma cruzi* NA MATRIZ DE AÇAÍ.

Um pré-teste foi realizado para estabelecer o volume de açaí necessário para proceder à extração de DNA.

Primeiramente utilizou-se 300 µL de açaí médio, seguindo o protocolo de extração de DNA segundo Cardarelli-Leite et al, 2005. Com resultado satisfatório para obtenção de DNA de açaí e considerando que a presença de *T. cruzi* no açaí acontece de forma acidental, decidiu-se aumentar o volume de açaí para que a probabilidade de detecção do parasito também aumentasse. Um segundo teste foi realizado seguindo o mesmo protocolo (com mudança apenas no volume do tampão CTAB), com 2 mL de açaí, obtendo resultado satisfatório. O líófilo de açaí foi pesado para verificar se sua massa encontrava se dentro do estabelecido pelo fabricante do método Nucleo Spin.

Dessa forma, ficou estabelecido o volume de 2 mL de açaí para ser testado com os quatro métodos de extração de DNA.

#### 3.5.1 Preparo do açaí

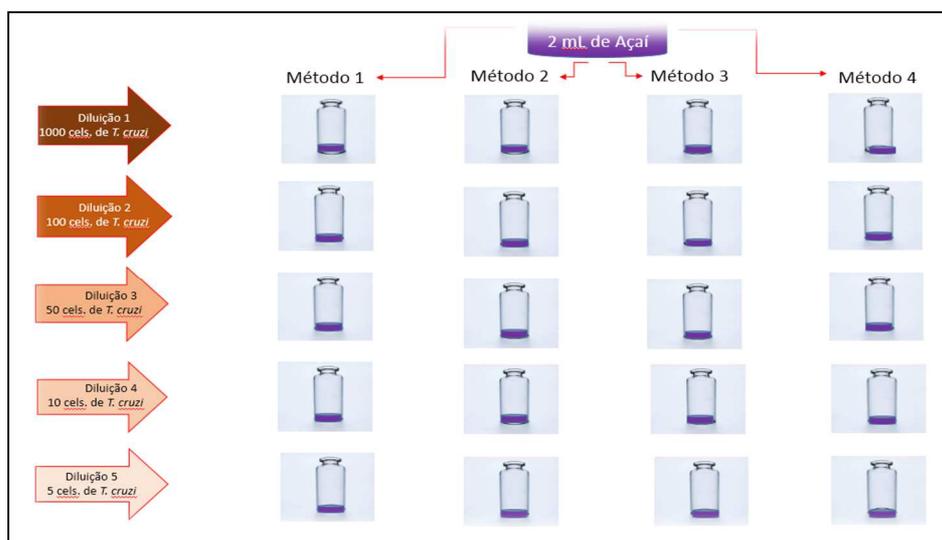
O açaí classificado como “açaí médio” teve seu conteúdo de 1 kg descongelado a 4°C, homogeneizado em “Seward Stomacher® 400 Laboratory Blender (Seward,UK) por 30 segundos e velocidade “normal”. O homogenato foi distribuído em frascos de polipropileno de 50 mL para ser utilizado nos experimentos.

A extração de DNA a partir de 2 mL foi do homogenato de açaí foi realizada segundo Cardarelli-Leite e colaboradores (2005) e em seguida uma PCR foi realizada segundo Chiurillo e colaboradores (2003) para confirmar a ausência de contaminação por *T. cruzi*.

### 3.5.2 Contaminação artificial do açaí

Para cada método de extração, cinco frascos de vidro de 30 mL receberam 2 mL do homogenato de açaí e uma alíquota de suspensão de células de *T. cruzi* CL Brener que resultou em número final de 1000 (Diluição 1), 100 (Diluição 2), 50 (Diluição 3), 10 (Diluição 4) e 5 (Diluição 5) células do parasito (Figura 11). Este procedimento foi repetido por três vezes, sendo 15 frascos por método, totalizando 60 frascos. Essa mistura de açaí e células do parasito foi submetida a um sistema de liofilização no equipamento Edwards L4KR, por cerca de 20 horas com o objetivo de reduzir o volume da mistura e obter um líofilo para proceder à extração.

Figura 11: Desenho esquemático da contaminação artificial do açaí com células de *T. cruzi*



Fonte: arquivo pessoal

### 3.5.3 Extração de DNA com quatro diferentes métodos

A partir do líofilo obtido no item anterior, foram testados quatro diferentes métodos de extração de DNA genômico. Dois métodos utilizam o brometo de

cetil-trimetil-amônio (CTAB), descritos por Cardarelli-Leite e colaboradores (2005) e Joint Research Centre (2005) e os outros dois são métodos disponíveis comercialmente: DNAzol® (Invitrogen), baseado no uso de guanidina e NucleoSpin® Food (MACHEREY-NAGEL), que utiliza membrana de sílica, utilizados segundo recomendações do fabricante com pequenas adaptações.

O método CTAB, conforme descrito por Cardarelli-Leite e colaboradores (2005), foi utilizado modificando o volume para 3500  $\mu\text{L}$  de detergente CTAB (20g CTAB/L; 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl; 20 mM EDTA, pH 8,0) que foi acrescentado ao líofilo e posteriormente homogeneizado em vortex por 30 segundos e em seguida distribuídos em 3 tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml. Após aquecidos a 65°C em banho seco durante 1h30 minutos e posteriormente centrifugados a 13000 x *g* por 10 minutos, 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados de 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e após centrifugação a 13000 x *g* por 10 minutos o sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionado de tampão de precipitação com CTAB (5g CTAB/L; 40 mM NaCl, pH 8,0) e incubado à temperatura ambiente durante 1h30 minutos. Após centrifugação a 13000 x *g* por 10 minutos, o precipitado foi dissolvido em NaCl (1,2 M) e adicionado de 350  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. Após centrifugação a 13000 x *g* por 10 minutos, o sobrenadante foi tratado com igual volume de álcool isopropílico gelado e incubado por 24h a -20°C. Após esse período, foi centrifugado a 13000 x *g* por 10 minutos a 4°C e o sedimento foi secado à temperatura ambiente e adicionado de 100  $\mu\text{L}$  de água purificada. O material foi deixado por aproximadamente 18 horas a 4°C e posteriormente ressuspenso com leve agitação.

No método CTAB, baseado no protocolo descrito em JRC (2005), há a incorporação de 50  $\mu\text{L}$  de solução de proteinase K (20mg/mL) juntamente com o tampão CTAB e posteriormente é realizada a adição de 20  $\mu\text{L}$  de solução de RNase A (10mg/mL) por tubo, ao final da incubação a 65 °C permanecendo por mais 10 minutos nessa incubação e a posterior inclusão de uma etapa de lavagem com clorofórmio. Ao término da extração, a lavagem do sedimento é realizada com 500  $\mu\text{L}$  de etanol a 70%.

O método DNAzol® foi utilizado modificando o volume do reagente para 3,5 mL que, junto ao líofilo de açaí foi homogeneizado em vortex por 30 segundos. Seu conteúdo foi dividido em 3 tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL que posteriormente foram centrifugados a 10000 x *g* por 10 minutos a 4°C, o

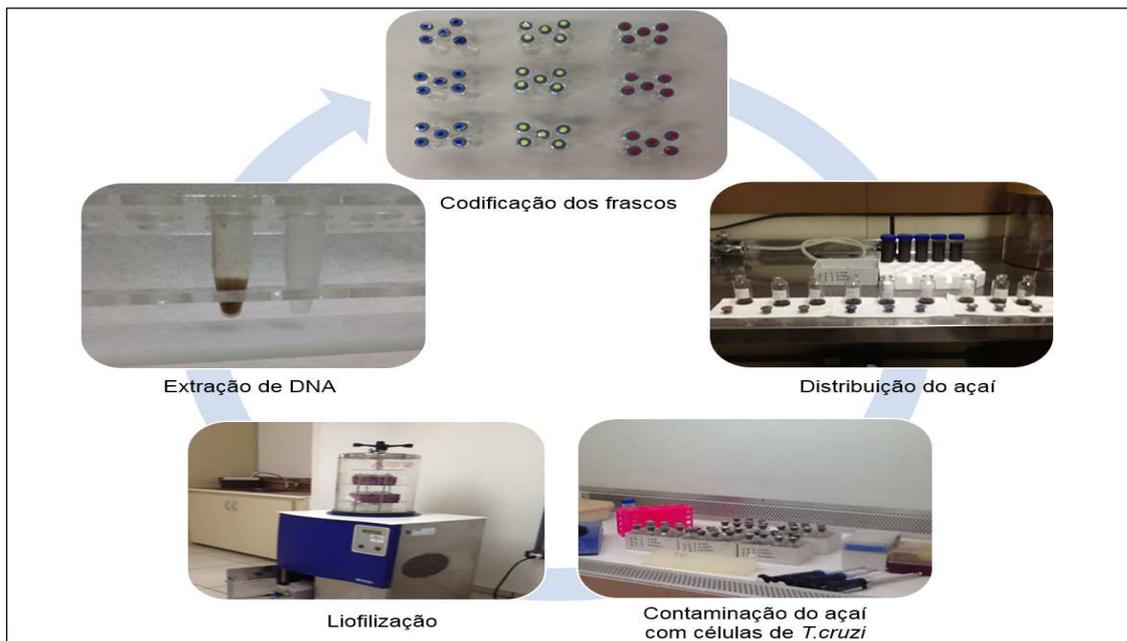
sobrenadante foi transferido para novo tubo do mesmo tipo. Foram acrescentados 500  $\mu\text{L}$  de etanol 100% gelado e posteriormente centrifugados a 5000 x g por 5 minutos a 4°C. Após descartado o sobrenadante, o DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, invertendo o tubo por 10 vezes. Após centrifugado a 1000 x g por 2 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi seco a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensão em 100  $\mu\text{L}$  de água.

O método NucleoSpin® Food foi utilizado com o dobro do tampão de lise CF (1,1 mL), que adicionado ao líolo de açaí, foi homogeneizado em vortex por 15 segundos e adicionados 10  $\mu\text{L}$  de proteinase K e homogeneizado novamente por 2 a 3 segundos. Após aquecimento a 65°C por 3 minutos foi centrifugado por 14000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado 1X o volume de tampão C4 e 1X o volume de etanol que foi misturado em vortex por 30 segundos. O conteúdo foi dividido em 2 colunas que foram centrifugadas a 11000 x g. O filtrado foi descartado e a primeira lavagem foi realizada utilizando 400  $\mu\text{L}$  de tampão CQW na coluna. Centrifugou-se por 1 minuto a 11000 x g e o filtrado foi descartado. A segunda lavagem foi realizada com 700  $\mu\text{L}$  de tampão C5 na coluna. Repetiu-se a segunda lavagem. A centrifugação foi realizada a 11000 x g e novamente foi o filtrado foi descartado. Finalmente a terceira lavagem foi realizada com 200  $\mu\text{L}$  de tampão C5 na coluna. Centrifugou-se por 2 minutos a 11000 x g para remover completamente o tampão. A coluna foi colocada em novo tubo e a eluição foi realizada com 100  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição CE pré-aquecido a 70°C por 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se por 1 minuto a 11000 x g para obter o DNA.

Todas as extrações de DNA foram realizadas em triplicata para cada método utilizado.

As etapas do procedimento estão representadas na Figura 12.

Figura 12: Representação esquemática para extração de DNA, mostrando as etapas da distribuição do açaí, da contaminação artificial do açaí e o processo de liofilização.



Fonte: arquivo pessoal

### 3.5.4 Avaliação da concentração e da pureza do DNA extraído

Após extração, a estimativa da concentração do DNA foi realizada através da medida espectrofotométrica da densidade ótica (DO) a 260 nm no equipamento GeneQuant™*pro* RNA/DNA calculator (Amersham Biosciences, UK) e as relações de absorvância  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  foram determinadas para verificar a pureza das preparações. A razão  $A_{260}/A_{280}$  é usada para estimar a pureza do ácido nucleico em relação à presença de proteína. Para um DNA puro esta razão deve estar entre 1,8 e 2,0. Já a razão  $A_{260}/A_{230}$  reflete a contaminação por substâncias como carboidratos, peptídeos, fenóis e compostos aromáticos. No caso de amostras puras esta razão deve estar acima de 2,2 (CORBISIER et al., 2007).

### 3.6 VERIFICAÇÃO DA AMPLIFICABILIDADE DO DNA EXTRAÍDO DE AÇAÍ

Para verificação da amplificabilidade do DNA foi realizada uma PCR utilizando um par de iniciadores universais para plantas que amplificam fragmentos do gene da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rbcL) presente no DNA dos cloroplastos das plantas.

Os iniciadores utilizados foram VPRBCP1 e VPRBCP2 (MBONGOLO MBELLA et al, 2011) que amplificam um fragmento de cerca de 95 pares de bases. Foram utilizados DNA extraídos de *Salmonella*, soja, milho, arroz, feijão e açaí para padronização.

Os ensaios de eletroforese foram realizados em cuba horizontal, empregando géis de agarose (Sigma) a 2% (p/v) com 2,5 µL de brometo de etídio (10 mg/ mL), preparados em TBE 1X (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA pH 8,4). Alíquotas de 25 µL dos produtos da PCR misturadas a 2 µL de tampão de aplicação corado (0,25g de azul de bromofenol, 0,25g de xileno cianol, 30mL de glicerol em 100 mL de Tris HCl 20mM pH 8,0, qsp) foram aplicadas no gel de agarose e a corrida eletroforética foi realizada em TBE 1X a 80V por 30 min e posteriormente a 100V por 90 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e registrados no analisador de imagens "ImageMaster-VDS-Pharmacia Biotech".

### 3.7 - AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DOS MÉTODOS SELECIONADOS

#### 3.7.1 Validação do método de extração de DNA selecionado

Após selecionado o método de extração mais eficiente, foi realizado sua validação utilizando dezoito frascos de vidro contendo cerca de 2 mL de açaí contaminados artificialmente com 100 células de *T. cruzi* cL Brener e submetidos à liofilização. O DNA foi extraído conforme método JRC (2005) em 6 réplicas e repetido por 3 dias consecutivos, perfazendo 18 extrações de DNA. Após

extração, a estimativa da concentração do DNA foi realizada através da medida espectrofotométrica da densidade ótica (DO) a 260 nm no equipamento GeneQuant TM *pro* RNA/DNA calculator (Amersham Biosciences, UK) e as relações de absorvância A260/280 e A260/230 foram determinadas para verificar a pureza das preparações. A PCR foi realizada sob as mesmas condições estabelecidas utilizando os iniciadores selecionados. Os resultados foram avaliados quanto à média, desvio padrão e coeficiente de avaliação e a sua amplificação na reação de PCR.

### 3.7.2 Limite de Detecção

Foram realizadas extrações de DNA a partir de um volume de 2 mL de açaí (mesma amostra utilizada no ensaio para escolha dos métodos) e de células de *T. cruzi* cL Brener, separadamente. As soluções de DNA obtidas foram quantificadas no equipamento GeneQuant<sup>TM</sup>*pro* RNA/DNA calculator (Amersham Biosciences, UK).

As amplificações por PCR segundo Chiurillo e colaboradores (2003) foram realizadas utilizando 2 $\mu$ L de DNA a partir de uma concentração 120 ng/ $\mu$ L, ou seja, uma concentração fixada em 240 ng de DNA de açaí por reação, acrescidos de 3  $\mu$ L de DNA extraídos de diluições sucessivas de células de *T. cruzi* cL Brener que variaram de 420 ng a 4,2 fg.

### 3.7.3 Seletividade

O teste de seletividade da PCR foi realizado com 25 cepas de espécies relacionadas e cepas não relacionadas à espécie de *Trypanosoma cruzi*, pertencentes a 7 famílias diferentes, conforme quadros 4 e 5. Para a detecção da espécie desejada foram testadas 4 cepas de *Trypanosoma cruzi*: *Trypanosoma cruzi* (COLTRYP 016), *Trypanosoma cruzi* (COLTRYP 043), *Trypanosoma cruzi* (COLTRYP 370) e *Trypanosoma cruzi* cL Brener (INI).

Para as espécies intimamente relacionadas foram testadas 10 espécies dos dois principais gêneros da família Trypanosomatidae: *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cervi*, *Trypanosoma lewsi*, *Trypanosoma mega*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania lawsoni*, *Leishmania naiffi* e *Leishmania shawi*.

Para espécies não relacionadas, mas com possibilidade de estarem presentes na amostra de açaí foram selecionadas 5 espécies de bactérias indicadoras qualidade sanitária: *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* e ainda 4 fungos relacionados ao ambiente e deterioração do fruto: *Saccharomyces cerevisiae*, *Ogataea polymorpha*, *Alternaria alternata* e *Botrytis cinérea* (TOURNAS e KATSOUZAS, 2005; CONCHA-MEYER, 2015).

Após estabelecido no teste de Limite de Detecção a menor concentração de DNA amplificada na PCR, foi utilizada uma quantidade pelo menos 100 vezes maior de DNA para o teste de seletividade.

#### 3.7.4 Estudo matriz

O estudo matriz foi realizado com amostras de “polpa de açaí”, “açaí fino”, “polpa de açaí com xarope de guaraná e morangos em pedaços” e “néctar misto de açaí e banana”. Uma alíquota de 2 mL de cada amostra foi transferida para frasco de vidro e adicionada uma diluição de 100 células de *T. cruzi* cL Brener. Essa mistura foi liofilizada por cerca de 18 h e posteriormente as extrações de DNA foram realizadas em duplicata, segundo JRC (2005) e a PCR segundo Chiurillo e colaboradores (2003).

### 3.8 DETECÇÃO DO DNA DE *Trypanosoma cruzi* POR PCR NAS AMOSTRAS DE AÇAÍ COLETADAS NO MERCADO.

#### 3.8.1 Preparo de acordo com tipo de amostra

##### 3.8.1.1 *Açaí, polpa de açaí, açaí com frutas, sorvete, picolé, mingau e néctar.*

A amostras foram descongeladas a 4°C, homogeneizadas em “Seward Stomacher® 400 Laboratory Blender (Seward, UK) e uma alíquota de 2 mL foi transferida para frasco de vidro e congelada a -18°C por 24 h. Após esse procedimento, foi liofilizada por pelo menos 18 horas.

##### 3.8.1.2 *Bombom e docinho*

A amostra de docinho de açaí foi homogeneizada, retirando-se pequenos pedaços e misturando-os com o total da amostra. Pequenas porções foram retiradas de diferentes partes da amostra e pesadas até a totalidade de 100 mg em tubos eppendorf de 1,5 mL, em triplicata.

Para o preparo da amostra de bombom foi necessário descartar a camada de chocolate e utilizar apenas o recheio. Após esse preparo, foram pesados 100 mg do recheio de bombom em tubos Eppendorf de 1,5 mL, em triplicata.

##### 3.8.1.3 *Semente e fruto de açaí*

Os frutos/sementes de açaí foram transferidos para saco plástico e uma alíquota de 20 mL de água estéril foi adicionada. O saco contendo a semente/fruto com a água foi completamente fechado e homogeneizado

invertendo-o por 50 vezes. A água de lavagem foi transferida para bécher de 100 mL e um pedaço de gaze estéril foi colocado na abertura do béquer e amarrado com barbante. Posteriormente congelado a -18 °C por 24 h. Após esse procedimento foi liofilizada pelo menos 18 horas.

### 3.8.2 Metodologia de análise

A metodologia de extração de DNA foi realizada de acordo com JRC (2005). Após extração, a estimativa da concentração do DNA foi realizada através da medida espectrofotométrica da densidade ótica (DO) a 260 nm no equipamento GeneQuant™*pro* RNA/DNA calculator (Amersham Biosciences, UK) e as relações de absorbância A260/280 e A260/230 foram determinadas para verificar a pureza das preparações.

As PCR para verificação da amplificabilidade do DNA extraído e para detecção de *T. cruzi* foram realizadas segundo Mbongolo Mbella e colaboradores (2011) e Chiurillo e colaboradores (2005), respectivamente.

### 3.9 GENOTIPAGEM POR PCR *MULTILOCUS* DE *T. cruzi* PROVENIENTES DE DNA EXTRAÍDOS DE AMOSTRAS DE AÇAÍ

A genotipagem foi realizada em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ).

A caracterização molecular do *T. cruzi* em DTUs foi realizada seguindo metodologias descritas em Burgos e colaboradores (2007) e Ramirez e colaboradores (2010), baseadas em reações de PCR *multilocus* (Quadro 7). A identificação subsequente dos genótipos se baseia no conjunto dos perfis dos produtos de PCR apresentados para cada alvo, utilizando vários marcadores moleculares (Figura 13). Uma região intergênica do gene do *Spliced Leader* utilizando os iniciadores TCac (CTCCCCAGTGTGGCCTGGG) e UTCC

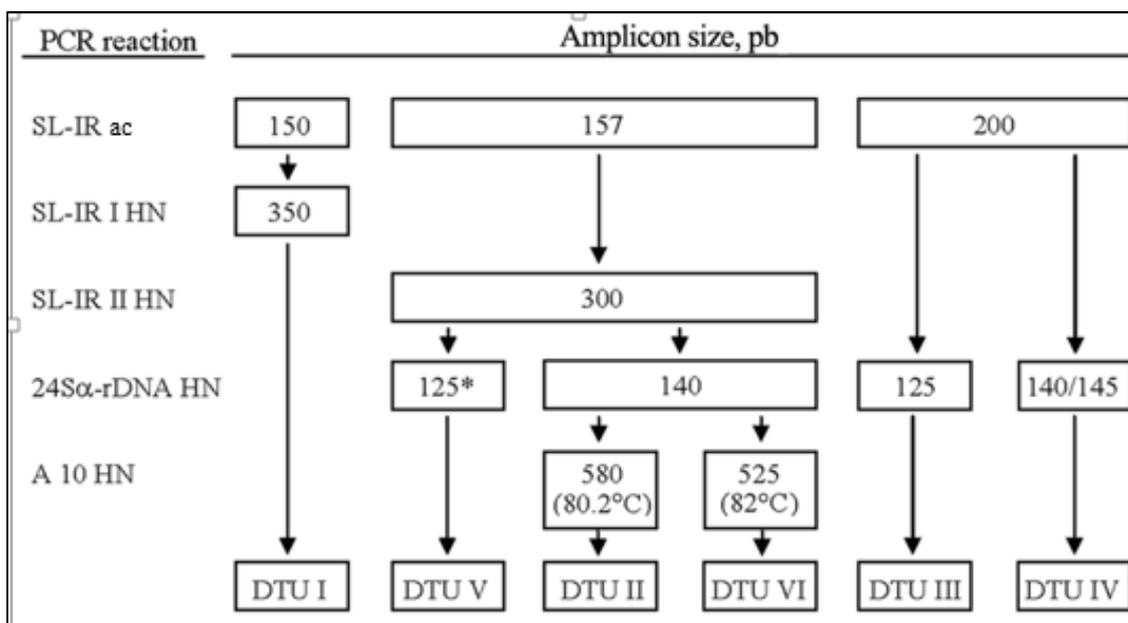
(CGTACCAATATAGTACAGAACTG) diferenciando em TcI (150 pb), TcII, V e VI (157 pb) e TcIII e IV (200 pb). Outra região intergênica do gene do *Spliced Leader* utilizando os iniciadores TCC (CCCCCTCCCAGGCCACACTG), TC1 (TCCGCCACCTCCTTCGGGCC) e TC2(CCTGCAGGCACACGTGTGTG) (descrito por Souto e colaboradores (1996), adaptado por Marcet e colaboradores (2006)) diferenciando TcI (350 pb), TcII, V e VI (300 pb) e TcIII e IV (não são amplificados). O domínio variável D7 do gene da subunidade 24 $\alpha$  do RNA ribossomal, em semi-nested utilizando os iniciadores D75 (GCAGATCTTGGTTGGCGTAG) e D76 (GGTTCTCTGTTGCCCTTTT) para a primeira rodada, e posteriormente os iniciadores D71 (AAGGTGCGTCGACAGTGTGG) e D76 (GGTTCTCTGTTGCCCTTTT) para a segunda rodada para distinguir TcII e VI (140 pb), TcIII (125 pb), TcIV (140/145 pb) e TcV(125 ou 125+140 pb) (BRISSE et al., 2000a). A região do fragmento nuclear A10 utilizando, em semi-nested, os iniciadores Pr1 (CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA) e P6 (GTGATCGCAGGAAACGTGA) para a primeira rodada, e posteriormente os iniciadores Pr3 (CGTGGCATGGGGTAATAAAGCA) e Pr1 (CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA) para a segunda rodada, sendo esta última feita por PCR em tempo real para diferenciar TcII (80,2<sup>o</sup> C da temperatura de *melting*) e TcVI (82<sup>o</sup> temperatura de *melting*) (BRISSE e colaboradores (2000b), adaptado por BURGOS e colaboradores (2007)). As reações de amplificação de PCR convencional foram preparadas em um volume total de 30 $\mu$ L, enquanto as reações em PCR em tempo real foram realizadas com volume total de 10  $\mu$ L. As reações de PCR convencional constituíram de 1x de Tampão *Taq* Polimerase (pH 8,3), 250  $\mu$ M de soluções de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,67  $\mu$ M de cada primer, 5 Unidades/ $\mu$ L de *Taq DNA Polymerase Platinum* e 5  $\mu$ L de DNA. As reações de PCR em tempo real consistiram de 2x Tampão SYBR Green Master Mix, 0,5  $\mu$ M de cada primer e 2  $\mu$ L de DNA.

Quadro 7: Condições de PCR para a tipagem molecular.

Alvos	Iniciadores	Sequências	Termociclagem			
			Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos
<b>SL-IR ac</b>	TCac	CTCCCCAGTGTG GCCTGGG	94°C/30''	70°C/30''	72°C/30''	3
			94°C/30''	68°C/30''	72°C/30''	3
	UTCC	CGTACCAATATA GTACAGAAACTG	94°C/30''	66°C/30''	72°C/30''	4
			94°C/30''	64°C/30''	72°C/30''	4
			94°C/30''	62°C/30''	72°C/30''	36
<b>SL-IR I e II</b>	TCC	CCCCCCTCCCAG GCCACACTG	94°C/1'	67°C/1'	72°C/1'	5
			94°C/1'	65°C/1'	72°C/1'	5
			94°C/1'	63°C/1'	72°C/1'	5
	TC1	TCCGCCACCTCC TTCGGGCC	94°C/1'	61°C/1'	72°C/1'	30
			94°C/1'	61°C/1'	72°C/1'	30
	TC2	CCTGCAGGCACA CGTGTGTG	94°C/1'	61°C/1'	72°C/1'	30
<b>24S<math>\alpha</math>-rDNA (primeira rodada)</b>	D75	GCAGATCTTGGT TGGCGTAG	94°C/30''	64°C/45''	72°C/1'	3
			94°C/30''	62°C/45''	72°C/1'	3
	D76	GGTTCTCTGTTG CCCCTTTT	94°C/30''	60°C/45''	72°C/1'	3
			94°C/30''	58°C/45''	72°C/1'	35
<b>24S<math>\alpha</math>-rDNA (segundada rodada)</b>	D71	GGTTCTCTGTTG CCCCTTTT	94°C/30''	60°C/30''	72°C/30''	6
			94°C/30''	57°C/30''	72°C/30''	6
	D76	GGTTCTCTGTTG CCCCTTTT	94°C/30''	55°C/30''	72°C/30''	30
<b>Fragmento A10 (primeira rodada)</b>	Pr1	CCGCTAAGCAGT TCTGTCCATA	94°C/1'	60°C/1'	72°C/1'	5
			94°C/1'	57°C/1'	72°C/1'	5
			94°C/1'	55°C/1'	72°C/1'	5
	P6	GTGATCGCAGGA AACGTGA	94°C/1'	58°C/1'	72°C/1'	35
<b>Fragmento A10 (segunda rodada)</b>	Pr1	CCGCTAAGCAGT TCTGTCCATA	94°C/1'	65°C/1'	72°C/1'	35
	Pr3	CGTGGCATGGG GTAATAAAGCA	94°C/1'	65°C/1'	72°C/1'	35

Fonte: BURGOS et al., 2007

Figura 13. Fluxograma para caracterização molecular por PCR *multilocus* de *T. cruzi* em DTUs.



Fonte: BURGOS et al., 2010.

Os ensaios de eletroforese foram realizados em cuba horizontal, empregando géis de agarose (Sigma) a 2% (p/v) com 2,5  $\mu$ L de brometo de etídio (10 mg/ mL), preparados em TBE 1X (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA pH 8,4). Alíquotas de 25  $\mu$ L dos produtos da PCR misturadas a 2  $\mu$ L de tampão de aplicação corado (0,25g de azul de bromofenol, 0,25g de xileno cianol, 30mL de glicerol em 100 mL de Tris HCl 20mM pH 8,0, qsp) foram aplicadas no gel de agarose e a corrida eletroforética foi realizada em TBE 1X a 80V por 30 min e posteriormente a 100V por 90 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e registrados no analisador de imagens "ImageMaster-VDS-Pharmacia Biotech".

### 3.10 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PELO SISTEMA SYBR® GREEN.

Foram utilizados os mesmos iniciadores selecionados para serem utilizados na PCR convencional (CHIURILLO et al, 2003). Estes foram testados

com soluções de DNA extraídas de *T. cruzi* cL Brener, *T. cruzi* (COLTRYP 016, 055, 295 e 307), *T. mega*, *T. rangeli* e com diversos produtos com açai.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume total de 25 µL contendo o reativo Power SYBR® Green (1X) (corante SYBR Green®, AmpliTaq Gold® DNA polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, referência passiva e tampão 10 nM Tris HCl pH 8,3; 50 nM KCl), 0,24 µM de cada par de iniciadores e 5,0 µL de DNA molde (5 a 100 nanogramas).

A termociclagem foi realizada a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

Após a reação de PCR foi feita a Curva de Dissociação, para análise das temperaturas de “melting” (T<sub>m</sub>), a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e aquecimento lento até 95°C (APPLIED BIOSYSTEMS, 2007).

Na etapa de padronização, com o objetivo de confirmar os fragmentos amplificados, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2% usando TBE 1X nas condições de 100 volts por 1h.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXTRAÇÃO DE DNA DAS CEPAS DE TRYPANOSOMATÍDEOS, BACTÉRIAS, FUNGOS E ALIMENTOS UTILIZADOS NO ESTUDO PARA AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS.

Os resultados da dosagem de DNA das cepas de tripanosomatídeos, bactérias e fungos utilizadas no estudo estão relacionados na tabela 1.

A extração de DNA de açaí médio foi realizada com método que utiliza CTAB segundo JRC (2005) e foram obtidos 120 ng/μL.

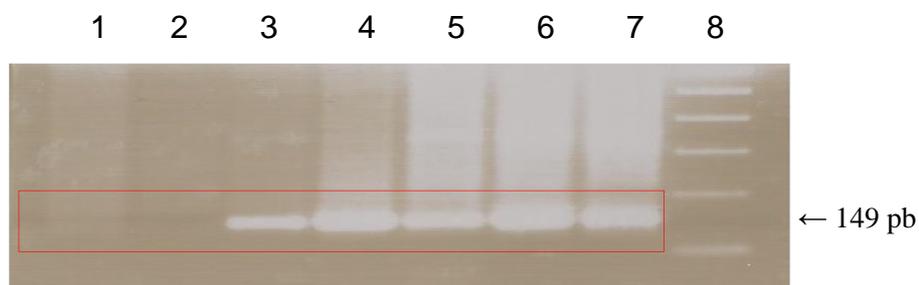
Tabela 1 - Resultado da quantificação de DNA em ng/μL das cepas de tripanosomatídeos, bactérias e fungos utilizados no estudo.

<b>Tripanosomatídeos</b>	<b>Bactérias e Fungos</b>
<i>T. cervi</i> - 22,8 ng/μL	<i>B. cereus</i> - 8,9 ng/μL
<i>T. rangeli</i> - 22,8 ng/μL	<i>S. aureus</i> - 11,3 ng/μL
<i>T. cruzi</i> (COLPROT 295) - 23,2 ng/μL	<i>Salmonella</i> - 48 ng/μL
<i>T. lewisi</i> - 20,4 ng/μL	<i>E. coli</i> - 13,8 ng/μL
<i>T. mega</i> - 600 ng/μL	<i>C. sassazaki</i> - 40,0 ng/μL
<i>T. cruzi</i> (COLTRYP 016) - 3,49 ng/μL	<i>A. alternata</i> - 333 ng/μL
<i>T. cruzi</i> (COLTRYP 055) - 1,91 ng/μL	<i>B. cinerea</i> - 150 ng/μL
<i>T. cruzi</i> (COLTRYP 370) - 8,24 ng/μL	<i>S. cerevisiae</i> - 1020 ng/μL
<i>L. shawi</i> - 20,0ng/μL	<i>O. polymorpha</i> - 1024 ng/μL.
<i>L. braziliensis</i> - 21,6 ng/μL	
<i>L. naiffi</i> - 21,6 ng/μL	
<i>L. lainsoni</i> - 20,8 ng/μL	
<i>L. amazonensis</i> - 4,64 ng/μL	
<i>L. guyanensis</i> - 7,16 ng/μL	
<i>T. cruzi</i> cL Brener - 141 ng/μL	

## 4.2 ESCOLHA DOS INICIADORES PARA PADRONIZAÇÃO DA PCR

A avaliação “*in silico*” dos iniciadores, realizada no Primer-BLAST, demonstrou especificidade dos iniciadores constantes no quadro 6 com o *Trypanosoma cruzi*, mas ao avaliar a especificidade experimental dos mesmos iniciadores frente ao DNA genômico de *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *T. rangeli* e *T. cruzi*, foi possível observar que os iniciadores descritos por Piron e colaboradores (2007), Souto e colaboradores (1996) e Virreira e colaboradores (2003), não são específicos para detecção de *T. cruzi*. A Figura 14, como exemplo, mostra que houve amplificação com os DNA de *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, apresentando bandas de 149 pares de bases com os iniciadores descritos por Piron e colaboradores (2007).

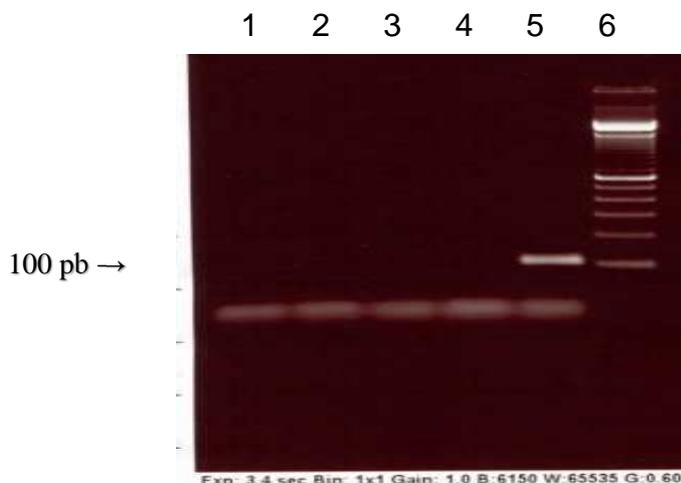
Figura 14 - Gel de agarose a 2% com amplificações de cepas de referência com os iniciadores TCZ3 e TCZ4.



Legenda: Pistas: 1 - CRM, 2 - *E. coli*, 3 - *T. rangeli*, 4 - *L. braziliensis*, 5 - *L. amazonensis*, 6 - *T. cruzi* (COLTRYP 055), 7 - *T. cruzi* CL Brener, 8 - PM 100pb.

Dos cinco pares de iniciadores testados, o selecionado foi aquele que amplifica uma região telomérica da superfamília *T. cruzi* gp85/sialidase, com um fragmento de 100 pb (Chiurillo et al., 2003). Sua escolha baseou-se na seletividade em amplificar o *T. cruzi* e não amplificar espécies da mesma família como *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma rangeli* (Figura 15).

Figura 15: Gel de agarose a 2% com ampliações de cepas de referência com os iniciadores Tc189F e Tc189.



Legenda: Pistas: 1 - CRM, 2- *T. rangeli*,  
3 - *L. braziliensis*, 4 - *L. amazonensis*, 5 -  
*T. cruzi*, 6 - PM 100pb.

#### 4.3 ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA

Para cada diluição de células misturada ao açaí, foram realizadas três leituras no espectrofotômetro e a concentração média de DNA extraído a partir de açaí contaminado com células de *T. cruzi* pelos três métodos utilizados está apresentada na tabela 2. A avaliação da pureza dos DNA extraídos pelos três métodos através da razão  $A^{260}/A^{280}$  e  $A^{260}/A^{230}$ , após retirada de 3 valores aberrantes pelo teste de Grubbs, também pode ser observada na tabela 2.

Na extração com NucleoSpin®, o material resultante da liofilização foi pesado para verificar se sua massa estava conforme recomendação do fabricante (até 200 mg). Alguns ajustes no protocolo foram realizados como o dobro do tampão de lise CF e a repetição da lavagem com tampão C5. Ainda assim não foram obtidas leituras no espectrofotômetro, portanto não puderam compor a tabela 2.

Tabela 2 - Média dos dados obtidos das extrações de DNA com CTAB e DNAzol com os respectivos desvios padrão e coeficientes de variação (%)

Método de extração	Açaí contaminado com células de <i>T. cruzi</i>	Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L)	A260:A280	A260:A230	Inibição da PCR
<b>CTAB (Cardarelli - Leite, 2005)</b>	(1000 cels)	80 $\pm$ 7 (8,8%)	2,3 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,7	Não
	(100cels)	85 $\pm$ 1 (1,2%)	2,4 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,5	Sim
	(50 cels)	79 $\pm$ 10 (12,7%)	2,5 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,8	Sim
	(10 cels)	82 $\pm$ 11 (13,4%)	2,4 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,9	Não
	(5 cels)	82 $\pm$ 17 (20,8%)	2,5 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,3	Sim
<b>CTAB (JRC, 2005)</b>	(1000 cels)	73 $\pm$ 18 (24,7)	2,0 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 1,4	Não
	(100 cels)	76 $\pm$ 14 (18,4%)	1,9 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,3	Não
	(50 cels)	80 $\pm$ 20 (25%)	2,1 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	Não
	(10 cels)	66 $\pm$ 1 (1,5%)	2,1 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,5	Não
	(5 cels)	70 $\pm$ 6 (8,6%)	1,9 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 1,1	Não
<b>DNAzol</b>	(1000 cels)	302 $\pm$ 36 (12%)	1,5 $\pm$ 0,0	0,42 $\pm$ 0,0	Sim
	(100 cels)	331 $\pm$ 36 (11%)	1,5 $\pm$ 0,1	0,40 $\pm$ 0,0	Sim
	(50 cels)	338 $\pm$ 119 (35,2%)	1,3 $\pm$ 0,0	0,21 $\pm$ 0,0	Sim
	(10 cels)	314 $\pm$ 75 (24%)	1,3 $\pm$ 0,0	0,21 $\pm$ 0,0	Sim
	(5 cels)	349 $\pm$ 63(18%)	1,4 $\pm$ 0,0	0,21 $\pm$ 0,0	Sim

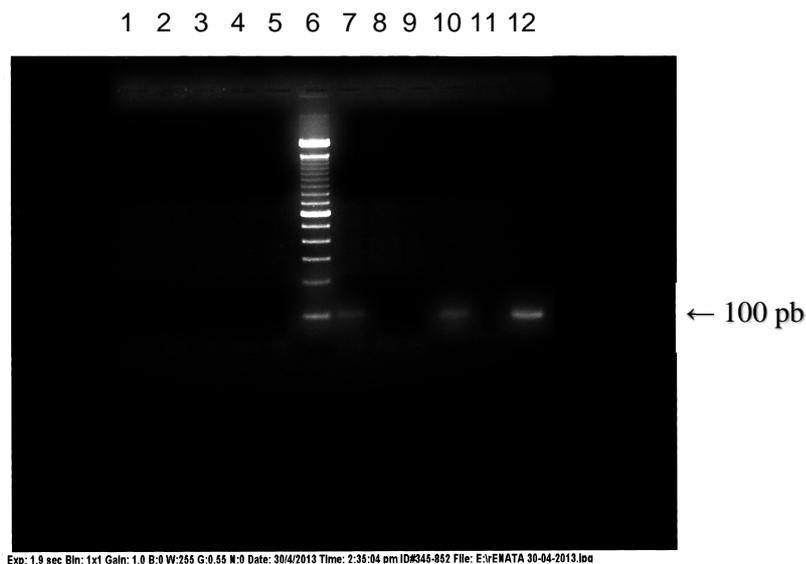
A escolha do melhor método de extração foi baseada em sua eficiência em extrair DNA de *T. cruzi* em uma matriz de açaí, sem que houvesse inibição da reação de PCR e apresentasse valores entre 1,8 e 2,0 para a razão A260/A280 e acima de 2,2 para a razão A260/A230.

De acordo com os resultados obtidos, o método CTAB segundo JRC (2005) resultou em DNA com maior grau de pureza. Em contrapartida estão as extrações realizadas com DNAzol apresentando resultados com menor grau de pureza. As mais altas concentrações de DNA foram obtidas com o método DNAzol (amostras apresentaram concentrações entre 266 e 412 ng/ $\mu$ L), enquanto os demais métodos apresentaram concentrações variando de 65 a 86 de DNA por  $\mu$ L de eluído.

Os resultados negativos para amplificação do gene alvo utilizando a PCR, mostraram que as soluções de DNA obtidas pelos métodos CTAB segundo Cardarelli-Leite et al., 2005 e DNAzol apresentam substâncias inerentes à amostra ou em resíduos do método de extração que inibem a reação da PCR (Figura 16). Para confirmar a presença de inibidores, diluições com os DNA obtidos na proporção 1:10 foram realizados e observou-se amplificação com os DNA extraídos com CTAB segundo segundo Cardarelli-Leite e colaboradores

(2005). O mesmo não aconteceu com as amostras extraídas com DNAzol, mostrando sua ineficiência para a aplicação neste estudo.

Figura 16: Gel de agarose a 2% com amplificações de DNA contaminado artificialmente com células de *T. cruzi* com os iniciadores Tc189F e Tc189R.



Legenda. Pistas: 1- 1000 céls., 2- 100 céls., 3-50 céls., 4- 10 céls., 5- 5 céls.(1 a 5 com método DNAzol), 6 - PM 100 pb 7- 1000 céls., 8- 100 céls., 9- 50 céls., 10- 10 céls., 11- 5 céls.(7 a 11 com método Cardarelli-Leite et, al.,2005), 12 - *T. cruzi* (controle positivo)

Os resultados com as extrações realizadas com CTAB segundo JRC (2005), mostraram a efetiva extração dos ácidos nucleicos do parasito e a não inibição da PCR com o volume de 2 mL de açaí na matriz, sendo, portanto, o método de escolha (Figura 17).

Figura 17: Gel de agarose a 2% com ampliações de DNA contaminado artificialmente com células de *T. cruzi* com os iniciadores Tc189F e Tc189R:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

100 pb →

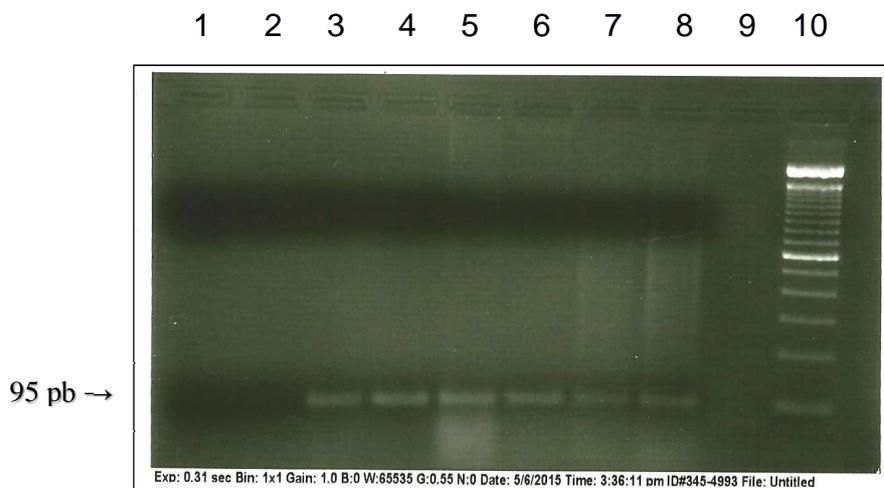


Legenda. Pistas: 1, 3, 9, 11 e 12 - Vazios. 2 e 10 - PM 100 pb, 4 a 8 - Açaí contaminado artificialmente com 1000, 100, 50, 10 e 5 células de *T. cruzi*, respectivamente. (Método JRC, 2005).

#### 4.4 VERIFICAÇÃO DA AMPLIFICABILIDADE DO DNA EXTRAÍDO DE AÇAÍ

Na padronização da reação de PCR utilizando os iniciadores VPRBCP1 (5`AGGTCTAADGGRTAAGCTAC3`) e VPRBCP2 (5`AGYCTTGATCGTTACAAAGG3`) segundo Mbongolo Mbella et al, 2011, bandas equivalentes a 95 pares de base foram observadas em gel de agarose a 2% com DNA extraído de arroz, feijão, soja, milho, açaí e polpa de açaí (Figura 18). Não houve amplificação com DNA extraído da cepa de *Salmonella*, como esperado.

Figura 18: Gel de agarose a 2% com amplificações de DNA de diferentes vegetais com os iniciadores VPRBCP1 e VPRBCP2.



Legenda. Pistas: 1 - CRM, 2 - *Salmonella*, 3 - arroz, 4 - feijão, 5 -soja, 6 - milho, 7 - açai, 8 - polpa de açai, 9 - Vazio, 10 - PM 100pb.

As reações de PCR com DNA extraídos de vários tipos de açai e polpa também apresentaram bandas de tamanhos equivalentes a 95 pares de bases, demonstrando a amplificabilidade dos DNA obtidos pelo método de extração selecionado (Figura 19).

Figura 19: Gel de agarose a 2% com amplificações de diferentes tipos de açai com os iniciadores VPRBCP1 e VPRBCP2.



Legenda: 1 - PM 50pb, 2 - CRM, 3 – *Salmonella* (controle negativo), 4 - açai fino, 5 - açai grosso, 6 a 9 - açai, 10 - polpa de açai, 11 - Soja (controle positivo), 12 - PM 100pb.

## 4.5 - AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DOS MÉTODOS SELECIONADOS

### 4.5.1 - Validação do método selecionado para extração de DNA

Os dados referentes à média da concentração de DNA de todas as réplicas na etapa de validação constam na tabela 3.

A avaliação das 18 extrações apresentou uma média de 70,6 ng/μL de DNA, com desvio padrão de 9,8 ng/μL e um coeficiente de variação de 13,9%.

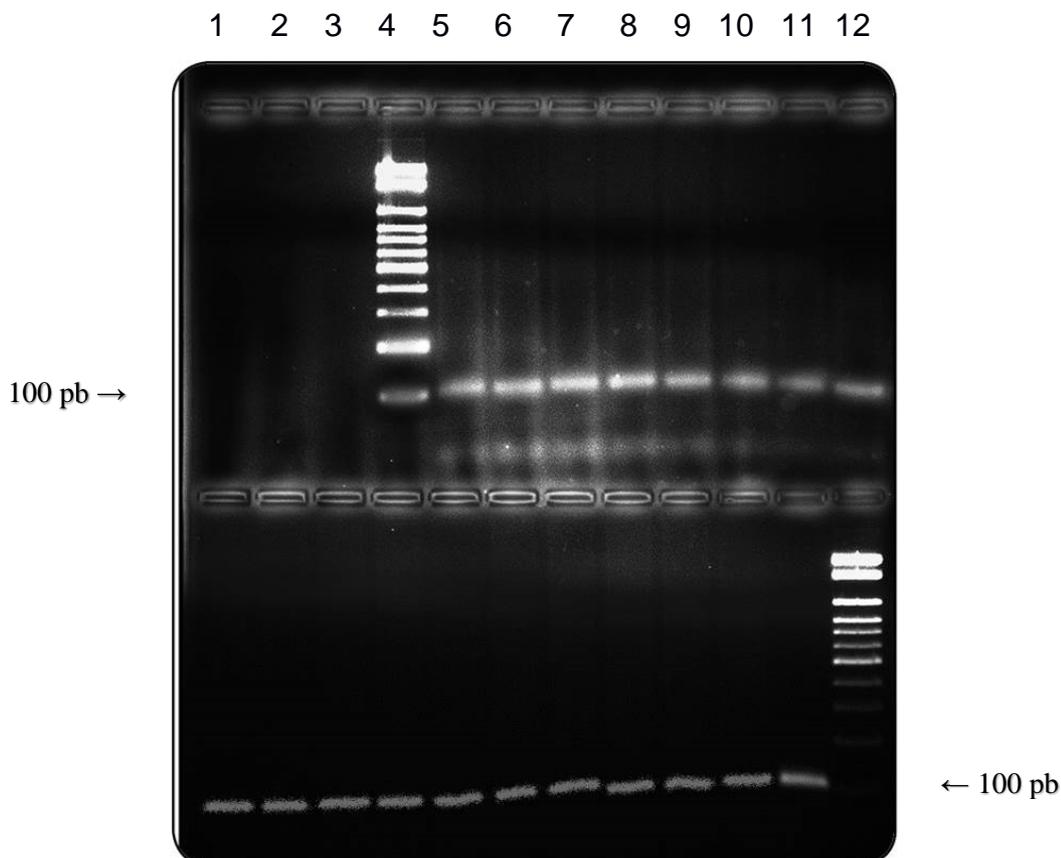
Tabela 3: Concentração de DNA (ng/uL), das 18 réplicas extraídas em 3 dias

Réplicas	Concentração (ng/μL)
A	69,2
B	66,0
C	69,4
D	72,4
E	84,6
F	84,4
G	78,2
H	52,4
I	61,0
J	75,2
K	54,0
L	63,6
M	73,4
N	66,6
O	76,0
P	63,0
Q	87,2
R	74,6

Legenda: A - F (primeiro dia), G - L (segundo dia), M- R (terceiro dia).

A ausência de inibidores da PCR foi demonstrada através da amplificação do fragmento de 100 pb referente ao tamanho do fragmento do *T. cruzi* presente no açaí através da contaminação proposital do mesmo (Figura 20).

Figura 20: Gel de agarose a 2% com bandas de 100 pb das 18 extrações de DNA obtidas da validação com os iniciadores Tc189F e Tc189R.



Legenda. Pistas Superiores: 1 - CRE, 2 - CRM, 3 - *T. rangeli* (controle negativo); 4 - 100 pb (Gibco-BRL), 5 a 10 - réplicas de A - F, 11-12 - réplicas G - H.

Pistas Inferiores: 1 a 4 - réplicas I - L, 5 a 10 - réplicas M - R. 11 - *T. cruzi* cL Brener (controle positivo); 12 - 100 pb (Gibco-BRL).

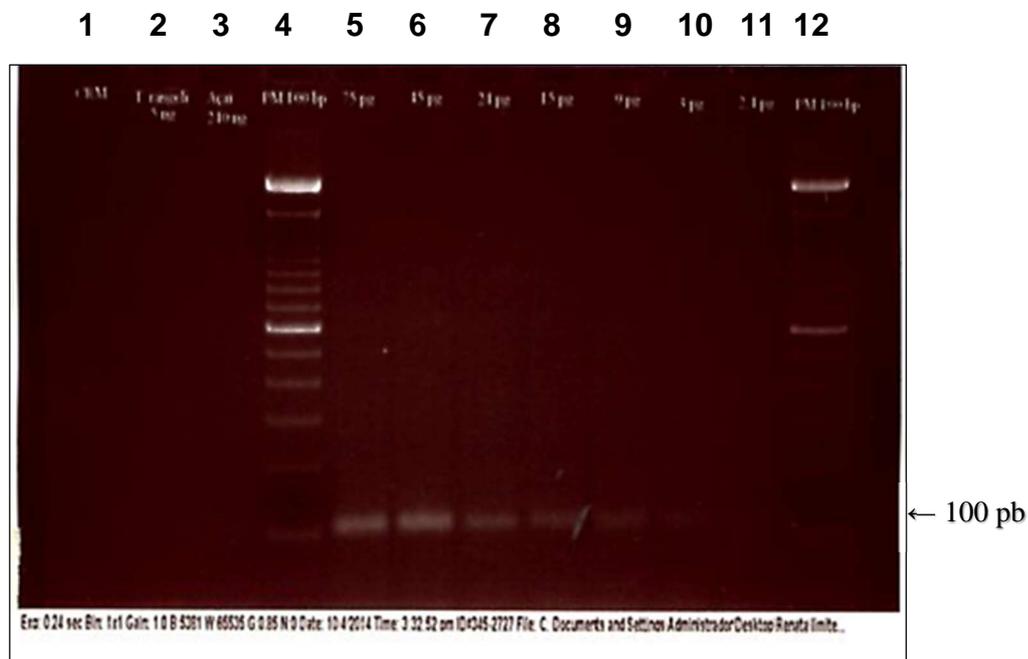
#### 4.5.2 - Limite de detecção

À uma concentração estabelecida de 240 ng de DNA de açáí foram acrescentadas diluições de DNA de *T. cruzi* cL Brener que variaram de 420 ng a 4,2 fg. A menor quantidade de alvo detectável por PCR foi de 3 pg verificada em 3 repetições (Figura 21).

Para cada reação foram misturados 2  $\mu$ L de DNA de açáí e 3  $\mu$ L de DNA de uma das diluições de células de *T. cruzi*, de forma decrescente a partir de 140 ng/ $\mu$ L. Foram realizados os controles dos reagentes do mix (CRM) que utiliza

água ao invés de DNA, o negativo (CN) que utiliza o *Trypanosoma rangeli* e o controle da matriz, que utiliza apenas o açaí sem as células.

Figura 21: Gel de agarose a 2% com amplificações de diferentes diluições de DNA de *T. cruzi* com 240 ng de DNA de açaí com os iniciadores Tc189F e Tc189R:



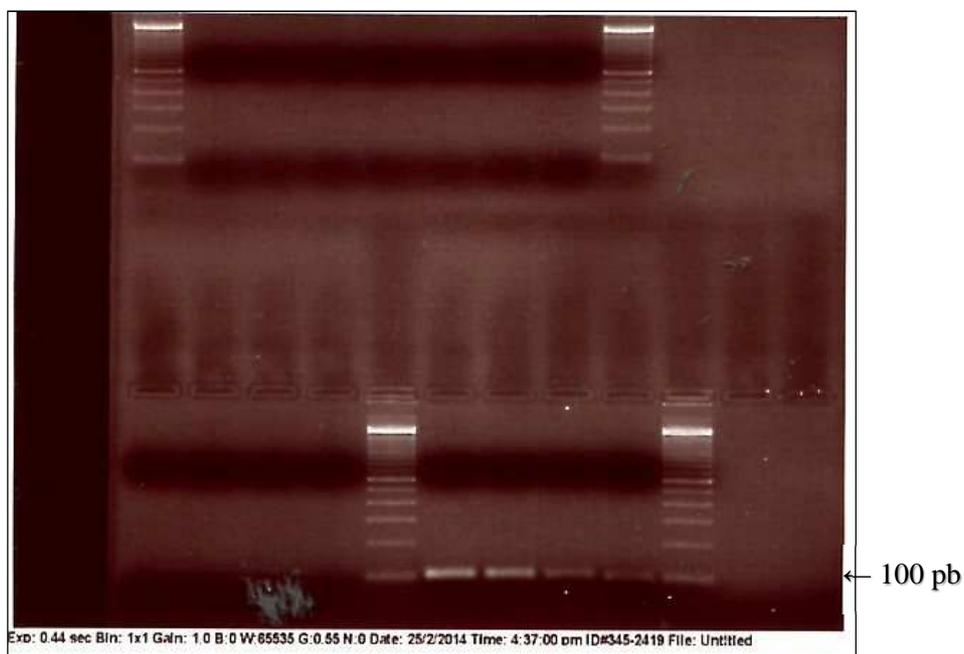
Legenda. Pistas: 1 – CRM, 2 - *T. rangeli* (5 ng), 3 - Açaí sem *T. cruzi*, 4 - PM 100 pb, 5 – Açaí com 75 pg *T. cruzi*, 6 - Açaí com 45 pg *T. cruzi*, 7 - Açaí com 24 pg *T. cruzi*, 8 - Açaí com 15 pg *T. cruzi*, 9 - Açaí com 9 pg *T. cruzi*, 10 - Açaí com 3 pg *T. cruzi*, 11 - Açaí com 2,4 pg *T. cruzi*, 12 - PM 100 pb.

#### 4.5.3 Seletividade

As reações de PCR com os iniciadores Tc189F e Tc189R (CHIURILLO et al, 2003) foram realizadas utilizando 2 ng de DNA por reação das espécies pertencentes à família Trypanosomatidae, das espécies de fungos e de bactérias. Dentre as espécies da família Trypanosomatidae, somente as espécies de *T. cruzi* apresentaram amplificação com os iniciadores Tc189F e Tc189R (Figura 22). Na Figura 23 pode ser observada a não amplificação com os DNA extraídos de bactérias e fungos utilizando os mesmos iniciadores.

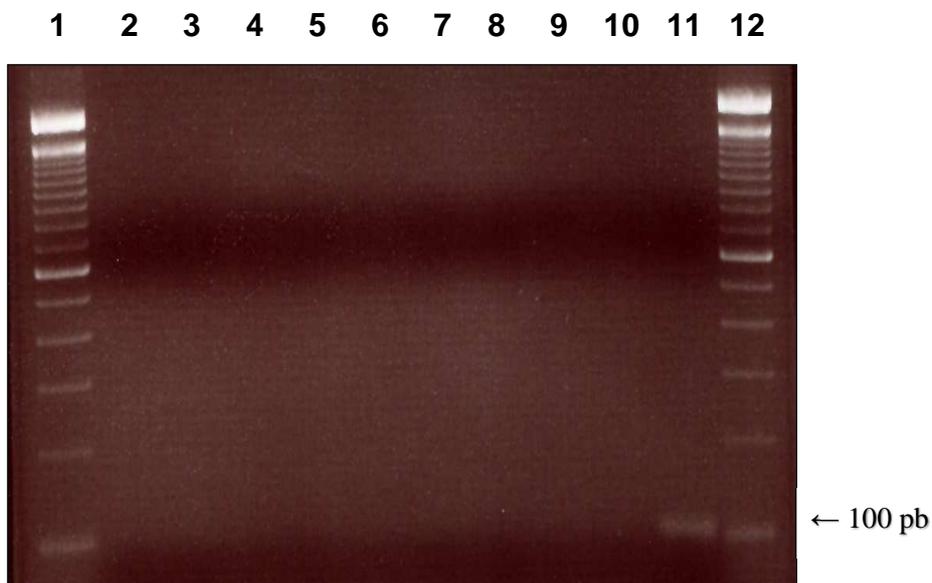
Figura 22: Gel de agarose a 2% com amplificações de cepas de referências com os iniciadores Tc189F e Tc189R .

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Legenda. Pistas superiores: 1- PM 100pb, 2 - CRM, 3 - *T. rangeli*, 4 - *T. cervi*, 5 - *T. lewsi*, 6 - *T. mega*, 7 - *L. amazonenses*, 8 - *L. braziliensis*, 9 - PM 100 pb. Pistas inferiores: 1 - *L. guyanensis*, 2 - *L. lawsoni*, 3 - *L. naiffi*, 4 - *L. shawi*, 5 - PM 100pb, 6 - *T. cruzi TCI*, 7 - *T. cruzi TCII*, 8 - *T. cruzi Z3*, 9 - *T. cruzi cL Brener*, 10 - PM 100 pb

Figura 23: Gel de agarose a 2% mostrando ausência de amplificação de cepas de bactérias e fungos com os iniciadores Tc189F e Tc189R.

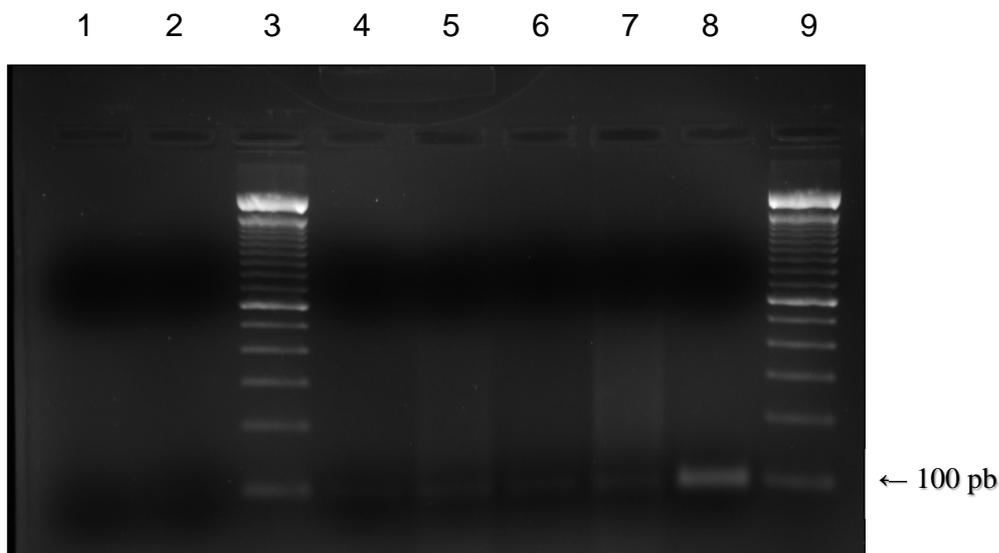


Legenda: Pistas: 1 - PM 100pb, 2 - *A. alternata*; 3 - *B. cinerea*, 4 - *O. polymorpha*, 5 - *S.cerevisiae*, 6 - *B. cereus*, 7 - *C. sakazaki*; 8 - *E. coli*, 9 - *Salmonella*, 10 - *S. aureus*, 11 - *T. cruzi*, 12 - PM 100pb.

#### 4.5.4 Estudo matriz

Todas os diferentes produtos contendo açaí (polpa de açaí, açaí fino, polpa de açaí com xarope de guaraná e morangos em pedaços e néctar misto de açaí e banana) apresentaram amplificação de 100 pb (Figura 24) quando submetidos à reação de PCR com os iniciadores Tc189F e Tc189R (CHIURILLO et al, 2003).

Figura 24: Gel de agarose a 2% mostrando as amplificações com diferentes tipos de produtos com açaí.

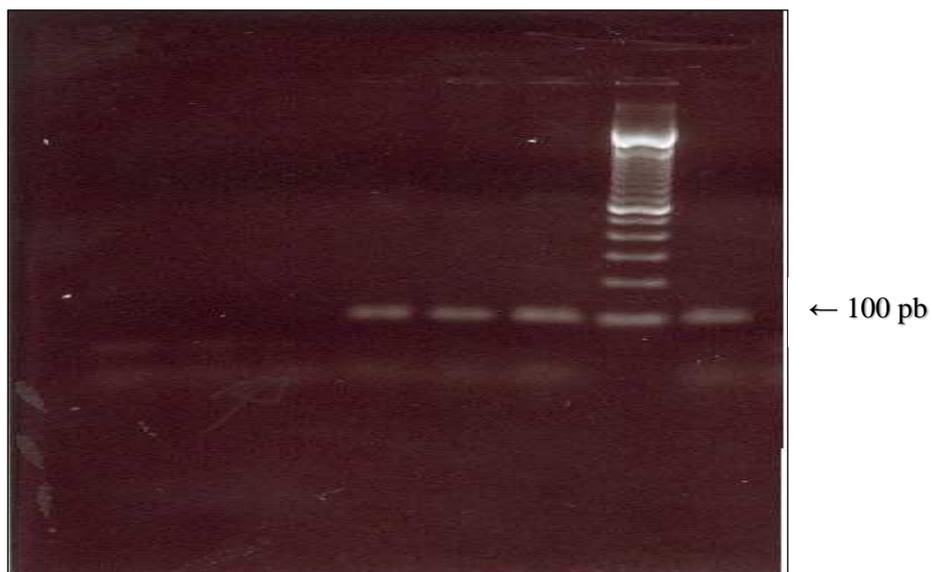


Legenda: Pistas: 1 – CRM, 2 – *Salmonella*, 3 e 9 - PM 100pb, 4 - Néctar de açaí e banana, 5 - Polpa com frutas, 6 – Polpa, 7 - Açaí fino, 8 – *T. cruzi*

#### 4.6 DETECÇÃO DO *Trypanosoma cruzi* NAS AMOSTRAS DE AÇAÍ POR PCR CONVENCIONAL

Dentre as 47 amostras coletadas em 2010, 11 amostras (23,4%) apresentaram resultado positivo para amplificação da banda de 100 pb com os iniciadores descritos por Chiurillo e colaboradores (2003) (Figura 25). Três amostras positivas coletadas no Rio de Janeiro (açaí com guaraná, açaí com guaraná e morango e açaí com guaraná e banana) eram da mesma marca, assim como outras duas amostras (açaí com guaraná e morango e açaí com guaraná e banana), também coletadas no Rio de Janeiro, possuem marcas iguais. Avaliando as amostras coletadas somente no Rio de Janeiro, verifica-se uma totalidade de 47% de amostras positivas. Enquanto que as coletadas no Pará uma totalidade de 10% de positividade. Esses resultados podem ser observados na Tabela 4 e Figuras 26 e 27.

Figura 25: Gel de agarose a 2% com aplicações de amostras de açai com os iniciadores Tc189F e Tc189R.



Legenda: 1 a 3 - CRM, CRE, *T. rangeli*, 4 a 6 - amostras de açai, 7 - PM 100 pb, 8 - *T. cruzi*.

Tabela 4: Resultado das amostras coletadas no Rio de Janeiro e Pará em 2010.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Local de fabricação</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Amostras analisadas</b>	<b>Amostras positivas</b>
<b>Açaí</b>	PA, AP, SP	RJ	9	2
	PA	PA	9	1
<b>Açaí com guaraná e/ou frutas</b>	GO, SP	RJ	8	6
<b>Fruto</b>	PA	PA	11	2
<b>Semente</b>	PA	PA	2	0
<b>Polpa</b>	PA	PA	2	0
<b>Gelado comestível</b>	PA	PA	2	0
<b>Mingau de arroz com açaí</b>	PA	PA	2	0
<b>Sobremesa com açaí</b>	PA	PA	2	0
<b>Total de amostras</b>			47	11

Legenda: Amapá (AP), Goiás (GO), Pará (PA), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP).

Figura 26: Resultado das amostras coletadas no Rio de Janeiro em 2010.

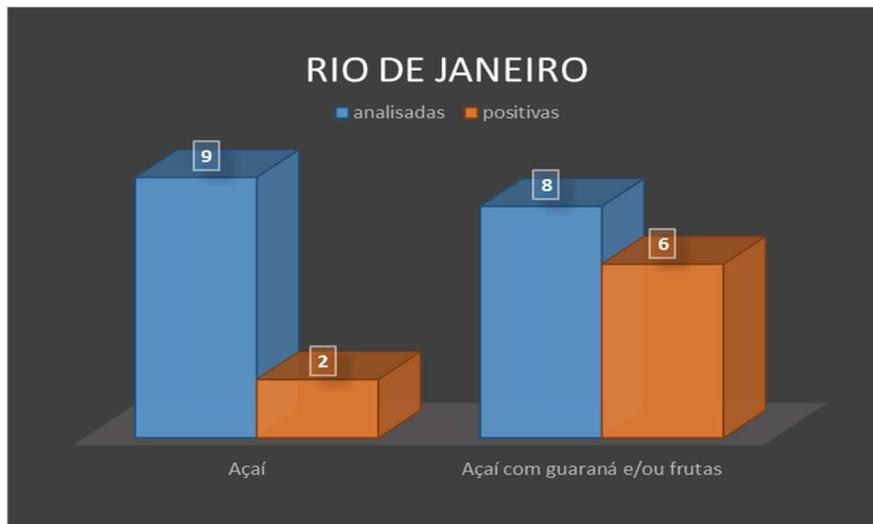


Figura 27: Resultado das amostras coletadas no Pará em 2010.



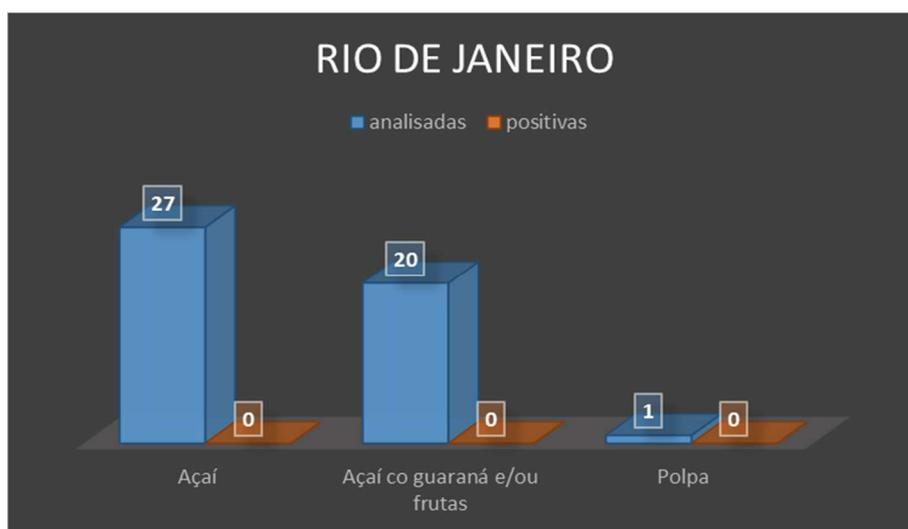
Nenhuma das amostras coletadas no Estado do Rio de Janeiro, no período de 2011 a 2012, apresentou resultado positivo (Tabela 5, Figura 28).

Tabela 5: Resultados das amostras coletadas nos anos de 2011 e 2012 no Rio de Janeiro.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Local de fabricação</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>Amostras analisadas</b>	<b>Amostras positivas</b>
<b>Açaí</b>	PA, AP, RS, PE	2011	18	0
		2012	9	0
	SP, GO, BA			
<b>Açaí com guaraná e/ou frutas</b>	GO, SP	2012	20	0
<b>Polpa</b>	SP	2012	1	0
<b>Total de amostras</b>			48	0

Legenda: Amapá (AP), Bahia (BA), Goiás (GO), Pará (PA), Pernambuco (PE), Rio Grande do Sul (RS), São Paulo (SP).

Figura 28: Resultado das amostras coletadas no Rio de Janeiro no período entre 2011 e 2012.



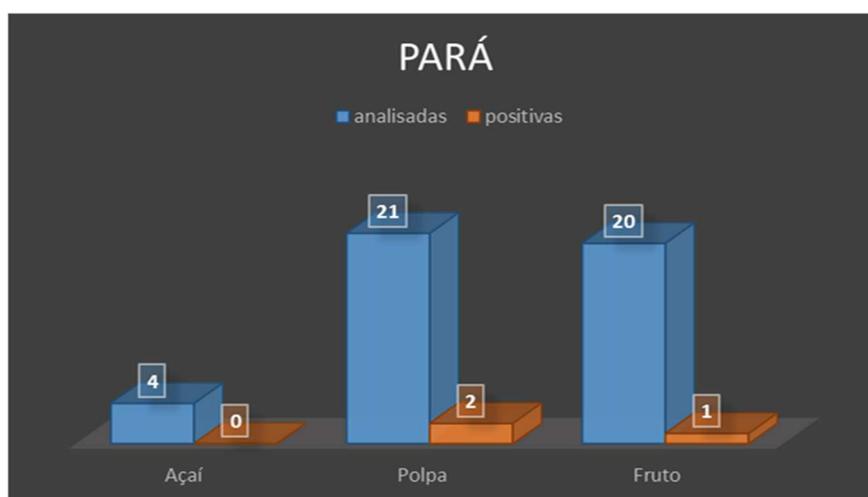
Das 44 amostras coletadas no Pará, no período de 2012 a 2015, que fizeram parte do programa de monitoramento do açaí, 2 amostras apresentaram resultados positivos apenas no ano de 2012 (1 polpa e 1 fruto). A amostra de polpa de açaí coletada pela professora Lúcia (UFRJ) em 2013 apresentou resultado positivo. Portanto do total de 45 amostras analisadas, 3 amostras (duas polpas e um fruto) (6,6%) apresentaram resultados positivos (Tabela 6, Figura 29).

Tabela 6: Resultado das amostras coletadas no Pará, no período de 2012 a 2015.

Tipo de amostra	Local de fabricação	Ano de coleta	Amostras analisadas	Amostras positivas
Açaí	PA	2015	4	0
Polpa	PA	2012	15	1
		2013	6	1
Fruto	PA	2012	15	1
		2013	5	0
<b>Total de amostras</b>			<b>45</b>	<b>3</b>

Legenda: Pará (PA)

Figura 29: Resultado das amostras coletadas no Pará no período entre 2012 e 2015.



#### 4.7 GENOTIPAGEM POR PCR *MULTILOCUS* DE *T. cruzi* PROVENIENTES DE DNA EXTRAÍDOS DE AÇAÍ

Todas as amostras com resultado positivo na PCR convencional foram submetidas à tipagem molecular, utilizando os marcadores do algoritmo apresentado (Quadro 7).

A região intergênica do Spliced Leader (SL-IR) foi usada para distinguir TcI (150 pb), II, V e VI (157 pb) de TcIII e IV (200 pb). A PCR semi-nested SL-IR-I foi utilizada para identificar TcI (350 pb), e a PCR semi-nested SL-IV-II foi usada para identificar TcII, V e VI (300 pb).

A PCR semi-nested do 24S rDNA foi usada para distinguir TcV (125 ou 125 + 140 pb) de TcII e VI (140 pb); e a PCR em tempo real semi-nested com alvo no fragmento nuclear A10 foi usada para discriminar TcII de TcVI.

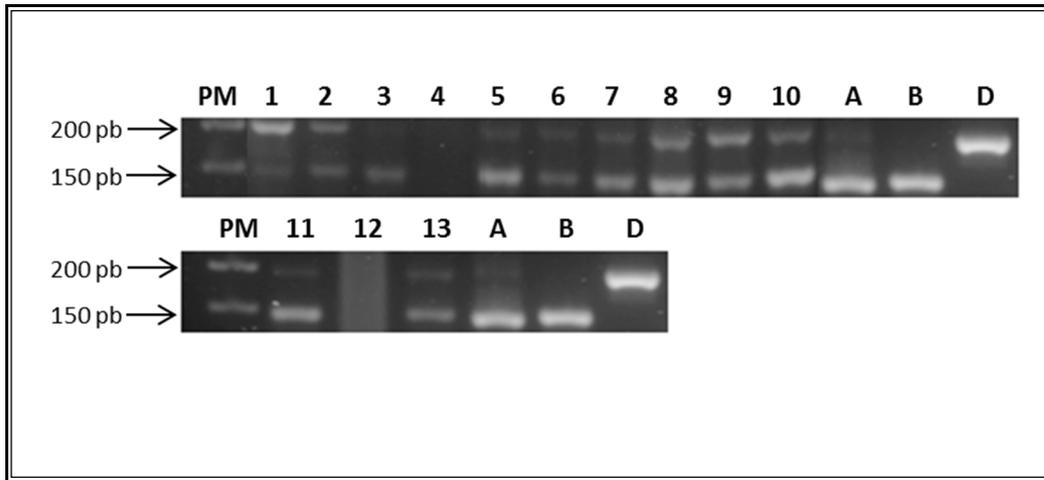
As amostras que apresentaram resultados positivos nos alvos SL-IR e SL-IR II, mas negativos no alvo 24S rDNA foram consideradas como TcII, V, ou VI. As amostras que amplificaram o fragmento de 140 pb do alvo 24S rDNA, mas que apresentaram resultados negativos para o alvo A10 da PCR em Tempo Real foram consideradas como TcII ou VI (Figura 13).

O resultado da genotipagem nas amostras de açaí que foram selecionadas por conter DNA de *T. cruzi* estão dispostas na tabela 7.

As figuras 30, 31 e 32 apresentam fragmentos das ampliações de PCR *multilocus* nas amostras de açaí.

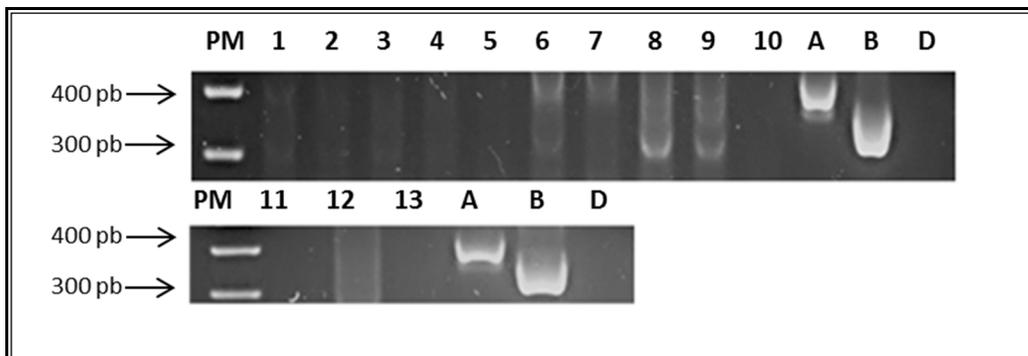
A figura 33 mostra a curva de melting com ampliações dos controles positivos (cepas “y” e “CL Brener”) e amostras de açaí.

Figura 30: Gel de agarose a 3 % com amplificações de amostras de açaí com os iniciadores TCac e UTCC para a região SL-IR ac.



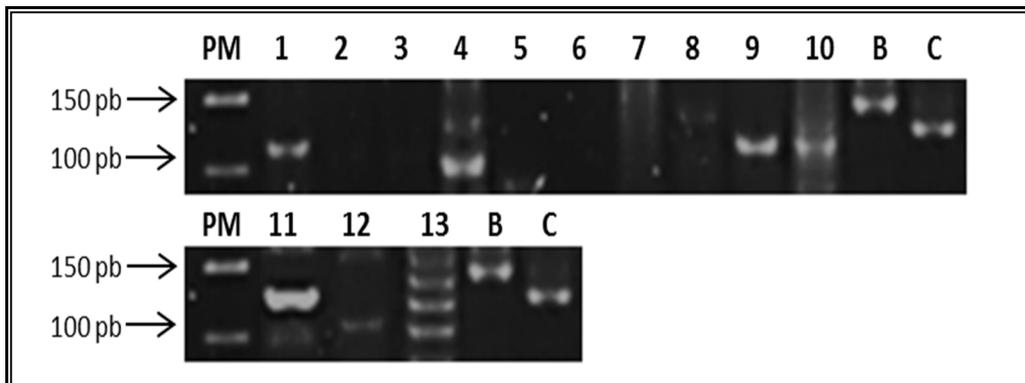
Legenda: PM – Peso molecular de 50pb; 1 – 13 amostras de açaí; A– Dm28c (Referência DTU TcI); B – Y (Referência DTU TcII); D – 4167 (Referência DTU TcIV)

Figura 31: Gel de agarose a 3 % com amplificações de amostras de açaí com os iniciadores TC1 e TC2 para a região SL-IR I e II.



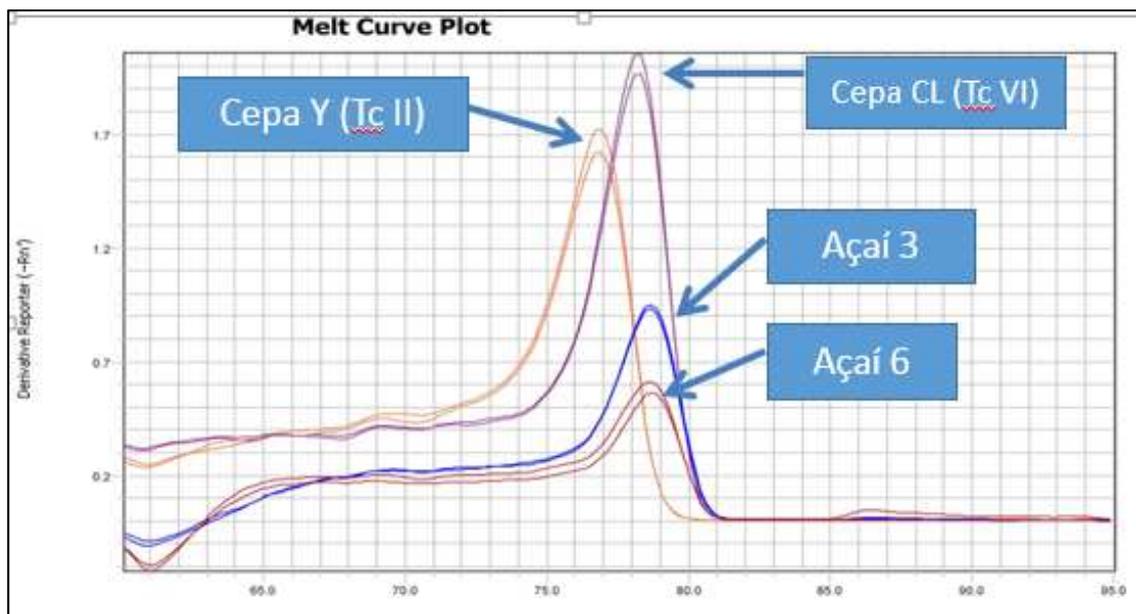
Legenda: PM – Peso molecular de 100 pb; 1 – 13 amostras de açaí; A– Dm28c (Referência DTU TcI); B – Y (Referência DTU TcII); D – 4167 (Referência DTU TcIV).

Figura 32: Gel de agarose a 3 % com amplificações de amostras de açaí com os iniciadores D71 e D76 para a região 245 $\alpha$ .



Legenda: PM – Peso molecular de 50 pb; 1 – 13 amostras de açaí; B – Y (Referência DTU TcII); C – 222 (Referência DTU TcIII)

Figura 33: Curva de *melting* com amplificações dos controles positivos as cepas Y (Referência DTU TcII) e CL Brener (Referência DTU TcVI) e duas amostras de açaí com os iniciadores PR1 e Pr3 para a região do fragmento nuclear A10.



Legenda curvas de melt: Ceba Y – 76,78°C (Referência DTU II), Ceba CL– 78,2°C (Referência DTU TcVI), Açaí 7 – 78,7°C (TcVI), Açaí 10 – 78,7°C (TcVI)

Tabela 7: Resultado da genotipagem em amostras de açaí.

Amostras	Identificação da amostra	SL-IRac	SL-IR I e II	24S-a	A10	DTU
1	AGF (M) - RJ	150+157+200	300+350	125	x	I +III+V
2	AGF (B) - RJ	157+200	300	125	x	III+V
3	AGF (B) - RJ	200	NA	x	78,2°C	NI
4	AG - RJ	NA	NA	NA	x	NI
5	AGF (M e A) - RJ	150+157+200	NA	NA	x	NI
6	AGF (M) - RJ	150+157+200	300+350	NA	78,2°C	I +VI+(III ou IV)
7	A - RJ	150+200	350	NA	x	I+(III ou IV)
8	A - RJ	157+200	300	140	NA	IV+(II ou VI)
9	A - RJ	150+157+200	300+350	125	x	I+III+V
10	F - PA	157+200	NA	125	x	III+V
11	F - PA	157+200	NA	140	NA	IV+(II ou VI)
12	P - PA	NA	300	NA	x	NI
13	F - PA	157+200	NA	125	x	III+V

Legenda: A = açaí; P = polpa; F = fruto; AG = açaí com guaraná; AGF = açaí com guaraná e fruta; (M) = morango; (B) = banana; (Me A) = morango e acerola; RJ = coletado no RJ; PA = coletado no Pará, NA = não amplificou; NI = não identificado, x = não realizado

#### 4.8 PCR EM TEMPO REAL COM SISTEMA SYBR GREEN PARA DETECÇÃO DE *T. cruzi* EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS CONTENDO AÇÁÍ.

A quantidade de DNA das cepas de referência utilizadas no estudo ficou estabelecida na faixa entre 5 e 25 ng de DNA por reação. Não obteve-se amplificação quando foram utilizados quantidades acima de 125 ng de DNA por reação.

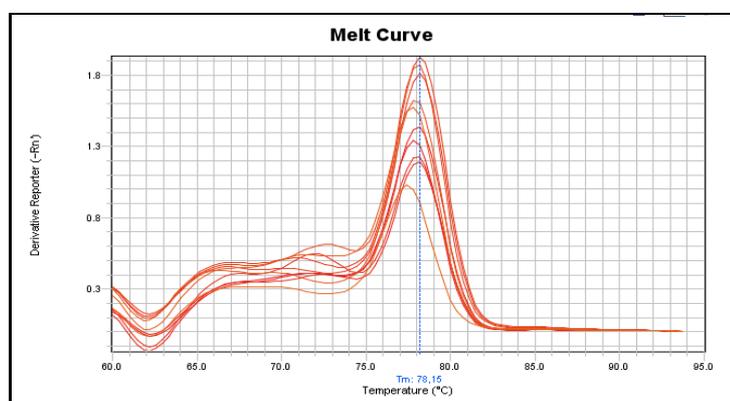
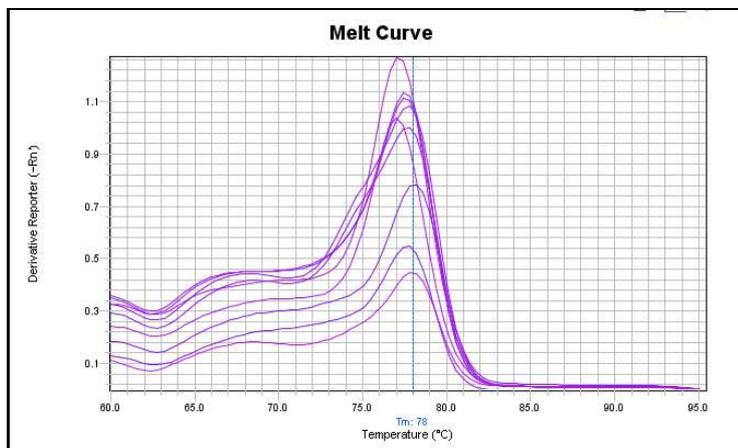
Os valores de “T<sub>m</sub>” obtidos para as diferentes cepas de *T. cruzi* (INI/CL Brener, COLTRYP 016, 055, e 370, COLPROT 295) variaram de 77,4 a 78,1<sup>o</sup>C. Todas as cepas de *T. cruzi* apresentaram um único pico de fluorescência na curva de dissociação. As amostras de alimentos apresentaram valores de “T<sub>m</sub>” próximos aos obtidos pelas cepas de *T. cruzi*, de 77,6 a 78,3<sup>o</sup>C. *Trypanosoma mega* e *Trypanosoma rangeli* foram utilizados como controles negativos e apresentaram uma “T<sub>m</sub>” de 80,5<sup>o</sup>C, mas com uma amplificação indeterminada, e “T<sub>m</sub>” de 78,3<sup>o</sup>C, mas com dois picos de fluorescência na curva de dissociação, respectivamente (Figura 34).

As amostras consideradas positivas na PCR convencional foram utilizadas na PCR em tempo Real com sistema SYBR Green. As mesmas foram consideradas positivas quando o valor da “T<sub>m</sub>” estava dentro da faixa estabelecida com as cepas de *T. cruzi*, apresentando amplificação observada pelo valor de “C<sub>t</sub>” e com perfil da curva de dissociação compatível com as cepas de *T. cruzi*.

Uma amostragem de cerca de 20% das amostras consideradas negativas na PCR convencional foram utilizadas na PCR em tempo Real com sistema SYBR Green. Apenas uma amostra apresentou resultado discordante com a PCR em tempo Real.

Figura 34: Curva de *melting* mostrando os controles positivos de *T. cruzi* e as amostras de açai positivas.

(a)



(b)

Legenda. (a): Curva de *melting* dos controles positivos *T. cruzi* cL Brener, *T. cruzi* (COLTRYP 016), *T. cruzi* (COLTRYP 055), *T. cruzi* (COLTRYP 370), *T. cruzi* (COLPROT 295); (b): amostras de açai positivas.

#### 4.9 RESULTADOS DE COLABORAÇÕES COM OUTROS INSTITUTOS

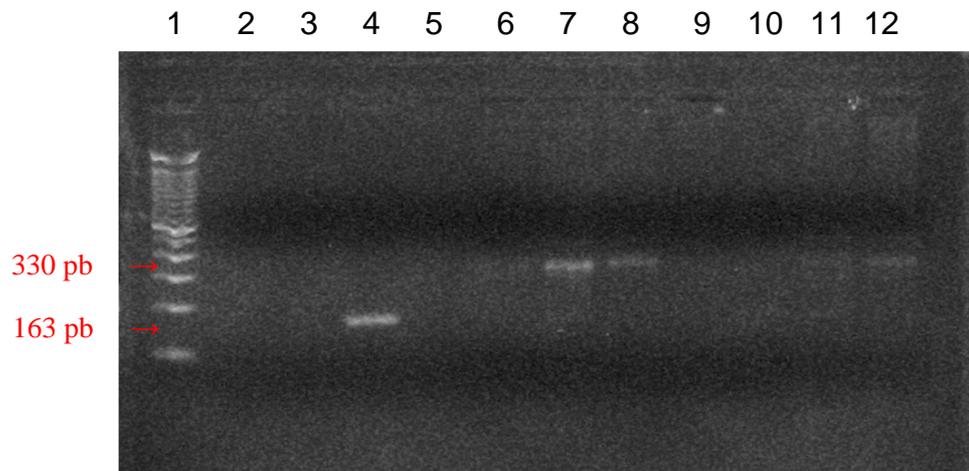
Como desdobramento desse trabalho, algumas colaborações foram realizadas com o Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como descritas a seguir:

#### 4.9.1 Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ)

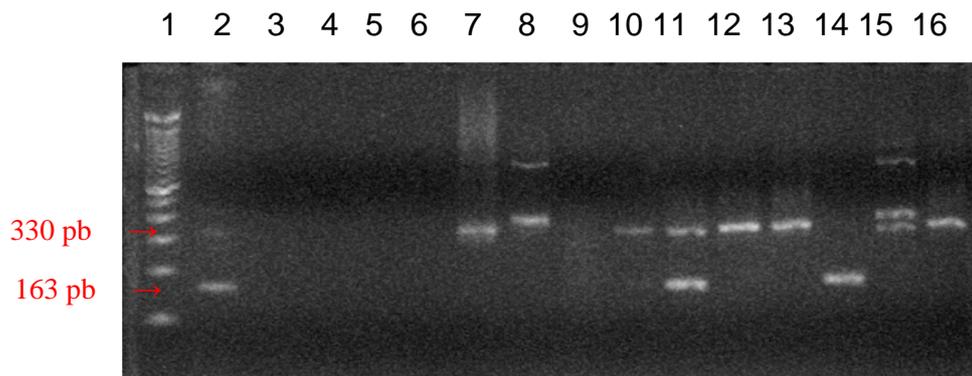
As amostras que apresentaram resultados positivos tiveram seus DNA enviados para Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) para que uma reação de multiplex PCR, com um alvo no kDNA de *T. cruzi* e um alvo no gene correspondente à subunidade 12S do RNA ribossomal de triatomíneos, fosse realizada a fim de comparar os resultados.

Das treze (13) amostras positivas enviadas, 6 (seis) foram detectadas como positivas pelo LABIMDOE. As duas amostras negativas enviadas foram também consideradas negativas para o LABIMDOE. As 7 (sete) amostras não detectadas como positivas para o LABIMDOE foram: açaí com frutas (4), fruto (2) e açaí (1). Interessante notar que a amostra da pista 2 do gel inferior apresentou duas bandas de tamanhos compatíveis à presença de *T. cruzi* (330 pb) e de Triatomíneo (163 pb) na amostra de açaí coletada no Pará no ano 2010 (Figura 35).

Figura 35: Gel de agarose mostrando a amplificação de DNA extraído de amostras consideradas positivas.



Legenda. Pistas: 1 – PM 100 pb, 2 – CRM, 3 - Controle da capela, 4 - C(+) Triatomíneo (não infectado), 5 - Açai com frutas, 6 - Açai com frutas, 7 - Açai com frutas, 8 - Açai com guaraná, 9 - Açai com frutas, 10 - Açai com frutas, 11 – Açai, 12 - Açai.



Legenda. Pistas: 1 –PM 100 pb, 2 – Açai, 3 – Fruto, 4 – Fruto, 5 - Amostra de açai negativa, 6 - Amostra de açai negativa, 7 - *T. cruzi*, 8 - *T. rangeli*, 9 – Polpa, 10 – Fruto, 11 - *T. cruzi* ( $10^4$  epimastigotas/mL) + Intestino, 12 - *T. cruzi* ( $10^6$  epimastigotas/ mL), 13 - *T. cruzi* ( $10^4$  epimastigotas/ mL), 14 – Controle positivo (Triatomíneo não infectado); 15 - *T.rangeli* ( $10^4$  epimastigotas/ mL), 16 - *T. cruzi* ( $10^4$  epimastigotas/mL).

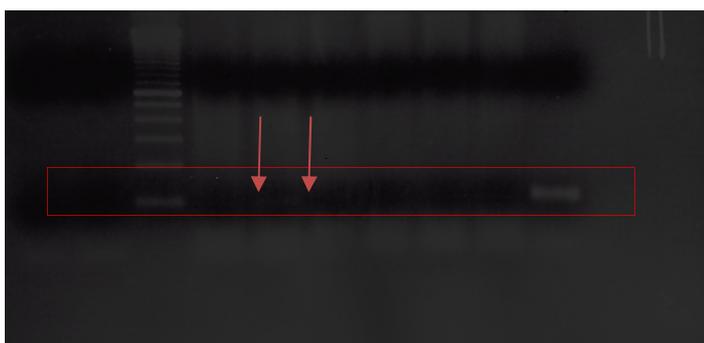
4.9.2 Laboratório de Tecnologia e Análise Instrumental de Alimentos (Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia / Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Seis amostras de polpa de açaí contaminadas naturalmente com *T. cruzi* foram submetidas a tratamento com doses de irradiação de 1 kGy e 3 kGy da seguinte forma: das 3 amostras de polpa de açaí congelada, uma não foi submetida à irradiação e as outras duas foram submetidas à irradiação de 1 kGy e 3 kGy. As outras 3 amostras foram liofilizadas e posteriormente foram submetidas à irradiação da mesma forma como foram as polpas congeladas.

Após extração de DNA de acordo com JRC (2005) e realização de PCR de acordo com Chiurillo e colaboradores (2005) as amostras apresentaram amplificação compatível com *T. cruzi* na polpa de açaí congelada não irradiada e na polpa congelada irradiada a 1 kGy. A polpa irradiada a 3 kGy e todas as amostras liofilizadas não apresentaram amplificação (Figura 36).

Figura 36 - Gel de agarose mostrando a amplificação de DNA extraído de amostras consideradas positivas.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Legenda. Pistas: 1 – CRM, 2 – Salmonella, 3 – PM 100 pb Fruto, 4 – polpa não irradiada, 5 – polpa irradiada a 1 kGy, 6 - polpa irradiada a 3 kGy, 7 – polpa liofilizada não irradiada, 8 - polpa liofilizada irradiada a 1 kGy, 9 – polpa liofilizada irradiada a 3 kGy, 10 – *T. cruzi*.

## 5. DISCUSSÃO

A reemergência da doença de Chagas a partir de 2005, trouxe um novo desafio a ser enfrentado, principalmente, pelas autoridades brasileiras. Uma doença que era característica de zona rural, em especial às populações mais carentes e sem acesso a condições sanitárias adequadas, está sendo transmitida pela via oral e disseminada em áreas urbanas. Além de ser mais agressiva do que a adquirida por outras vias, com letalidade podendo chegar a 5% em casos registrados na região amazônica (VALENTE, 2011), é também de difícil controle.

Outro aspecto importante é a marginalização pela sociedade com relação ao doente crônico, pois este fica impossibilitado de trabalhar, fato que, além de sobrecarregar os órgãos de previdência social com aposentadorias precoces, desperta no doente chagásico a sensação de fragilidade, comprometendo a sua auto-estima, a sua saúde psicológica e, por conseguinte, a sua qualidade de vida. Além disso, os custos do tratamento de um doente chagásico crônico para o sistema público de saúde são enormes, em decorrência da morbididade, da hospitalização e do tratamento dos sintomas (MONCAYO e SILVEIRA, 2009).

No Brasil, dentro e fora da região amazônica, muitos casos de DCA têm sido registrados em forma de surto caracterizando-se por um grupo de pessoas reunidas em um mesmo lugar que, ao ingerirem um mesmo tipo de alimento, adoecem quase que simultaneamente com quadro febril e manifestações gerais de uma infecção sistêmica (FERREIRA et al., 2014). Apesar do crescente número de casos agudos, os relatos dessa fase da doença são escassos na literatura.

O açaí foi o alimento associado ao maior número de casos de DCA ocorridos na região Norte nos últimos anos seja pela contaminação dos frutos ou da própria polpa por meio de dejetos de animais reservatórios ou de insetos vetores infectados das áreas endêmicas (PASSOS et al., 2010; PEREIRA et al., 2009).

No entanto, problemas que norteiam a qualidade sanitária dos alimentos produzidos a partir desse fruto têm preocupado a população e levado aos

sistemas públicos de saúde uma nova demanda para o enfrentamento da doença de Chagas através do consumo de açaí.

Em casos de surtos de DCA, a elucidação da transmissão oral é determinada por investigações clínicas e epidemiológicas.

A disponibilização de métodos para detecção de *T. cruzi* em alimentos será uma ferramenta poderosa na investigação epidemiológica da doença de Chagas, transformando evidências epidemiológicas em dados comprobatórios de que alimentos estejam efetivamente contaminados por *T. cruzi*.

Este trabalho é apenas uma contribuição para um estudo tão abrangente e desafiador que é a transmissão oral veiculada pelo consumo de açaí. Nesse ponto, serão discutidos os resultados encontrados para a melhor compreensão dessa ferramenta molecular tão importante que ajudará nas elucidações dos casos envolvidos tanto nas microepidemias quanto no controle da qualidade de produtos processados a partir do açaí.

As cepas de diferentes espécies utilizadas neste estudo (Quadros 4 e 5) tiveram como objetivo a padronização dos métodos em desenvolvimento e sua utilização como controles dos métodos uma vez estabelecidos.

As extrações de DNA de todas as cepas foram bem sucedidas de acordo com cada protocolo específico, resultando em quantidades de DNA satisfatórias e de boa qualidade (Tabela 1).

A extração de DNA é a primeira etapa na maioria dos estudos que envolvem Biologia Molecular, por isso é importante a obtenção de DNA quantificável e livre de substâncias inibidoras para o uso na PCR.

Até o momento, não existem estudos avaliando métodos para extração de DNA de *Trypanosoma cruzi* diretamente do açaí para que uma comparação pudesse ser realizada.

Dentre os quatro métodos de extração de DNA utilizados, apenas o “Nucleo Spin” não foi adequado para este estudo, embora tenha sido desenvolvido para diversos tipos de alimentos como produtos a base de chocolate e concentrado de frutas.

Algumas modificações no método foram realizadas, mas mesmo reduzindo à terça parte do líofilo obtido a partir de 2 mL de açaí, o método “Nucleo Spin” não foi capaz de extrair DNA quantificável para obter leitura no

espectrofotômetro. Os flavonóides, pigmentos encontrados em grandes concentrações no açaí, podem ter influenciado na eficiência do método.

Analisando os valores de concentração e pureza, todos os outros três métodos extraíram quantidades suficientes de DNA necessárias para o uso em PCR. Apesar das extrações obtidas pelo método DNAzol apresentarem valores quatro vezes maiores (cerca de 320 ng/ $\mu$ L) do que os outros dois métodos que utilizam CTAB (cerca de 75 ng/ $\mu$ L), o eluato contendo DNA apresentou coloração amarronzada, mostrando sua ineficiência em eliminar os pigmentos presentes no açaí, podendo superestimar o valor encontrado da concentração de DNA e explicar a inibição da PCR (Tabela 2).

A razão A260/A280 é usada para estimar a pureza do ácido nucleico em relação à presença de proteína. Para um DNA puro esta razão deve estar entre 1,8 e 2,0. Já a razão A260/A230 reflete a contaminação por substâncias como carboidratos, peptídeos, fenóis e compostos aromáticos. No caso de amostras puras esta razão deve estar acima de 2,2 (JRC, 2007).

Com relação às razões A260/A280 obtidas, o método que conseguiu extrair com maior grau de pureza foi o que utiliza CTAB juntamente com RNase, proteinase e lavagem com álcool a 70% (JRC, 2005). As extrações com DNAzol mostraram-se uma grande contaminação com proteínas, apresentando valores muito abaixo de 1,8 (Tabela 2).

Na relação A260/A230, o método que mais se aproximou do valor esperado foi o CTAB (JRC 2005). O DNAzol apresentou valores bem abaixo do esperado mostrando um alto grau de contaminação por substâncias químicas.

Com base nos dados gerados por esse estudo, observa-se que o método CTAB segundo JRC, 2005 apresentou melhores resultados, podendo ser explicado pela presença de etapas onde se faz uso das enzimas RNase, PTnase K e da lavagem com álcool a 70%. Apresentou-se como um método altamente eficiente, capaz de extrair 2,5 cels do parasito/mL de açaí, eliminando os interferentes intrínsecos à matriz de alimento e obtendo um DNA de excelente qualidade e quantidade suficiente para ser amplificado por PCR. Pela possibilidade de constituir um protocolo "*in house*" seu custo é bem mais baixo do que os *kits* comerciais disponíveis, porém alguns fatores devem ser observados para que a utilização de protocolos contendo CTAB possam ser bem sucedidos, tais como os apresentados a seguir, descritos por Somma (2006):

Na etapa de lise, as moléculas lipídicas da membrana celular estão dispostas em dupla camada em que as moléculas de proteína estão "dissolvidas" (Figura 37-A). No método CTAB, a lise da membrana é realizada pelo detergente CTAB contido no tampão de extração. Devido à composição semelhante da camada lipídica celular e do detergente, o CTAB tem a função de captar os lipídios que constituem a membrana celular e nuclear. O mecanismo de solubilização dos lipídeos utilizando o detergente CTAB é mostrado na Figura 37-B.

Quando a membrana da célula é exposta à extração com o tampão CTAB, o detergente capta os lipídios e as proteínas que permitem a liberação do DNA genômico (Figura 37-C). Em uma concentração específica de NaCl, o detergente forma um complexo insolúvel com os ácidos nucleicos. O EDTA é um componente quelante que liga-se ao magnésio, entre outros metais. O magnésio é um co-fator para DNase. Através da ligação do Mg ao EDTA, a atividade de DNase presente é diminuída. A solução Tris / HCl tem a finalidade de tamponamento do pH (pH alto ou baixo causa danos ao DNA).

É importante notar que, uma vez que os ácidos nucleicos podem facilmente sofrer degradação, o tempo entre a homogeneização da amostra e a adição da solução do tampão CTAB deve ser minimizado.

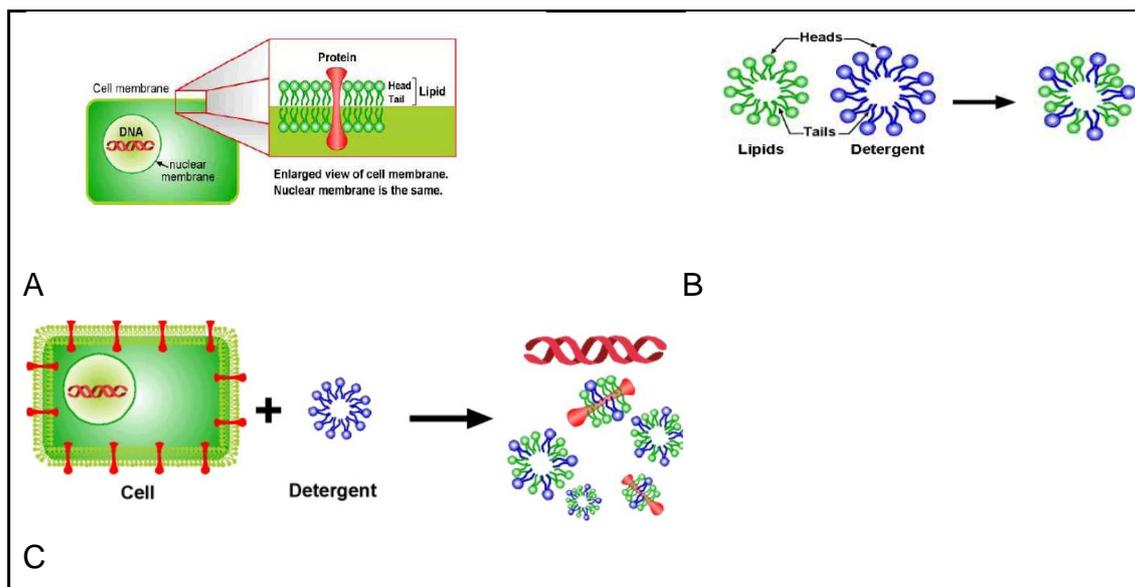
Na etapa de extração, compostos fenólicos, polissacarídeos, proteínas e lisados de compostos celulares dissolvidos na fase aquosa são separados do complexo de ácidos nucleicos com o CTAB.

O clorofórmio desnatura as proteínas e facilita a separação das fases aquosa e orgânica. É importante observar que a fase aquosa, dessa etapa, não pode conter uma concentração de NaCl superior a 0,5 M, caso contrário a solução aquosa ficará muito densa não permitindo a separação das fases. O pH da fase aquosa é outro fator muito importante e deve estar adequadamente equilibrado entre 7,8 e 8,0, caso contrário o ácido tenderá a partir para a fase orgânica.

E finalmente, na etapa de precipitação onde o ácido nucleico é liberado do detergente. Para este propósito, a solução aquosa é tratada primeiro com uma solução de precipitação contendo uma mistura de CTAB e NaCl a uma concentração elevada (> 0,8 M de NaCl). O sal é necessário para a formação de precipitação do ácido nucleico. Sob estas condições, o detergente, que é mais

solúvel em isopropanol do que em água, pode ser eliminado, enquanto o ácido nucleico precipita. O tratamento sucessivo do ácido nucleico com 70% de etanol permite uma purificação adicional com o objetivo de retirar o NaCl remanescente.

Figura 37: Exposição da célula à solução contendo o detergente CTAB.



Legenda: A- Composição da membrana celular, em destaque a dupla camada lipídica contendo proteínas; B- Solubilização dos lipídios; C- Destruição da membrana celular e extração do DNA genômico. Fonte: (SOMMA, 2006).

Métodos que utilizam o CTAB como detergente de lise são amplamente empregados em alimentos crus ou processados para a análise de alimentos transgênicos e muito comum em plantas, principalmente quando estão associados a outras substâncias como  $\beta$ -mercaptoetanol (MINAS et al., 2011; DEVI et al., 2013; MONDAL et al., 2014).

Os dados apresentados na etapa de validação (tabela 3) confirmaram que o método de extração (JRC, 2005) aplicado ao açaí produziu DNA em quantidade (média de 70,6 ng/ $\mu$ L) e qualidade adequadas para a detecção baseada na PCR e alta reprodutibilidade demonstrados pelos valores de desvio padrão (9,8 ng/ $\mu$ L) e coeficiente de variação (13,9%). Comumente, o limite aceitável do coeficiente de variação é de 20% entre réplicas de extração de DNA de alimentos (JRC, 2007).

Uma vez estabelecida uma metodologia de extração de DNA capaz de detectar o *T. cruzi* em uma matriz tão complexa como o açaí, outros estudos

poderão ser realizados com vistas ao esclarecimento de problemas que norteiam a doença de Chagas por transmissão oral.

A padronização da PCR convencional com o par de iniciadores descrita por Chiurillo e colaboradores (2003), resultou em um método específico e sensível, conseguindo distinguir *T. rangeli* do *T. cruzi* e amplificar este até 3pg de DNA numa matriz de açaí.

A elevada especificidade é explicada pela alta variabilidade inter-espécie exibida por sequências subteloméricas dos tripanosomatídeos, região alvo dos iniciadores selecionados. Gottdenker e colaboradores (2012) utilizaram os mesmos iniciadores, com sucesso, para uma avaliação correlacionando mudança antropogênica com o aumento da infecção por *T. cruzi* em triatomíneos.

O *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosoma rangeli* são duas espécies de protozoários de ocorrência simpátrica entre as Américas do Sul e Central e que compartilham os mesmos hospedeiros invertebrados, hospedeiros mamíferos silvestres e domésticos, incluindo seres humanos (NASCIMENTO, 2015).

Considerando que a contaminação dos frutos de açaí acontece pelo depósito das fezes ou pela maceração do próprio triatomíneo no momento do processamento do fruto, a distinção entre *T. rangeli* e *T. cruzi* pelo método utilizado fez-se necessária eliminando a possibilidade de resultados falso-positivos.

A especificidade experimental dos iniciadores para detecção de *T. cruzi* frente ao DNA genômico de *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *T. rangeli* e *T. cruzi*, mostrou baixa especificidade para aos iniciadores descritos por Piron e colaboradores (2007), Souto e colaboradores (1996) e Virreira e colaboradores (2003). Por conseguinte, foram descartados para esse estudo.

Ao testar os iniciadores TCZ1 e TCZ2 (PIRON et al., 2007) com DNA extraído de sangue de pacientes, Gilber (2007) também encontrou resultados com baixa especificidade.

No ensaio de seletividade, o método de PCR padronizado foi capaz de detectar cepas verdadeiramente positivas como positivas e cepas verdadeiramente negativas como negativas (Figuras 22 e 23).

As cepas pertencentes ao gênero de *Leishmania* e *Trypanosoma* (diferentes da espécie *T. cruzi*) foram utilizadas por serem cepas não-alvo, que

podem ter uma reação cruzada, mas não podem ser detectadas pelo método estudado. As diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* foram utilizadas por serem cepas-alvo, apresentarem diferentes genótipos e serem isoladas de hospedeiros relacionados ao ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, como barbeiros (*Triatoma tibimaculata*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius pictipes*) e gambás (*Didelphis marsupialis* e *Didelphis aurita*) capturados em regiões de significância geográfica (Santa Catarina, Pará, Rio Grande do Sul e Argentina) para a doença de Chagas.

As cepas de bactérias e fungos foram utilizadas uma vez que esses organismos são indicadores de qualidade sanitária e estarem naturalmente presentes na superfície dos frutos do açaí (TOURNAS e KATSOUZAS, 2005; CONCHA-MEYER, 2015), respectivamente, mas que não podem ser detectados pelo método.

No estudo matriz foram testadas preparações que são estabelecidas pela Instrução Normativa n.1, de 7 de Janeiro de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (polpa de açaí, açaí médio e açaí fino) e ainda outras não contempladas por esse documento, mas disponíveis para venda em estabelecimentos alimentícios. Foram elas: polpa de açaí, açaí fino, polpa de açaí com xarope de guaraná e morangos em pedaços e néctar misto de açaí e banana.

O resultado do ensaio foi satisfatório uma vez que todos os alimentos testados, contaminados artificialmente, apresentaram resultados positivos para *T. cruzi* na detecção por PCR (Figura 24), comprovando que as diferentes preparações contendo açaí não interferem no desempenho do método estudado.

Apesar da polpa de açaí e o açaí serem produtos classificados de acordo com o conteúdo de sólidos totais e serem obtidos após o amolecimento e despulpamento do fruto, com e sem adição de água e filtração, respectivamente, (BRASIL, 2000), muitos fabricantes e produtores artesanais não conseguem produzir tais alimentos dentro dos padrões estabelecidos.

Fregonesi e colaboradores (2010) analisaram 30 amostras congeladas de açaí (polpa, açaí médio e açaí fino) coletadas em supermercados e lanchonetes de Ribeirão Preto (SP) e verificaram que 63% estavam em desacordo com a legislação em vigor quanto ao teor de sólidos totais e umidade, sugerindo que a quantidade de água utilizada para extração pode ter ocasionado a oscilação no teor de sólidos totais. Verificaram ainda que 50% das amostras estavam em

desacordo coma Portaria nº 326/1997 (BRASIL, 1997) por apresentarem matérias estranhas, como fragmentos de insetos, ácaros, cristais de areia e pelo humano, demonstrando a existência de falhas na produção dos frutos, processamento, manipulação e comercialização das polpas, ou seja, na adoção e/ou manutenção das Boas Práticas de Fabricação. Além de uma amostra ter sido considerada imprópria para o consumo por apresentar pelo de roedor, matéria estranha prejudicial à saúde humana, de acordo com a Resolução RDC nº 175/2003 (BRASIL, 2003).

Freitas e colaboradores (2015) encontraram resultados semelhantes em amostras de açaí comercializadas em Governador Valadares (MG), duas das três marcas analisadas apresentaram fragmentos de insetos em desacordo com a Portaria nº 326/1997 (BRASIL, 1997) e com a Normativa Nº1, de 07 de Janeiro de 2000 (BRASIL, 2000).

Fragmentos de insetos, comumente, não são identificados em virtude do diminuto tamanho, porém essa constatação corrobora ainda mais com a possibilidade do açaí estar contaminado com insetos como barbeiros que podem estar por sua vez eventualmente contaminados com o protozoário *Trypanosoma cruzi*, tornando o produto um veículo da transmissão oral da doença de Chagas Aguda (FREGONESI et al., 2010).

Apesar de não ter sido o objetivo desse trabalho, uma avaliação dos rótulos dos produtos coletados em supermercados e estabelecimentos afins foi realizada para verificar a conformidade da classificação declarada pelo fabricante. Dentre as 46 amostras analisadas, 6 (13%) não estavam em conformidade com a RDC nº259/ 2002 no que se refere à denominação de venda, uma vez que foram declarados como “polpa de açaí médio”, sendo corretos os termos “açaí médio” ou “açaí regular tipo B” (BRASIL, 2002).

Fregonesi e colaboradores (2010) também avaliaram a conformidade da classificação declarada pelo fabricante de produtos de açaí e encontraram 33% das amostras em desacordo com a RDC nº259/ 2002 no que se refere à denominação de venda, uma vez que foram declarados como “polpa de açaí médio”, sendo corretos os termos “açaí médio” ou “açaí regular tipo B” (BRASIL, 2002).

Pelo exposto acima, a falta de uniformidade das polpas de açaí e de açaí disponíveis no mercado é uma realidade que, aliada à baixa qualidade sanitária,

pode acarretar na desvalorização do produto. Tendo em vista a grande variedade de novos produtos a base de açaí surgindo no mercado (exemplos como: brigadeiro vegano, polpa desidratada, *cookies*, barra de cereais, sorvetes, sucos, refrigerante, bombom) a ferramenta de análise torna-se um fator desafiador para desenvolvimentos de métodos de análises para detecção do parasito em matrizes alimentares tão complexas.

Através do método de detecção de *T. cruzi* desenvolvido neste trabalho foi possível, pela primeira vez, avaliar amostras de alimentos à base de açaí produzidas em várias regiões do Brasil e comercializadas nos estados do Rio de Janeiro e Pará quanto à qualidade sanitária pela presença de DNA de *T. cruzi*.

Foram coletadas 140 amostras no período entre 2010 e 2015, em 2 etapas distintas.

Na primeira etapa, em 2010, foram coletadas 47 amostras, pela equipe do laboratório, das quais 17 em supermercados e estabelecimentos da cidade do Rio de Janeiro (açaí e açaí com guaraná e frutas) e as 30 amostras restantes em feiras e estabelecimentos da cidade de Belém do Pará (açaí, polpa, sobremesa, gelado comestível, mingau, sementes e frutos).

Das 17 amostras coletas no Rio de Janeiro, 8 (47%) apresentaram resultado positivo para presença de *T. cruzi* envolvendo 11 marcas diferentes. Foram elas: açaí (2), açaí com guaraná (1), açaí com guaraná e morango (2), açaí com guaraná e banana (2) e açaí com guaraná, morango e acerola (1), pertencentes a 3 marcas diferentes (tabela 4).

Das 30 amostras coletadas no Pará, 3 (10%) apresentaram resultado positivo para presença de *T. cruzi*. Foram elas: açaí (1) e fruto do açaí (2), todas coletadas na Feira do Açaí (PA).

Além da diferença percentual de positividade ter sido considerável entre os resultados obtidos nas duas cidades, o tipo de alimento envolvido na cidade do Rio de Janeiro também foi bastante intrigante.

No Rio de Janeiro é muito comum o consumo de polpa de açaí misturada ao xarope de guaraná natural, alterando o sabor tão peculiar desse fruto, já que o açaí na sua forma original não faz parte da gastronomia da cultura local.

Curiosamente, as amostras coletadas em supermercados no Rio de Janeiro que apresentaram resultados positivos para presença de *T. cruzi*, possuem em sua maioria xarope de guaraná e frutas como morango, banana e

acerola em sua composição. Essas amostras são originárias de indústrias de alimentos e por isso deveriam conter um rigor no que diz respeito à aplicação dos procedimentos de boas práticas de fabricação e seleção da matéria-prima, assumindo a responsabilidade em preparar alimentos que não sejam prejudiciais à saúde do consumidor. Por outro lado, as agências reguladoras deveriam monitorar as indústrias assegurando a produção de alimentos seguros à população.

Se considerarmos que a temperatura de refrigeração e congelamento não destroem o *T. cruzi* presente em produtos contendo açaí (BARBOSA- LABELLO, 2010) e que os xaropes de guaraná, ricos em açúcares, podem estar contribuindo para manutenção dos parasitos atuando como um criopreservador de proteção extra-celular, esses alimentos podem potencializar o risco de transmissão de doença de Chagas pela via oral.

Díaz-Albiter e colaboradores (2016), descreveram o primeiro relato de fitofagia e alimentação por açúcar de triatomíneos do gênero *Rhodnius* sugerindo que as plantas podem ter um papel nutritivo para manutenção dos triatomíneos, com aumento da expectativa de vida e não mais somente como abrigos. Verificaram ainda que, todos os cinco ínstares de desenvolvimento dos triatomíneos do gênero *Rhodnius*, considerado por mais de um século estritamente hematófago, conseguem alimentar-se de solução de sacarose a 10% e que podem adquirir nutrientes por perfuração de tecidos vegetais como o tomate. Portanto, a aquisição de nutrientes em flores ou frutas pode ser uma explicação adicional para a associação de triatomíneos com plantas tropicais.

Sabe-se que, quando o triatomíneo passa por longos períodos de jejum há uma redução da população de *T. cruzi* no reto e um aumento no percentual das formas tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes (KOLLIEN e SCHAUB, 1998; 2000).

Passos e colaboradores (2010) verificaram na análise da parasitemia dos camundongos inoculados com *T. cruzi* após contato com açaí que, um período de tempo maior de contato do parasito com a polpa de açaí exacerba a sua virulência e leva à uma precocidade no início da parasitemia e tempo de morte dos animais.

Os triatomíneos são numerosos, diversificados e colonizam ecótopos temperados, subtropicais e tropicais nas Américas. Espécies do gênero

*Rhodnius* spp. e *Panstrongylus megistus* estão altamente associadas às palmeiras e bromélias (SARQUIS et al., 2010; GAUNT e MILES, 2000). Curiosamente, muitas frutas tropicais, como as de palmeiras, apresentam pericarpo mole, como o açaí que é um alimento que está associado à transmissão da doença de Chagas no Brasil (DÍAZ-ALBITER et al, 2016).

Xavier e colaboradores (2014) demonstraram que os casos de DCA relacionados com a área urbana de Belém são derivados de triatomíneos silvestres infectados e transportados acidentalmente em embarcações das ilhas que fornecem a maioria do açaí vendido na região metropolitana.

Para corroborar com esses achados, demonstramos no presente trabalho que uma amostra de açaí coletada na Feira do Açaí (PA) apresentou ampliações por Multiplex PCR compatíveis com *T. cruzi* e triatomíneo, comprovando a contaminação por triatomíneos (Figura 35).

Esses achados abrem novos questionamentos e apontam para a necessidade de investigação: na fitofagia por triatomíneos pela disponibilidade de açaí; o efeito do açaí no desenvolvimento, reprodução e sobrevivência dos triatomíneos; e do comportamento da população de *T. cruzi* no triatomíneo quando este tem sua dieta baseada na fitofagia, principalmente com açaí.

Na segunda etapa, foram coletadas 93 amostras nos estados do Rio de Janeiro e Pará. Dessas, 48 amostras pela Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro (SES/RJ) (açaí, polpa, açaí c/ guaraná e/ou frutas) abrangendo 5 diferentes marcas, 44 amostras (açaí e fruto de açaí) pela Prefeitura Municipal de Belém (LACEN/PA) e 1 amostra coletada pela professora Dr<sup>a</sup> Lúcia Jaeger (Universidade Federal do Rio de Janeiro).

Nenhuma das amostras coletadas no Estado do Rio de Janeiro, no período de 2011 a 2012, apresentou resultado positivo (tabela 5).

Este fato pode ser explicado pelas amostras serem diferentes coletados em 2010. Apesar de similares, não foram produzidos pelos mesmos fabricantes, com exceção de duas amostras que foram produzidos pelo mesmo fabricante das coletas do ano de 2010 (açaí médio e açaí com morango e acerola). Deve-se levar em consideração que existem duas safras de açaí por ano e que a produção agrícola tem origem em estados diferentes também.

Se for considerada a hipótese da fitofagia em açaí por triatomíneos pela escassez de repasto sanguíneo, uma avaliação ecoepidemiológica deverá ser

realizada para verificar se a contaminação dos frutos de açaí não acontece na própria palmeira.

As amostras coletadas no Pará a partir do ano de 2012 fizeram parte de um programa de monitoramento do Pará que teve início em 2011 chamado de “Programa Estadual de Qualidade do Açaí” pelo Departamento de Vigilância do Estado do Pará / SESPA. Esse programa teve como objetivo estabelecer procedimentos higiênico-sanitários para manipulação e comercialização do açaí, assegurando sua qualidade em toda cadeia produtiva. Para isso, houve o cadastramento dos batedores de açaí e a partir de então uma capacitação foi realizada mostrando a importância das etapas de lavagem no pré-preparo da polpa e do branqueamento pós preparo, entre outros. A distribuição de kits contendo uniforme, peneira, dosadores, termômetro, cronômetro, entre outros, também foi realizada para complementar a capacitação e facilitar na continuidade do processo.

Após esse trabalho de conscientização, quinze estabelecimentos foram avaliados através da análise de 30 amostras. De cada estabelecimento foi coletado uma amostra de fruto de açaí e uma amostra de polpa de açaí.

Os resultados das análises mostraram que dentre as trinta amostras, apenas uma amostra de fruto e uma amostra de polpa tiveram resultados positivos para presença de *T. cruzi* por PCR, demonstrando que ainda havia falhas no processo das boas práticas de fabricação.

Em 2015, ainda analisando amostras que fizeram parte do Programa de Monitoramento da Qualidade do Açaí, o resultado das análises das 10 amostras coletadas de igual forma nos estabelecimentos que participaram da capacitação já foi diferente, com nenhuma amostra positiva para presença de *T. cruzi*, demonstrando a evolução desse importante trabalho de conscientização.

Baseado na técnica de genotipagem desenvolvida por Burgos e colaboradores (2007) e Ramirez e colaboradores (2010), foi possível caracterizar genotipicamente o DNA que apresentou resultado positivo para *T. cruzi* no ensaio de PCR.

O sistema para caracterização molecular utilizada neste estudo foi a genotipagem multilocus intra-específica de *T. cruzi* recomendado por um consenso internacional (ZINGALES et al., 2009) para a identificação de genótipos diretamente de amostras sanguíneas de pacientes crônicos.

A genotipagem de *T. cruzi* permite que correlações com propriedades biológicas do parasito, clínicas e ecoepidemiológicas da doença de Chagas sejam realizadas (ZINGALES, 2012).

Esse trabalho mostra pela primeira vez, o perfil genético de *T. cruzi* isolado a partir do DNA extraído de amostras de açaí comercializadas no Rio de Janeiro e Pará.

A partir da metodologia aplicada, este estudo apontou que produtos alimentícios contendo açaí apresentaram contaminação mista, mas com prevalência para as DTU TcI, TcIII e TcV (Tabela 7).

Das amostras genotipadas, cinco amostras (38,5%) apresentaram genótipo TcIII, outras cinco (38,5%) apresentaram genótipo TcV, quatro amostras (31%) apresentaram genótipo TcI, duas amostras (15,4%) apresentaram genótipo TcIV e uma amostra (7,7%) apresentou genótipo TcVI. Não foram genotipadas as amostras de “açaí com guaraná”, “açaí com guaraná e banana”, “açaí com guaraná, morango e acerola” e polpa de açaí. Quatro amostras não tiveram resultados conclusivos: duas amostras apresentaram TcII ou TcVI e outras duas apresentaram TcIII ou TcIV (Tabela 7).

O resultado de contaminação mista é claramente entendido, uma vez que os frutos de açaí podem naturalmente receber detritos de várias espécies de triatomíneos e em casos de manufatura do fruto em forma de polpas, as indústrias podem estar recebendo frutos de diversas partes geográficas de onde é cultivado o açaí.

O encontro das DTU TcI e TcIII nas amostras de açaí nesse estudo, corrobora com os dados encontrados na literatura.

O genótipo TcI parece ser predominante da região da Bacia Amazônica (BUSCAGLIA e DI NOIA, 2003) e está relacionado à infecção humana nessa região geográfica associada a casos agudos graves resultando em surtos de transmissão oral (COURA, 2006). As espécies de vetores silvestres onde geralmente é encontrado são *Rhodnius*, *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Eratyrus*. Apresenta como reservatórios animais arbóreos e semi-arbóreos como gambás, roedores, primatas, tamanduás e roedores terrestres. Os principais ecótopos são palmeiras, frestas de árvores, rochas e partes terrestres na Amazônia (ZINGALES, et al., 2012).

O genótipo TcIII apresenta nichos ecológicos terrestre e fossorial, cujos reservatórios selvagens são tatus dos gêneros *Dasypus*, *Chaetophactus* e *Euphractus*, além de gambás, primatas e quatis (ZINGALES, et al., 2012). Os triatomíneos da espécie *Panstrongylus geniculatus* são seus vetores silvestres e estão distribuídos na América do Sul. São raros em humanos, com alguns casos encontrados na Amazônia e sudeste brasileiro (MARCILLI et. al., 2009) e cães domésticos, com relatos de isolamento em cães no estado de Mato Grosso do Sul (UMEZAWA, et a., 2009). Os casos agudos estão localizados na Amazônia brasileira com apresentação clínica pouco conhecida.

Apesar da literatura não apresentar muitos dados sobre o genótipo TcV relacionados aos nichos ecológicos, vetores e hospedeiros selvagens (os mais comuns são tatus dos gêneros *Dasypus*, *Euphractus* e roedores do gênero *Octodon*), 38,5 % das amostras de açaí apresentaram o genótipo TcV. Este genótipo é encontrado no cone sul, extremo sul do Brasil e região do Gran Chaco. Os pacientes no cone sul apresentam a forma cardíaca e são portadores de mega síndrome decorrentes da doença de Chagas (ZINGALES, et al., 2012).

No surto de doença de Chagas pelo consumo de açaí ocorrido em Mazagão (Estado do Amapá) em 1996 envolvendo 26 pessoas, Valente e colaboradores (2009) mostraram que dos 68 triatomíneos pertencentes às espécies *Rhodnius pictipes* (66) e *Pangstrongylus geniculatus* (2) capturados no local do surto, 45 (43 *Rhodnius pictipes*, 2 *Pangstrongylus geniculatus*) estavam infectados com *T. cruzi*. Treze isolados (8 de humano e 5 de *Rhodnius pictipes*) foram genotipados pelo método do mini-exon e apresentaram como resultados Z3 e TCI, além de infecção mista de *T. cruzi* Z3 e *T. rangeli* de dois isolados em *Rhodnius pictipes*. Como o método utilizado não consegue distinguir TCIIa de TCIIc e classifica ambos como Z3, os autores presumem que os isolados são mais susceptíveis a TCIIa que já foram previamente associados com infecção humana. Portanto, pela atual classificação proposta por Zingales et al., 2009 os achados são equivalentes a DTU TcI e TcIV.

Steindel e colaboradores (2008) caracterizaram genotipicamente 13 cepas de *T. cruzi* isoladas de seres humanos, gambás (*Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*) e vetores (*Triatoma tibiamaculata*), provenientes do surto de DCA ocorrido em Santa Catarina em 2005 pela ingestão de caldo de cana. As cepas foram caracterizadas por eletroforese de isoenzimas (MLEE), região

intergênica do gene do Spliced Leader do gene da subunidade 24 $\alpha$  do RNA ribossomal. Os ensaios revelaram que todas as cepas isoladas a partir de seres humanos pertenciam ao grupo de TC II, as cepas isoladas de gambás pertenciam ao grupo TcI, mas cepas isoladas de triatomíneos mostraram contaminação mista de TcI e TcII, segundo classificação de Anônimo (1999).

Valente (2009) caracterizou pelo gene de mini-exon 151 isolados de *T. cruzi* (46 isolados do homem, 31 de outros mamíferos e 74 de triatomíneos) associados aos surtos de Bacarena, Belém, Cachoeira de Arari (PA) e Santana (AP). Todos os isolados exibiram perfil da linhagem TcI, que é a linhagem amplamente predominante na Amazônia Brasileira.

Um estudo realizado por Sangenis e colaboradores (2015), mostrou que dentre 1963 pacientes portadores de doença de Chagas e moradores do Rio de Janeiro, 69 (3,5%) nasceram no Rio de Janeiro. Destes, 15 (21,7%) foram considerados casos autóctones com 60% apresentando a manifestação cardíaca da doença. Esses indivíduos considerados autóctones eram moradores de municípios como São Fidélis, São Sebastião do Alto, Campo dos Goytacazes, Santa Maria Madalena, Conceição de Macabu, Bom Jesus de Itabapoana, Itaboraí e Resende. A transmissão da doença foi considerada vetorial (espécies de *T. vitticeps* envolvidas na invasão de casas daquela região), pois todos os 15 pacientes moraram em casas de pau a pique na primeira década de suas vidas e 7 deles já tinham visto triatomíneo em suas casas. Todos já tinham consumido carne de caça (tatu, gambá, preá e pacas), ingerido caldo de cana e duas pessoas relataram que consumiam açaí esporadicamente. O genótipo TcI foi identificado em reservatórios silvestres e vetores. Os genótipos TcI / TcVI (infecção mista) puderam ser identificados em um dos isolados de humano.

A metodologia de genotipagem foi executada com sucesso em DNA de origem alimentar, talvez, por se tratar, de uma metodologia desenvolvida para detecção em pacientes com baixa parasitemia, como é o caso daqueles que apresentam a forma cardíaca da doença de Chagas.

Os genótipos encontrados nas amostras de açaí são concordantes com os apresentados na literatura onde há correlação com triatomíneos e gambás envolvidos em surtos.

Apesar de existirem importantes estratégias sendo implementadas, o Brasil ainda se encontra num estágio embrionário e pontual no combate à doença de Chagas transmitida pelo consumo de açaí (FERREIRA et al, 2014).

Ainda há a necessidade de incentivos à pesquisa para que conhecimentos gerados relacionados à viabilidade do *T. cruzi* em diferentes alimentos e a técnicas de detecção e de inativação e formas de contaminação dos alimentos pelo *T. cruzi*, entre outros, auxiliem na compreensão da transmissão oral desse parasito e sua melhor interpretação epidemiológica de prevenção e controle (PANAFTOSA, 2006).

São necessárias ainda estratégias para garantir a inocuidade do açaí mantendo suas propriedades sensoriais e nutricionais. Assim, as Boas Práticas de Higiene, as Boas Práticas de Manufatura e a aproximação entre instituições de ciência e os produtores de açaí, são essenciais para contribuir na solução deste problema.

Programas de capacitação para os batedores artesanais, tecnologia para processamento da polpa de açaí e o controle da qualidade são investimentos que devem ser realizados para que esse produto tão importante para população atinja um adequado padrão de qualidade.

Segundo Trevisan (2004), o conhecimento melhora processos, aperfeiçoa serviços, cria negócios e, sobretudo a gestão eficiente. E isso só é obtido com educação e ciência. Daí a importância de unir a capacidade de gerar desenvolvimento do mundo acadêmico com o meio empresarial.

Sendo assim, existem muitos desafios para o Brasil no que se refere à estruturação de ações voltadas para atenção, vigilância, prevenção e controle, com vistas a respostas efetivas para toda a sociedade.

Desta forma, espera-se que os produtores de polpa alcancem um estágio de produção que garanta a qualidade, a minimização dos riscos de saúde, o valor nutricional e as propriedades sensoriais desse alimento tão desejado na cultura local.

## 6 CONCLUSÕES

- Dentre os quatro métodos de extração de DNA testados, o método que utiliza CTAB segundo JRC (2005) foi selecionado como o mais adequado para extração de DNA em matriz de açaí;
- A validação do método de extração (JRC, 2005) aplicado ao açaí mostrou que o método selecionado proporciona o isolamento de DNA em quantidade e qualidade adequadas para a detecção baseada na PCR e possui alta reprodutibilidade demonstrados pelos valores obtidos de desvio padrão e coeficiente de variação;
- A padronização da PCR convencional com o par de iniciadores descrito por Chiurillo e colaboradores (2003), resultou num método específico e sensível, capaz de distinguir *T. rangeli* do *T. cruzi* e amplificar este até 3pg de DNA numa matriz de açaí.
- No ensaio de seletividade, o método da PCR padronizado foi capaz de detectar cepas verdadeiramente positivas como positivas e cepas verdadeiramente negativas como negativas, demonstrando sua capacidade em detectar o alvo de interesse na presença de outros componentes presentes na matriz.
- O resultado do ensaio Matriz foi satisfatório uma vez que todos os alimentos testados, contaminados artificialmente, apresentaram resultados positivos para *T. cruzi* na detecção por PCR, comprovando que as diferentes preparações contendo açaí não interferem no desempenho do método desenvolvido.
- O método desenvolvido foi aplicado em produtos alimentícios que continham açaí adquiridos nos estados do Pará e Rio de Janeiro e mostrou que cerca de 9% das amostras continham DNA de *T. cruzi*, demonstrando falhas nas boas práticas de fabricação e de higiene.
- Amostras positivas ao ensaio de identificação por PCR convencional foram submetidas à caracterização molecular e apresentaram contaminação mista, mas com prevalência para as DTU TcI, TcIII e TcV, demonstrando concordância com os dados apresentados na literatura onde há correlação com triatomíneos e gambás envolvidos em surtos.

- Os ensaios preliminares na PCR em tempo Real com SYBR Green demonstraram compatibilidade com os resultados obtidos na PCR convencional, com resultado discordante em apenas uma amostra, mostrando que o método pode ser aperfeiçoado quanto ao aumento da sensibilidade.

## 7. PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho apontam para a necessidade de novos estudos para detecção de *T. cruzi* em açaí, tendo em vista o número de produtos alimentares disponíveis no mercado que utilizam o açaí como matéria-prima.

O desenvolvimento do método de detecção de *T. cruzi* por PCR permitirá propostas para ações de vigilância sanitária através do monitoramento das polpas de açaí que são consumidas no mercado brasileiro.

O método desenvolvido poderá ser testado e adaptado em outras matrizes alimentares envolvidas em surtos como caldo de cana, goiaba, carnes de animais silvestres mal cozidas e em leite materno.

O desenvolvimento de um sistema de detecção utilizando a PCR em Tempo Real com sondas permitirá o aumento da especificidade e da sensibilidade do método já desenvolvido.

A aplicação do método desenvolvido na ampliação do estudo da irradiação como método de conservação de polpas de açaí.

## REFERÊNCIAS

Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System. Getting Started Guide for Standard Curve Experiments. 2007. Disponível em: [https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generalddocuments/cms\\_050329.pdf](https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generalddocuments/cms_050329.pdf). Acesso em: 05 Julho 2014.

AGUILAR, M.; YÉPEZ, R. Evolución epidemiológica de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. **Proceedings of the International Workshop on Populations Genetics and Control of Triatominae**, Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, v.1, p. 30-38, 1995.

ALEXANDRE, D.; CUNHA, R. L.; HUBINGER, M. D. Conservação do açaí pela tecnologia dos obstáculos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p.114-119, jan-mar, 2004.

AMÚNARRIZ, M.; CHICO, M.E.; GUDERIAN, R.H. Chagas disease in Ecuador: a sylvatic focus in the Amazon region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.94, p.145 -149, 1991.

Anônimo. Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, (Supl.1), p. 429-432, 1999.

BALICK, M.J. Palms and development in the humid tropics. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1, 1984, Belém. **Anais**. Belém: Embrapa-CPATU, v, 6, p.121-140,1986 (Embrapa-CPATU. Documentos, 36).

BARBOSA-LABELLO, R. **Transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* pela polpa de açaí em camundongos**. 2010.Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP, Campinas, SP, 2010.

BARRETT, T.V., et al. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, n.1: p.84 – 90, 1980.

BARRIAS, E.S.; CARVALHO, T.M.U.; SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. **Frontiers in Immunology**, v.4, n. 186, 2013.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 540p. 1976.

BRASIL. ANVISA – RDC n. 218 de 29/07/2005. **Regulamento Técnico de Procedimento higiênico sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais**, 2005.

BRASIL. ANVISA - Resolução RDC nº 175, de 08 de julho de 2003. **Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 jul. 2003, Seção 1.

BRASIL. ANVISA Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos, 2008 – [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35\\_190608.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35_190608.htm). Informe Técnico no 35 de 19 de junho de 2008. Acesso em 11/11/2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº1, de 7 de janeiro de 2000**. Diário Oficial da União, 10 jan. 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução RDC nº 259, de 20 de set. 2002**. Aprova o regulamento técnico para rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, p.33 - 4, 23 set. 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE). Consenso brasileiro em doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, Supp III, p. 1 - 29 2005.

BRASIL. SVS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO BRASIL. **Doença de Chagas aguda por transmissão oral**. Nota Técnica. SVS 2007. Disponível <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtx=21310](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtx=21310)>. Acesso em: 26 set. 2010.

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 [da] República Brasil.

BRASIL. SVS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO BRASIL. **Doença de Chagas Aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina**. Nota Técnica, SVS, 2005, Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/290305.htm> Acesso em 30/04/2013

BRENER, Z. Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. **Scientific Publication**, p. 11 - 21, 1977.

BRISSE S.; DUJARDIN J.C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Mol Biochem Parasitol**, v. 11, p. 95 - 105, 2000a.

BRISSE, S.; CHRISTIAN, B.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal for Parasitology**, v.30, p. 35 – 44, 2000b.

BURGOS, J.M., et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p.1319 - 1327, 2007.

BURGOS, J.M., et al. Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. **Clinical Infectious Diseases**, v.51, n.5, p. 485 – 495, 2010.

BUSCAGLIA, C.A.; DI NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and Infection**, v.5, p.419 - 427, 2003.

CALVO-MÉNDEZ, M. L., et al. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection via contaminated water and food. **Revista Latino americana de Microbiología**, v.36, p.67 - 69, 1994.

CALZAVARA, B.B.G. **As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico**. Belém: FCAP. 103p. 1972. (Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 5).

CARCERES, C. D., et al. **Investigación de un brote de síndrome febril com miocardites aguda en Guamal, Magdalena.** Informe Quincenal Epidemiológico Nacional, Instituto Nacional de Salud, Santa Fé de Bogotá, Colômbia 1999;412: 180 - 186.

CARDARELLI-LEITE, P.; BRANQUINHO, M.R; FERREIRA, R.T.B. Detection of GMO in food products in Brasil: the INCQS experience. **Food Control**, v.16, p. 859 - 866, 2005.

CARLIER, Y., et al. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. **PLoS Neglected Tropical Diseases**; v.5, n.10, p.1250, 2011.

CARRANZA, J. C., et al. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.963 – 973, 2009.

CASTANHO, R.E.P., et al. Infecção experimental de camundongos através da ingestão de caldo de cana contaminado por *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.1, p.176, 2002.

CHAGAS, C. R. J. Nova tripanosomíase humana. **Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 1, p. 159 - 218, 1909.

CHIURILLO, M. A., et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* Infection by duplex PCR Assay Based on Telomeric Sequences. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n.5, p. 775 - 779, 2003.

CONCHA-MEYER, A., et al. Shelf Life Determination of Fresh Blueberries (*Vaccinium corymbosum*) Stored under Controlled Atmosphere and Ozone. **International Journal of Food Science**. 2015, Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/164143>. Acesso em 12 jan 2016.

CORBISIER, P., 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 3249-3257, 2007.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is need – A background article. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, v.102 (Supl. I), p.113 - 122, 2007.

\_\_\_\_\_. **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, 1966.**

\_\_\_\_\_. The Discovery of Chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 46, n.4, p. 389 - 390, 2013.

\_\_\_\_\_. Transmissão da infecção chagásica por via oral na história natural da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39 (suplemento III), p.113 - 117, 2006.

COURA, J.R.; MOREIRA, C.J.C.; JUNQUEIRA, A.C.V. **Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscópicos de Malária e Laboratoristas de rede pública**. Organização Pan-Americana da Saúde. Módulo 1:1-69.2012.Disponível em:<http://www1.paho.org/cdmedia/manualchagas2012/pdf/modulo1.pdf>. Acessado em: Agosto de 2013.

COURA, J. R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v.465, p. 56 - 57, 2010.

CRESPO, F.G., et al. Surto de doença de Chagas aguda em Mojuí dos Campos, Pará: manifestações clínicas e laboratoriais. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, XLIII, 2007, Campos do Jordão-SP, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2007. p.28.

DEANE, M. P.; LENZI, H. L.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: Vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, n.4, p. 513 - 515, 1984.

DEVI, K. D., et al. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales-suitable for diverse PCR based downstream applications. **Springer Plus**, v.2, n.1, p.669, 2013.

DIAS, J. C. P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.4, p.370 - 375, jul-ago, 2006.

DIAS, J.C.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.193 - 196, 2008.

DÍAZ-ALBITER, H.M., et al. Everybody loves sugar: first report of plant feeding in triatomines. **Parasites & Vectors**, v.9, n.114, 2016.

DORN, P., et al. Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.4, p.605 - 607, 2007.

EL-SAYED, N.M., et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v.309, p.409 – 415, 2005.

EMBRAPA. **Sistema de Produção do Açaí**, 2008. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai\\_2ed/paginas/apresentacao.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/apresentacao.htm)>. Acesso em: 01 Out. 2013.

FERREIRA, R.T.B.; BRANQUINHO, M.R.; CARDARELLI-LEITE, P. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a vigilância sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate**, v.2, n.4, p.4 - 11, 2014.

FOLHA DO JURUÁ. Os benefícios do açaí para saúde,2016. Disponível em: <<http://www.folhadojuru.com.br/2016/02/os-beneficios-do-acai-para-saude/>>. Acesso em: 16 mar. 2016.

FREGONESI, B. M., et al. Polpa de acai congelada: características nutricionais, físico-químicas, microscópicas e avaliação da rotulagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.3, p. 387 - 95, 2010.

FREITAS, B., et al. Características físico-químicas, bromatológicas, microbiológicas e microscópicas de polpa de açaí (*Euterpe oleraceae*) congeladas do tipo B. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.2, p.2 - 13, 2015.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Falando de Chagas: dia mundial da pessoa afetada pela doença de Chagas, Rio de Janeiro, 14 de abril de 2015. Disponível em: <<http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/falando-de-chagas-dia-mundial-da-pessoa-afetada-pela-doenca-sera-com-encontro-no-ioc>>. Acesso em: 01 de julho de 2015.

GABRIEL, L. P. **Caracterização de poliuretano a base de açaí formulado para construção de dispositivos biomédicos**.2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP, Campinas, SP, 2012.

GAŠPARIČ, M. B. et al. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2023 - 2029, 2010.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p.557 – 65, 2000.

GILBER, S.R. Reação em Cadeia da Polimerase em comparação com o teste de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (enzimaimunoensaio) no diagnóstico para a doença de Chagas. 2007. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2007.

GOTTDENKER, N. L., et al. Host life history strategy species diversity, and habitat influence *Trypanosoma cruzi* vector infection in changing landscapes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.11, 2012.

HENDERSON, A.; GALEANO, G. Euterpe, **Prestoea**, and **Neonicholsonia (Palmae: Euterpeinae)**.New York: New York Botanical Garden, 1996. 90p. (Flora Neotropica, 72).

HOMMA, A. K. O., et al. Açaí: Novos desafios e tendências. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**; v.1, n. 2, p.7 - 23, 2006.

HOTEZ, P.J., et al. Chagas Disease: “The New HIV/AIDS of the Americas”. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n.5, 2012.

HOWARD, E.J., et al. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. **An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.121, n. 1, p.22 - 33, 2013.

JACKSON, Y., et al. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p. 601 – 603, 2009.

JANSEN, A. M.; DEANE, M. P. ***Trypanosoma cruzi* infection of mice by ingestion of food contaminated with material of the anal gland of the opossum *Didelphis marsupialis***. In: *Anais da reunião sobre pesquisa básica em doenças de Chagas*, 1985, Caxambu. p. 39.

JOIN RESEARCH CENTRE (JRC). **Event-specific method for the quantification of maize line NK603 using real-time PCR protocol**. 2005. Disponível em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>. Acesso em fev. 2010.

JOINT RESEARCH CENTRE (JRC). **Report on the validation of a DNA extraction method from soybean seeds**. 11/september/2007. Disponível em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu>. Acesso em: fev. 2015.

KEENAN, M., et al. Design, structure-activity relationship and in vivo efficacy of piperazine analogues of fenarimol as inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry***, v.21, p.1756 - 1763, 2013.

KJOS, S.A., et al. Identification of bloodmeal sources and *Trypanosoma cruzi* infection in triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidea) from residential settings in Texas, the United States. ***Journal of Medical Entomology***, v.50, n.5, p.1126 - 1139, 2013.

KOLLIEN, A.H., SCHAUB, G.A. Development of *Trypanosoma cruzi* after starvation and feeding of the vector - A review. ***Tokai journal of experimental and clinical medicine***, v.23, p.335 – 40, 1998.

KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. ***Parasitology Today***, v.16, n.38, p1-7, 2000.

KROPF, S.P.; AZEVEDO, N.; FERREIRA, L.O. Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. ***Ciência e Saúde coletiva***, Brasil, v.5, p. 347 - 365, 2000.

LAZARTE, R.A., et al. Congenital transmission of Chagas disease-Virginia, 2010. ***Morbidity and Mortality Weekly Report***, v. 61, p.477 - 479, 2012.

MARCET, P.L. , et al. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. , v.132, n.1, p.57 - 65, 2006

MARCHIORI, J.N.C. **Elementos de dendrologia**. Santa Maria: UFSM, 1995. 163p.

MARCILI, A., et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius* spp.and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p.615 – 623, 2009.

MARTINS-MELO, F. R., et al. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**, v.19, n.8, p.943 - 57, 2014.

MARTINS, H.R., et al. *Trypanosoma cruzi*: Impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v.112, p.237 - 246, 2006.

MAZZA, S., et al. Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. **MEPRA** (Mis. Est. Pat. reg. Argentina, Public.), 28: 41 - 46, 1936.

MBONGOLO MBELLA, E.G., et al. SYBR Green qPCR methods for detection of endogenous reference genes in commodity crops: a step ahead in combinatory screening of genetically modified crops in food and feed products. **European Food Research and Technology**, v.232, p.485 – 496, 2011.

MINAS, K., et al. Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. **FEMS Microbiology Letter**, v.325, n.2, p.162 - 169, 2011.

MENEZES, E.M.S.; TORRES, A.T.; SABAA SRUR, A.U. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) liofilizada. **Acta Amazônica**, v.38, n.2, p.311 – 316, 2008.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 (Suppl 1), p.17 – 30, 2009.

MONDAL, T.K.; GANIE, S.A. Identification and characterization of salt responsive miRNA-SSR markers in rice (*Oryza sativa*). **Gene**, v.535, p.204 – 209, 2014.

MORAES, R.G.; **Parasitologia médica**. Atheneu, brasil, v. 11, p. 104 - 107, 1971.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v.155, p.335 – 350, 1987.

MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI. Serviço de Educação e Extensão Cultural. **Fauna e flora em lendas**. Belém, 2003. Disponível em: <<http://www.museu-goeldi.br/eva/exposicoes/lendas/cartilhalendas.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

MYLER, P.J. Molecular variation in trypanosomes. **ActaTropica**, v.53 (3-4), p.205 - 25, 1993.

NASCIMENTO, A. P. M. **Estudo da dinâmica da co-infecção por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado e no hospedeiro mamífero**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.

NCBI (National Center for Biotechnology Information), Maryland, EUA. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)>. Acesso em: 04 mai.2012.

NORMAN, F.F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas disease and breast-feeding. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.10, p. 1561 - 1566, 2013.

O'DONNELL, K.L. 1979. **Zygomycetes in culture**. University of Georgia, Georgia.

OLIVEIRA, I.A.S., SILVA, L.R., MÁRCIA FARIA, E., SILVA, M. F., FAGUNDES, A.C.G. **Investigação entomológica e sorológica de animais silvestres e domésticos em áreas de surto da doença de Chagas aguda, no Município de Axixá do Tocantins**, 2009, Tocantins - Brasil. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XLVII, 2011, Natal-RN. p 1082, Multimídia.

OLIVEIRA, M. do S. P. de; LEMOS, M.A.; SANTOS, E.O. dos; SANTOS, V.F. dos. **Varição fenotípica em acessos de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) para caracteres relacionados à produção dos frutos**. Belém: Embrapa-CPATU, 1998. 23p. (Embrapa-CPATU. Boletim de Pesquisa, 209).

PANAFTOSA. **Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 5, p. 512 - 514, 2006.

PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS. **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos**. – Rio de Janeiro, 2009.

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 do Pará]**. Belém, 13 set. 2010.

PASSOS, L.A.C.; GUARALDO, A.M.A; ALVES, D.P. Relatório final, convênio 667/ 2008 com Ministério da Saúde: **“Análise da interferência da polpa de açaí na transmissão oral de *Trypanosoma cruzi*, contribuindo para o surgimento de surtos de doença de Chagas Aguda (DCA) na região Norte do Brasil”**. Campinas, SP, 2010.

PEREIRA, K. S., et al. Chagas disease as a food borne illness. **Journal of Food Protection**, v. 72, n.2, p. 441 - 446, 2009.

PEREIRA, K. S., et al. Transmission of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) by Food. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.59, p.63 – 85, 2010.

PEREIRA, I.R., et al. A Human Type 5 Adenovirus-Based *Trypanosoma cruzi* Therapeutic Vaccine Re-programs Immune Response and Reverses Chronic Cardiomyopathy. **PLoS Pathogens**, v.11, n.1, 2015.

PINTO, A. Y. N., et al. Ocorrência de tripanossomíase aguda familiar no município de Igarapé-Miri, Pará: Gravidade de apresentação clínica em idosos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36 (I), p. 381, 2003.

PIRON, M., et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta tropica**, v. 103, p. 195-200, 2007.

PORTINHO, J.A.; ZIMMERMANN, L.M.; BRUCK, M.R. Efeitos Benéficos do Açaí. **International Journal of Nutrology**, v.5, n.1, 2012.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n.2, p. 92 - 100, 2001.

RABELO, A. Árvores frutíferas, 2013. Disponível em: <http://arvoresfrutiferas.blogspot.com.br>. Acesso em: 12 de março de 2014.

RAMÍREZ, J.D., et al. Chagas Cardiomyopathy Manifestations and *Trypanosoma cruzi* Genotypes Circulating in Chronic Chagasic Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.11, 2010.

RASSI, A. Jr; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, v.375, p. 1388 – 1402, 2010.

RODRIGUEZ, B., et al. Estudio de un brote de carditis chagásica aguda en una población adulta. **Acta Médica Colombiana**, v.; 17 (Sup.1), n. 280,1992.

SANCHEZ, T. A., **Caracterização e aplicação preliminares de um agente de contraste oral natural para imagens por ressonância magnética do trato gastrointestinal**. 2005. Dissertação (Mestrado em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Universidade de São Paulo, SP, 2005.

SANGENIS, L.H.C.et al. Autochthonous transmission of Chagas disease in Rio de Janeiro State, Brazil: a clinical and eco-epidemiological study. **BioMed Central Infectious Diseases**, v.15, n.4, 2015.

SANTOS, G. M., et al. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 58, p. 187 - 192, 2008.

SARQUIS, O., et al. Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. **Journal of Vector Ecology**, v.35, p.385 – 94, 2010.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102 (Suppl. I), p. 75 - 85, 2007.

SHAW, J.; LAINSON, R.; FRAIHA H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones da doença de Chagas registrados em Belém, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.3, p.153 - 157, .1969.

SHIKANAY-YASUDA, M. P. Surto epidêmico de doença de Chagas aguda em Catolé do Rocha, Paraíba. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.20(II), p. M14-M15, 1987.

SOMMA, M. Extraction and Purification of DNA. In: JOINT RESEARCH CENTER. **The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms**. Luxembourg: European Commission, 2006. Session 4. Disponível em: <<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20EN/User%20Manual%20EN%20full.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2016.

SOUTO, R.P., et al. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, p. 141 - 152, 1996.

SOUZA-LIMA, R.C., et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, n.4, p. 510 – 514, 2013.

STEINDEL, M., et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n.1, p. 25 - 32, 2008.

STORINO, R.; JÖRG, M.E. **Vias de infeccion y aspectos clinicos.** In: Storini R. Milei (eds.) *Enfermedad de Chagas.* Doyma, Argentina, 1994.

STRASEN, J., et al. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. ***Clinical Research in Cardiology***, v.103, n.1, p.1 – 10, 2013.

STRUDWICK, J.; SOBEL, G.L. Uses of *Euterpe oleracea* Mart. In the amazon estuary, Brazil. In: BALICK, M.J., ed. **The palm- tree of life: biology, utilization and conservation.** Advances in Economical Botany, New York, v.6, p. 225 - 253, 1986.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**, Unicamp, 2011  
TEIXEIRA, A.R., et al. Chagas disease. ***Postgraduate Medical Journal***, v.82, n.974, p.788 - 798, 2006.

TEIXEIRA, A.R.L., et al. Emerging Chagas Disease: Trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. ***The Emerging Infections Diseases***, v.7, n.1, p.100 - 112, 2001.

TOLEDO M.J., et al. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. ***Experimental Parasitology***, v. 100, p.161 - 172, 2002.

TOURNAS, V.H; KATSLOUDAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. ***International Journal of Food Microbiology***, v.105, p.11 – 17, 2005.

TREVISAN, A. M. A educação e a ciência como insumos do desenvolvimento. In: WHERTEI N.J.; CUNHA, C. da (Org). *Investimento em educação, ciência e tecnologia: o que pensa os empresários.* Brasília: UNESCO, 2004.

UMEZAWA, E.S., et al. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. ***Acta Tropica***, v. 111, n.1, p.15 - 20, 2009.

VALENTE, V.C. **Estudo genotípico de *Trypanosoma cruzi*: epidemiologia e caracterização molecular de isolados do homem, triatomíneos e mamíferos silvestres do Pará, Amapá e Maranhão.** 2011. 164 f. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Pará, 2011.

VALENTE, V.C., et al. Nova microepidemia familiar com três casos de doença de Chagas em Belém, estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38(I), p. 413, 2005.

VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; PINTO, A.Y.N. Por que ocorrem episódios familiares de doença de Chagas associado à transmissão oral na Amazônia brasileira? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 35(I), p. 165, 2002.

VALENTE, S.A.S., et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 103, p. 291 - 297, 2009.

VIRREIRA, M., et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.5, p. 574 - 582, 2003.

WEIGHARDT, F. Quantitative PCR for the detection of GMOs. In: The Analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. Italy: WHO, p.10.1-10.19, 2004.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas disease**. Technical report Series 905, Geneva, 2002.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Research Priorities for Chagas Disease, HAT and Leishmaniasis**. Technical report series N° 975, 110p, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases**. Secretariat Report. A66/20, 2013.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104(I), p. 101 - 107, 2008.

YOSHIDA, N.; TYLER, K.M.; LLEWELLYN, M.S. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. **Trends in parasitology**, v.27, n.10, p. 459 - 466, 2011.

XAVIER et al., Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.5, 2014.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas? **Revista da Biologia**, v. 6b, p.44 - 48, 2011.

ZINGALES, B., et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Second Satellite Meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 104, v.7, p.1051 - 1054, 2009.

ZINGALES, B., et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, n.2. p.240 – 253, 2012.

**APÊNDICE A** – Artigo “Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária”.

ARTIGO

DOI: 10.3395/VD.V2I4.358

## Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária

### Oral transmission of Chagas disease by consumption of *açaí*: a challenge for Health Surveillance

Renata Trotta Barroso Ferreira\*

Mária Regina Branquinho

Paola Cardarelli Leite

#### RESUMO

Até o ano de 2004, a ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) por transmissão oral, relacionada ao consumo de alimentos, constituía um evento pouco conhecido ou investigado. Atualmente tornou-se frequente na região amazônica e está relacionada à ocorrência de surtos recentes em diversos estados brasileiros.

Os casos recentes notificados no Brasil de DCA estão relacionados ao consumo do suco de açaí, considerado um alimento essencial na dieta da população da Região Norte e muito apreciado nos demais estados brasileiros e em outros países.

O objetivo deste trabalho foi destacar os novos desafios a serem enfrentados pelos órgãos de saúde pública na prevenção da transmissão da doença de Chagas pelo consumo de açaí.

Apesar de existirem importantes estratégias sendo implementadas pelo Brasil no combate à doença de Chagas transmitida via alimento, ainda há a necessidade de incentivos à pesquisa para que conhecimentos gerados auxiliem na compreensão da transmissão oral e sua melhor interpretação epidemiológica, de prevenção e controle. A implementação das Boas Práticas de Higiene, Boas Práticas de Manufatura e a aproximação entre instituições de ciência e os produtores de açaí também poderão contribuir na solução deste problema.

**PALAVRAS-CHAVE:** Doença de Chagas; *Trypanosoma Cruzi*; Açaí; Transmissão Oral; Vigilância Sanitária

#### ABSTRACT

The occurrence of acute Chagas disease (ACD) by oral transmission related to food consumption, until 2004, was a little known or investigated event. Currently becomes frequent in the Amazon region and is related to the occurrence of recent outbreaks in several states.

Recent cases in Brazil of ACD are related to the consumption of açaí juice, considered essential food in the diet of the population in the Northern Region. The açaí berry has been appreciated both for its nutritional value, as by its characteristic flavor, ceasing to be consumed in the producing regions, extending throughout the Brazilian territory and even exported to other countries.

The aim of this study was to highlight the new challenges faced by public health agencies in preventing the transmission of Chagas disease by consumption of açaí. Although there are important strategies being implemented by Brazil to combat Chagas disease transmitted via food, there is still a need for incentives to search for that knowledge generated assist in understanding the oral transmission of this parasite and its better interpretation of epidemiological, prevention and control. Besides the implementation of Good Hygiene Practices, Good Manufacturing Practices and the rapprochement between science institutions and producers of açaí to contribute in solving this problem.

**KEYWORDS:** Chagas Disease; *Trypanosoma Cruzi*; Açaí; Oral Transmission; Health Surveillance

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\* E-mail: renata.trotta@incqs.fiocruz.br

Recebido: 27 ago 2014

Aprovado: 12 out 2014



## INTRODUÇÃO

A história natural da doença de Chagas começou há milhares de anos como uma zoonose, particularmente entre os animais silvestres, e que ainda persiste em áreas como a da região amazônica. Quando o homem invadiu os ecótipos naturais, a transmissão da doença aconteceu acidentalmente como uma antropozoonose. Como resultado do desmatamento para atividade da agricultura e pecuária na América Latina nos últimos trezentos anos, triatomíneos incapazes de alimentar-se devido ao deslocamento de animais silvestres começaram a colonizar áreas ao redor e dentro de casas. Eles adaptaram-se a este novo nicho, alimentando-se de sangue de humanos e animais domésticos como uma zoonose<sup>1</sup>. Entretanto, com as mudanças no ambiente decorrentes da ocupação humana, o panorama se modificou e, atualmente, esta doença se configura em um importante problema de saúde pública com uma ampla distribuição na América Central e do Sul, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina<sup>2</sup>.

A doença de Chagas ou tripanossomose americana foi descoberta em 1909, pelo pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1878-1934), no município de Lassance, Interior do Estado de Minas Gerais<sup>3</sup>. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença de Chagas está entre as dezessete doenças tropicais negligenciadas, atingindo cerca de 10 milhões de indivíduos infectados nas Américas, sendo que somente no Brasil há 2 milhões de chagásicos<sup>4</sup>. Além disso, está entre as mais importantes infecções parasitárias e, no final do século passado, foi considerada como a mais importante pelo Banco Mundial, por apresentar um impacto socioeconômico significativamente maior que o obtido pelo efeito combinado de todas as outras infecções causadas por parasitos<sup>5</sup>.

A doença se estabelece por meio de um ciclo biológico complexo e ocorre pela transmissão do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), um protozoário hemoflagelado, da Ordem Kinetoplastida e da Família Trypanosomatidae. O ciclo inclui dois tipos de hospedeiros. O primeiro é um inseto hemíptero e hematófago, popularmente conhecido como barbeiro (triatomíneo) e, o segundo, um mamífero reservatório que pode pertencer a diversas classes, como marsupiais e roedores<sup>6</sup>. A dispersão da doença de Chagas no Brasil guarda relação direta com a presença das principais espécies de triatomíneos domiciliares: o *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus*<sup>7</sup>.

A doença apresenta duas fases: a inicial ou aguda (DCA), que perdura por 4 a 8 semanas, muitas vezes assintomática ou oligossintomática, caracterizada pela presença do tripomastigota no sangue do hospedeiro; e a segunda fase que pode perdurar por anos ou décadas, quando há evolução para a forma crônica, que é caracterizada pelo comprometimento dos tecidos cardíaco e/ou digestório do doente, com difícil detecção de parasitos circulantes<sup>8,9</sup>.

Em indivíduos cuja doença evolui para a fase crônica, pode haver o aparecimento de problemas cardíacos, megaesôfago e megacôlon, porém, entre os sintomas crônicos, o principal é a insuficiência cardíaca, que pode conduzir à morte súbita<sup>10,11</sup>.

As complicações mais severas afetam aproximadamente 30% dos pacientes e causam cerca de 50 a 100 mil mortes por ano<sup>12</sup>. Até o momento, a doença de Chagas não apresenta tratamento quimioterápico efetivo, nem vacina e os poucos medicamentos disponíveis são geralmente tóxicos<sup>9</sup>.

Outro aspecto importante é a marginalização pela sociedade do doente crônico, pois este fica impossibilitado de trabalhar, fato que, além de sobrecarregar os órgãos de previdência social com aposentadorias precoces, desperta no doente chagásico a sensação de fragilidade, comprometendo a sua autoestima, a sua saúde psicológica e, por conseguinte, a sua qualidade de vida. Além disso, os custos do tratamento de um doente chagásico crônico para o sistema público de saúde são enormes, em decorrência da morbidade, da hospitalização e do tratamento dos sintomas<sup>13</sup>.

A transmissão do *T. cruzi* para o ser humano pode ocorrer via vetorial, transmissão clássica que ocorre durante repasto sanguíneo com excretas de triatomíneo através da pele lesionada ou mucosa; via transfusional, através da transfusão de hemoderivados ou transplante de órgão por doadores contaminados; via vertical ou congênita; acidentes em laboratórios e via oral. Esta última via vem apresentando altos índices entre populações de áreas endêmicas (Cone Sul: Brasil e Argentina) e países do norte da América do Sul (norte do Brasil, Bolívia, Colômbia e Venezuela), com grande importância pela sua frequência, dificuldade de controle, falta de reconhecimento e necessidade de novas estratégias de prevenção. A transmissão pela via oral ocorre principalmente por ingestão de material contaminado com triatomíneos infectados ou suas fezes, ingestão de carne crua, ou mal cozida, ou ainda pelas secreções de alguns mamíferos infectados<sup>14</sup>.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi destacar os novos desafios a serem enfrentados pelos órgãos de saúde pública na prevenção da transmissão da doença de Chagas pelo consumo de açai.

## METODOLOGIA

Foi realizado um levantamento das publicações de leis, decretos, portarias, resoluções, instruções normativas, regulamentos técnicos, informes técnicos, artigos nacionais e internacionais nas bases de dados PubMed e Google Scholar, usando os descritores: açai, doença de Chagas, transmissão oral, surtos, *Trypanosoma cruzi*, Vigilância Sanitária, Chagas disease, oral transmission e health surveillance.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Doença de Chagas transmitida por via oral e registros de surtos envolvendo alimentos

A possibilidade de transmissão da infecção por via oral foi demonstrada experimentalmente, pela primeira vez por Nathan-Larrier, em 1921, ao reproduzir a doença de Chagas em animais de laboratório que receberam formas tripomastigotas do parasito por



via oral e por Brumpt, em 1931, colocando fezes de triatomíneos infectados na mucosa bucal de animais<sup>13,14</sup>. A maior experiência coube a Carlos Diaz Lingria e colaboradores, na Venezuela, entre as décadas de 1960 e 1980, que trabalharam com cães, cobalás e roedores, infectando-os por via oral com cepas locais de *T. cruzi* originadas de triatomíneos naturalmente infectados<sup>17,18,19</sup>.

Em 1985, Jansen e Deane constataram a infecção de camundongos que ingeriram alimentos contaminados com excrementos do gambá *Didelphis marsupialis*, ampliando as ações deste marsupial como reservatório e transmissor do *T. cruzi*<sup>20</sup>.

Em 1994, Calvo-Méndez e colaboradores demonstraram a infecção chagásica por via oral em camundongos pela administração de água potável, leite pasteurizado, carne moída crua ou cozida, queijo fresco e arroz cozido contaminados com fezes de *Triatomina pallidipennis*, concluindo que o leite se apresentou como o meio mais efetivo para a transmissão do *T. cruzi*<sup>21</sup>.

Castanho e colaboradores, em 2002, relataram a possibilidade da infecção chagásica em camundongos utilizando caldo de cana contaminado com fezes de *Rhodnius neglectus* contendo *T. cruzi*<sup>22</sup>.

Em 2008, Yoshida descreveu, através de estudos de infecção experimental por *T. cruzi* 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<sup>23</sup>.

Barbosa-Labello, em 2010, demonstrou em seu trabalho utilizando modelo animal que o *T. cruzi* foi capaz de sobreviver na polpa de

açai por diferentes períodos de incubação e sob diversos tratamentos térmicos, além de preservar a sua virulência em camundongos<sup>24</sup>.

O primeiro caso de infecção humana pela via oral foi registrado na Argentina por Mazza e colaboradores, em 1936, através da ingestão do leite materno<sup>25</sup>. 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<sup>26</sup>.

Em países como Equador e Colômbia também foram descritos casos suspeitos de transmissão oral da doença de Chagas a partir da ingestão de carnes de animais silvestres e vinho de palma regional<sup>27,28,29</sup>.

No Brasil, dentro e fora da região amazônica, muitos casos de DCA têm sido registrados em forma de surto caracterizando-se por um grupo de pessoas reunidas em um mesmo lugar que ao ingerirem um mesmo tipo de alimento adoecem quase que simultaneamente com quadro febril e manifestações gerais de uma infecção sistêmica. Apesar do crescente número de casos agudos, os relatos dessa fase da doença são escassos na literatura. Segundo Teixeira e colaboradores, para cada caso agudo notificado, podem ser estimados de 20 a 100 outros casos, o que caracteriza a subnotificação da doença<sup>3</sup>.

No período de 1965 até 2009, foram registrados 8 surtos fora da região amazônica brasileira, totalizando 106 casos, conforme Tabela 1.

Na região amazônica brasileira, o número de surtos é bem maior do que nas regiões apresentadas anteriormente. Foram 149 surtos distribuídos pelos estados do Acre (3), Amapá (22), Amazonas (2), Maranhão (2) e Pará (120), totalizando 423 casos descritos entre os anos de 1968 a 2010. Os surtos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1. Surtos de doença de Chagas pela transmissão oral fora da Amazônia Brasileira, no período de 1965 a 2009.

Local	Ano	Nº de Casos	Nº de Óbitos	Alimento Suspeito
Taubaté <sup>30</sup> - RS	1965	17	6	ND
Riacho de Santana - BA <sup>31</sup>	1979	20	ND	ND
Cataló de Rocha <sup>32</sup> - PB	1986	26	2	Caldo de cana
Navegantes <sup>33</sup> - SC	2005	24	3	Caldo de cana
Redenção <sup>34</sup> - CE	2006	8	2	ND
Ibitinga e Macaúbas <sup>35</sup> - BA	2006	7	2	Água
Axixá do Tocantins <sup>36</sup> - TO	2009	4	ND	Palmito
Total		106	15	

ND: Não divulgado.

Tabela 2. Surtos de doença de Chagas pela transmissão oral na Amazônia Brasileira no período de 1968 a 2010.

Local	Ano	Nº de Casos	Nº de Óbitos	Alimento Suspeito
Belém <sup>37</sup> - PA	1968	4	ND	ND
Amapá e Pará <sup>38</sup>	1982-2001	149	ND	Açai
Igarapé-Miri <sup>39</sup> - PA	2002	12	2	ND
Belém <sup>40</sup> - PA	2004	3	ND	ND
Santarém <sup>41</sup> - PA	2006	21	ND	Sacaba
Região amazônica <sup>42</sup>	2007	88	4	Açai
Região Norte <sup>43</sup>	2008	129	ND	Açai
Rio Negro <sup>44</sup> - AM	2010	17	ND	Açai
Total		423	6	

ND: Não divulgado.



A ocorrência de transmissão do *T. cruzi* por meio de alimentos é, portanto, fato comprovado em diferentes modelos experimentais e em observações de seres humanos. O açaí foi o alimento associado ao maior número de casos de doença de Chagas ocorridos na região Norte nos últimos anos<sup>12</sup> seja pela contaminação dos frutos ou da própria polpa por meio de dejetos de animais reservatórios ou de insetos vetores infectados das áreas endêmicas<sup>13,14</sup>.

#### Açaí: aspectos nutricionais, sociais, econômicos e de saúde pública

Devido à sua importância socioeconômica pelo aproveitamento integral do açaí, foi observado um crescimento da demanda do mercado nacional nos últimos anos, despertando grande interesse em investimentos e pesquisas sobre o assunto. Um dos grandes interesses pode ser atribuído às propriedades nutricionais e ao valor calórico do açaí, pois este é um alimento rico em proteínas, fibras, lipídios, vitamina E e minerais como manganês, cobre, boro e cromo. Além disso, este fruto possui um elevado teor de antocianinas, que favorecem a circulação sanguínea e protegem o organismo contra a arteriosclerose, associados à sua composição fitoquímica e capacidade antioxidante. Outras propriedades foram ou estão sendo estudadas e podem ser aplicadas em diversos usos como cosméticos, biocidas, contraste oral para ressonância e dispositivos biomédicos<sup>15,16,17,18</sup>.

O açaí é o alimento diário para muitas pessoas da população do norte e, pelo preço acessível e alto valor nutricional, muitas vezes a única refeição do dia. Nesta região a comercialização e consumo são realizados imediatamente após o seu processamento, sem qualquer tratamento térmico.

A região norte tem sido bastante procurada para o ecoturismo atraindo pessoas de diversos países. A cozinha amazônica é apresentada como a autêntica cozinha brasileira, sendo marcadamente de origem indígena, onde muitos alimentos são apreciados, entre eles o açaí. Desse modo, muitos turistas podem estar sendo expostos ao risco de contraírem doença de Chagas contribuindo para o aumento do número de pessoas contaminadas em países não-endêmicos. Deve-se considerar que a transmissão oral pode levar a um quadro assintomático da doença.

Estudos apontam um aumento significativo de pessoas com doença de Chagas em países como Japão, Estados Unidos, Canadá, Austrália, Bélgica, Portugal, França, Itália, Suíça, Reino Unido, Alemanha, Croácia, Dinamarca, entre outros<sup>19</sup>. Dada a significativa migração de pessoas de área endêmica para as mais diversas regiões, a infecção pelo *T. cruzi* pode ocorrer em qualquer país, com risco do aparecimento de novos casos da doença decorrentes da transmissão de mãe para filho, doação de sangue, doação de órgãos e acidentes de laboratório.

Outros fatores que devem ser considerados referem-se à pouca efetividade do congelamento como métodos de controle da transmissão e à excelente adaptação que o parasito demonstrou ao estresse térmico no tratamento combinado a 4°C e temperatura ambiente<sup>20</sup>, podendo sugerir a viabilidade do parasito em produtos exportados, contribuindo assim ainda mais para o aumento do número de pessoas com doença de Chagas em países não endêmicos.

Deve-se ressaltar que a segurança alimentar é uma questão global e um aumento na exportação de produtos alimentares sem o tratamento adequado pode levar à introdução e estabelecimento de novas doenças em áreas geográficas que nunca experimentaram certos patógenos de origem alimentar.

O Ministério da Agricultura e do Abastecimento, através da Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000, aprovou o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e Qualidade para polpa de frutas, dentre as quais se encontra a polpa de açaí. Os produtos obtidos do fruto do açaí são classificados de acordo com a adição ou não de água e percentual de sólidos totais em polpa de açaí (polpa extraída sem adição de água e sem filtração); açaí grosso ou especial (polpa extraída com adição de água e filtração e sólidos totais acima de 14%); açaí médio ou regular (polpa extraída com adição de água e filtração e sólidos totais entre 11% e 14%) e açaí fino ou popular (polpa extraída com adição de água e filtração e sólidos totais entre 8% e 11%). Quanto aos ingredientes básicos, a polpa de açaí e o açaí devem ser obtidos de frutas frescas, sãs, maduras, desprovidas de terra, sujidade, parasitas e microrganismos que possam tornar o produto impróprio para consumo<sup>21</sup>.

No entanto, problemas que norteiam a qualidade sanitária dos alimentos produzidos a partir desse fruto têm preocupado a população e levado aos sistemas públicos de saúde uma nova demanda para o enfrentamento da doença de Chagas por meio do consumo de açaí.

Além da má qualidade sob o ponto de vista microbiológico por apresentarem elevadas taxas de coliformes fecais, bolores e leveduras, o açaí também está envolvido com frequência, nos diversos estados brasileiros, na transmissão oral da doença de Chagas, tornando-se um problema de saúde pública e prejudicando sua comercialização tanto no mercado interno, quanto no internacional<sup>22,23</sup>.

A escassez de dados com relação a esse tipo de transmissão aliada à falta de programas de capacitação dos manipuladores, de tecnologia para processamento do fruto e do controle da qualidade tornam o consumo do açaí um risco à saúde do consumidor.

#### Estratégias e ações governamentais para reduzir os números de casos de DCA por transmissão oral

Em 2005, o Ministério da Saúde publicou o “Consenso Brasileiro de doença de Chagas” com o objetivo de padronizar as estratégias de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle da doença de Chagas<sup>24</sup>.

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<sup>25</sup>.

No caso específico do açaí, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), elaborou o procedimento para seu processamento, com etapas desde a colheita até congelamento e estoque visando tanto o processamento tradicional quanto o industrial<sup>26</sup>.



A consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos, realizada em 2006, 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 do *T. cruzi* e, consequentemente, a sua melhor interpretação epidemiológica e de prevenção/controlar tais como técnicas de detecção do *T. cruzi*, em alimentos, dentre outras<sup>14</sup>.

Em 2008, a ANVISA elaborou um Informe técnico sobre o gerenciamento do risco sanitário na transmissão de doença de Chagas aguda por alimentos e recomendou à comunidade científica que os seguintes temas necessitavam ser pesquisados: 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. Dentre estas ações estão o incentivo e o fomento à produção científica, inclusão do açaí no programa estadual de monitoramento de alimentos, desenvolvimento de análise de risco sobre o açaí, incentivo à criação de redes de comunicação de surtos pelas regionais e municípios e elaboração de um diagnóstico do produto açaí com informações disponíveis sobre produção e mercado<sup>15</sup>.

Em 2009, o Ministério da Saúde elaborou o "Guia de vigilância, prevenção, controle e manejo clínico, da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos", destinando-se 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<sup>16</sup>.

Em função da sua missão institucional, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCCQS) tem atuado de forma participativa na organização de uma estrutura de vigilância sanitária que permita identificar, avaliar e gerenciar riscos à saúde humana. Isto se tornou um grande desafio em função da complexidade dos avanços tecnológicos, principalmente na área de alimentos, que podem representar um risco sem ações de controle já estabelecidas. A disponibilização de métodos para detecção de *T. cruzi* em alimentos é uma ferramenta poderosa na investigação epidemiológica da doença de Chagas, transformando evidências epidemiológicas em dados comprobatórios de que alimentos estejam efetivamente contaminados por *T. cruzi*. O INCCQS implantou um método de detecção de *T. cruzi* em açaí por PCR que possibilita uma identificação precisa e rápida do agente patogênico, permitindo o controle de qualidade de alimentos consumidos em todo território brasileiro oriundos de regiões endêmicas, como é o caso da polpa de açaí<sup>17</sup>.

Desde 2011, o INCCQS vem analisando amostras contendo açaí como polpas, docinho, sorvete, picolé, mingau, frutos e sementes. Vários produtos apresentaram resultados positivos para

detecção de DNA de *T. cruzi*, demonstrando falhas nas Boas Práticas de Fabricação<sup>18</sup>.

No Estado do Pará, foi criado, no ano de 2011, o Programa Estadual de Qualidade do Açaí (PEQA), objeto do Decreto Estadual nº 2.475/2010 e coordenado pela Secretaria de Estado de Agricultura (SAGR), que tem a participação de 14 instituições. 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)<sup>19</sup>.

O governo do Estado do Pará publicou o Decreto nº 326, de 20/01/2012, que estabelece regras para cadastramento dos batedores artesanais de açaí, considerando a necessidade do conhecimento real do número de estabelecimentos que manipulam artesanalmente o açaí no Estado do Pará, a fim de possibilitar ao Estado a promoção de políticas públicas de inclusão socioproductivas imediatas neste segmento da cadeia produtiva. Além disso, estabelece requisitos higiênico-sanitários para a manipulação de açaí por batedores artesanais, de forma a prevenir surtos com Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) e minimizando o risco sanitário<sup>20</sup>.

A manutenção dos progressos alcançados no controle da doença de Chagas dependerá do compromisso político e da disponibilização de recursos humanos e financeiros para saúde pública. A resolução WHA 63.20 aprovada na 63ª Assembleia Mundial de Saúde, em maio de 2010, aconselha os Estados-Membros, onde a doença é endêmica ou não-endêmica, a controlar todas as vias de transmissão, inclusive a oral, e integrar os cuidados de pacientes com todas as formas clínicas da doença nos serviços de atenção primária<sup>21</sup>.

A DWS tem trabalhado na facilitação da criação de redes a nível global e no reforço no fortalecimento mundial de vigilância epidemiológica da doença tanto para prevenir as formas de transmissão como para promover o acesso precoce ao diagnóstico e tratamento. Além disso, presta colaboração com os Estados-Membros e iniciativas intergovernamentais, com o intuito de estabelecer objetivos e metas para a prevenção e controle da doença; promoção de pesquisas relacionadas à prevenção, controle e atenção; avanço em esforços intersetoriais e colaboração, e apoio nas mobilizações de recursos nacionais e internacionais, públicos e privados para esses objetivos<sup>22</sup>.

## CONCLUSÃO

Segundo Trevisan, o conhecimento melhora processos, aperfeiçoa serviços, cria negócios e, sobretudo torna a gestão eficiente. E isso só é obtido com educação e ciência. Daí a importância de se juntar a capacidade de gerar desenvolvimento do mundo acadêmico com o meio empresarial<sup>23</sup>.

Apesar de existirem importantes estratégias sendo implementadas, o Brasil ainda se encontra num estágio embrionário e pontual no combate à doença de Chagas transmitida via alimento.

Ainda há a necessidade de incentivos à pesquisa para que conhecimentos gerados relacionados à viabilidade do *T. cruzi* em



diferentes alimentos, técnicas de detecção e de inativação e formas de contaminação dos alimentos pelo *T. cruzi*, entre outros, auxiliem na compreensão da transmissão oral desse parasito e sua melhor interpretação epidemiológica, de prevenção e controle<sup>14</sup>.

São necessárias ainda estratégias para garantir a inocuidade do açaí, mantendo suas propriedades sensoriais e nutricionais. Assim, as Boas Práticas de Higiene, Boas Práticas de Manufatura e a aproximação entre instituições de ciência e os produtores de açaí são essenciais para contribuir na solução deste problema.

Programas de capacitação para os bateadores artesanais, tecnologia para processamento da polpa de açaí e o controle da

qualidade são investimentos que devem ser realizados para que esse produto tão importante para população atinja um padrão de qualidade como é estabelecido acima.

Sendo assim, existem muitos desafios para o Brasil no que se refere à estruturação de ações voltadas para atenção, vigilância, prevenção e controle, com vistas a respostas efetivas para toda a sociedade.

Desta forma, espera-se que os produtores de polpa alcancem um estágio de produção que garanta a qualidade, a minimização dos riscos de saúde, o valor nutricional e as propriedades sensoriais desse alimento tão desejado na cultura brasileira.

## REFERÊNCIAS

- Coura JR. Chagas disease: what is known and what is need: a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(Supl 1):113-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000900018>
- Szajmian SH, Ravaschino EL, Docampo R, Rodriguez JB. Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1,1-bisphosphonates derived from fatty acids against *Trypanosoma cruzi* targeting farnesyl pyrophosphate synthase. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15(21):4685-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.07.060>
- Chagas JR. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909;1:159-218.
- World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2010.
- World Health Organization. Control of Chagas disease: second report of the WHO Expert Committee. Geneva: World Health Organization; 2002. (WHO Technical report series, 905).
- Deane, MR, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984;79(4):513-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761984000400021>
- Valente VC. Estudo genotípico de *Trypanosoma cruzi*: epidemiologia e caracterização molecular de isolados do homem, triatomíneos e mamíferos silvestres do Pará, Amapá e Maranhão [tese]. Pará: Universidade Federal do Pará; 2011.
- Coura JR. Tripanosomose, doença de Chagas. *Ciênc Cult*. 2003;55(1):30-3.
- Centers for Disease Control and Prevention. Parasites: american Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2013 [acesso em: 30 set 2013]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas>
- Passos, LAC, Guaraldo, AMA, Alves, DP. Análise da interferência da polpa de açaí na transmissão oral de *Trypanosoma cruzi*, contribuindo para o surgimento de surtos de Doença de Chagas Aguda (DCA) na região Norte do Brasil: relatório final, convênio 667/ 2008 com Ministério da Saúde. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2010. [Relatório final, convênio 667/2008, com Ministério da Saúde].
- Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(5):463-91. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000500001>
- Keenan M, Alexander PW, Diao H, Best WM, Khong A, Kerfoot MRC et al. Design, structure-activity relationship and in vivo efficacy of piperazine analogues of fenarimol as inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(7):1756-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.050>
- Mancayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:17-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900005>
- Coura JR. Transmissão da infecção chagásica por via oral na história natural da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39 (Supl 4):113-7.
- Natan-Larrier L. Infections à Trypanosomes at voies de penetrations des virus. *Bull Soc Pathol Exot*. 1921;14:537-42.
- Brunpt, E. *Précis de parasitologie*. Paris, Masson; 1931. Tome 1.
- Diaz Ungria, C. Transmisión experimental del *Trypanosoma cruzi* en los vertebrados: la contaminación bucal a partir de heces de *Rhodnius prolixus*. *Rev Vet Venez*. 1964;16(95):341.
- Diaz Ungria C. La vía bucal en la transmisión de las tripanosomiasis animales. *Bol Acad Ciênc Físic Mat Nat*. 1967;27(74):33.
- Diaz Ungria, C. La contaminación por vía buco-gástrica e ocular en los tripanosomas. *Rev Univer Zulia*. 1968;41:45.



20. 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: Anais da 12ª Reunião sobre Pesquisa Básica em Doenças de Chagas; 1985; Caxambu, MG. p. 39.
21. Calvo-Méndez ML, Nogueira-Torres B, Alejandro-Aguilar R, Cortés-Jiménez M. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection via contaminated water and food. *Rev Latinoam Microbiol*. 1994;36(1):67-9.
22. Castanho REP, Martins LPA, Godoy CAP, Rosa RM. Infecção experimental de camundongos através da ingestão de caldo de cana contaminado por *Trypanosoma cruzi*. In: 38o Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 24-28 fev 2002; Foz do Iguaçu, Brasil.
23. Yoshida N. Molecular mechanisms of infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;104(suppl 1):101-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900015>
24. Barbosa-Labello R. Transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* pela polpa de açaí em camundongos [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2010.
25. Mazza S, Montana A, Benitez C, Janzi E. Transmission del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas. *MEPRA*. 1936;28:41-6.
26. Storino R, Jörg ME. Vías de infección y aspectos clínicos. In: Storini R, Milesi, editores. *Enfermedad de Chagas*. Doyma: Argentina; 1994.
27. Amunáteiz M, Chico ME, Gudertan RH. Chagas disease in Ecuador: a sylvatic focus in the Amazon region. *J Trop Med Hyg*. 1991;94(3):145-9.
28. 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.
29. Rodríguez 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(Sup 1):280.
30. Carceres CD, Nicholls S, Comedor A, Gualdrón L, Slat E, Dib JC et al. Investigación de un brote de síndrome febril con miocarditis aguda en Guamal, Magdalena. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional, Instituto Nacional de Salud; 7-11 Jun 1999; Santa Fé de Bogotá, Colombia. p. 180-6.
31. Teixeira ARL, Monteiro PS, Rebelo JM, Argázaraz ER, Vieira D, Lauria-Pires L et al. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerging Infect Dis*. 2001;7(1):100-12.
32. 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 1966.
33. Silva NN, Clausel DT, Nóbis H, Nello AL, Ossani J, Rapone T, Snell T. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1968;10:265-76.
34. Barrett TV, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godfrey DG, Teixeira R, Almeida de Souza JA, Sherlock JA. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74(1):84-90.
35. Shikanay-Yasuda WR. Surto epidêmico de doença de Chagas aguda em Catolé do Rocha, Paraíba. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987;20(supl 1):60.
36. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina. Brasília, DF: Ministério da Saúde; [2005?] [acesso em: 12 dez 2007]. (Nota técnica). Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21270](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21270).
37. Dias JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F et al. Surto de doença de Chagas aguda associada à transmissão oral. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(3):296-300. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000300014>
38. Oliveira IAS, Silva LR, Márcia Faria E, Silva MF, Fagundes ACG. Investigação entomológica e sorológica de animais silvestres e domésticos em áreas de surto da doença de Chagas aguda, no Município de Arixá do Tocantins, 2009, Tocantins - Brasil. In: Anais do 47o Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [CD-ROM]; 23-26 mar 2011; Natal, Brasil. p. 1082.
39. Shaw J, Lalson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones da doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1969;3(2):153-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101969000200005>
40. Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN. Por que ocorrem episódios familiares de doença de Chagas associado à transmissão oral na Amazônia brasileira? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(supl 1):165. Anais do 38o Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2002; Foz do Iguaçu, Brasil. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2002.
41. Pinto AYN, Valente SAS, Lopes R, Silva O, Castro TB, Valente VC. Ocorrência de tripanossomíase aguda familiar no município de Igarapé-Miri, Pará: gravidade de apresentação clínica em idosos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(supl 1):381. [Resumo apresentado ao Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2003 mar. 4-7; Belém].
42. Valente VC, Almeida AJB, Valente SAS, Pinto AYN, Miranda C, Oliveira RA et al. Nova microepidemia familiar com três casos de doença de Chagas em Belém, estado do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(supl 1):413.
43. Crespo FG, Quispe RR, Couto RDI, Galilez RM, Aguilar FW, Quiroga MM et al. Surto de doença de Chagas aguda em Mojuí dos Campos, Pará: manifestações clínicas e laboratoriais [resumo]. In: 43o Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 11-15 mar 2007; Campos do Jordão, SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 40:28.
44. Ferreira KS, Schmidt FL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, Passos LAC. Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot*. 2009;72(2):441-6.



45. Secretaria de Vigilância em Saúde (BR). 2007. [Internet]. Doença de Chagas aguda por transmissão oral: nota técnica. 2007 [acesso em: 26 set 2010]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21310](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21310)
46. Souza-Lima RC, Barbosa MGV, Coura JR, Arcanjo ARL, Nascimento AS, Ferreira JWBB et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(4):510-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-8682-1367-2013>
47. Alexandre, D, Cunha, RL, Hübinger, MD. Conservação do açaí pela tecnologia dos obstáculos. *Ciência Tecnol Aliment.* 2004;24(1):114-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612004000100021>
48. Sanchez TA. Caracterização e aplicação preliminares de um agente de contraste oral natural para imagens por ressonância magnética do trato gastrointestinal (dissertação). São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.
49. Santos GM, Mata GA, Sousa PHM, Costa JMC, Figueiredo RW, Prado GM. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea Mart*). *Arch Latinoam Nutr.* 2008;58(2):187-92.
50. Gabriel, LP. Caracterização de poliuretano a base de açaí formulado para construção de dispositivos biomédicos (dissertação). São Paulo: Universidade Estadual de Paulo; 2012.
51. Coura JR, Albajar Vilhas P. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* 2010;465:56-7. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09221>
52. BRASIL. Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Regulamentação técnica para fixação dos padrões de Identidade e Qualidade para polpas de frutas. *Diário Oficial da União*, 10 jan. 2000.
53. Chisté RC, Cohen KD, Matza VM, Furtado AAL, Medeiros NL. Contaminantes microbiológicos em polpas de açaí comercializadas na cidade de Belém-PA. *Rev Bras Tecnol Agroind.* 2011;5(2):524-30. <http://dx.doi.org/10.3895/rbta.v5i2.853>
54. Nascimento LRC, Silva MA, Chaar, JS. Polpa de açaí: o caso da produção do pequeno produtor urbano de Manaus. *Sci. Amazon.* 2014 [acesso em: 14 jun 2014 ]; 3(2). Disponível em: <http://www.sciencia.ufam.edu.br>
55. Ministério da Saúde. Consenso brasileiro em Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(supl 3):1-29.
56. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 218, de 29 jul 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimento higiênico sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais. *Diário Oficial da União*. 30 jul 2005.
57. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Sistema de produção do açaí. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; 2008 [acesso em: 1 out 2013 ]. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai\\_2ed/paginas/apresentacao.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/apresentacao.htm)
58. Pérez-Gutiérrez E, Agrelo RS, Figueroa R. 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):512-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822006000500020>
59. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerenciamento do risco sanitário na transmissão de doença de Chagas aguda por alimentos. 2008 [acesso em: 11 nov 2009]. (Informe técnico, 35). Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa=Portal/Anvisa/inicio/Alimentos/Assuntos=de+interesse/Informes+Tecnicos/2008-06-19-35>
60. Organização Pan-Americana de Saúde. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. Rio de Janeiro: Organização Pan-Americana de Saúde; 2009. (Manuais técnicos, 12).
61. Trotta RBF, Fracalanza SAR, Cardarelli-Leite P. Implantação da técnica de PCR para detecção de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí. In: 5o Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária; 13-17 nov 2010; Pará, Brasil. [5nt].
62. Trotta RBF, Melandre AM, Branquinho MR, Cardarelli-Leite P. Detecção de *Trypanosoma cruzi* por PCR em açaí: uma importante avaliação para o controle da qualidade de alimentos. In: 17o Encontro Nacional de Analistas de Alimentos; 3 a 7 jul 2011; Curitiba, Brasil. [5nt].
63. Governo do Estado do Pará. 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 do Pará*; 13 set 2010.
64. Governo do Estado do Pará. Decreto nº 326, de 20 de janeiro 2012. Estabelece regras para cadastramento dos bateadores 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 do Pará*; 24 jan 2012.
65. Trevisan, AM. A educação e a ciência como insumos do desenvolvimento. In: Whertel NJ, Cunha C, organizadores. Investimento em educação, ciência e tecnologia: o que pensam os empresários. Brasília: Unesco; 2004.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite [http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).

**APÊNDICE B** – Artigo “Extraction of *Trypanosoma cruzi* DNA from food: a contribution to the elucidation of acute ACD outbreaks”.



## Extraction of *Trypanosoma cruzi* DNA from food: a contribution to the elucidation of acute Chagas disease outbreaks

Renata Trotta Barroso Ferreira<sup>(1),(2)</sup>, Aline Martins Melandre<sup>(2)</sup>, Maria Luiza Cabral<sup>(2)</sup>,  
Maria Regina Branquinho<sup>(2)</sup>, Paola Cardarelli-Leite<sup>(2)</sup>

[1]. Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. [2]. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

### ABSTRACT

**Introduction:** Before 2004, the occurrence of acute Chagas disease (ACD) by oral transmission associated with food was scarcely known or investigated. Originally sporadic and circumstantial, ACD occurrences have now become frequent in the Amazon region, with recently related outbreaks spreading to several Brazilian states. These cases are associated with the consumption of açai juice by waste reservoir animals or insect vectors infected with *Trypanosoma cruzi* in endemic areas. Although guidelines for processing the fruit to minimize contamination through microorganisms and parasites exist, açai-based products must be assessed for quality, for which the demand for appropriate methodologies must be met. **Methods:** Dilutions ranging from 5 to 1,000 *T. cruzi* CL Brener cells were mixed with 2mL of açai juice. Four extraction of *T. cruzi* DNA methods were used on the fruit, and the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method was selected according to JRC, 2005. **Results:** DNA extraction by the CTAB method yielded satisfactory results with regard to purity and concentration for use in PCR. Overall, the methods employed proved that not only extraction efficiency but also high sensitivity in amplification was important. **Conclusions:** The method for *T. cruzi* detection in food is a powerful tool in the epidemiological investigation of outbreaks as it turns epidemiological evidence into supporting data that serve to confirm *T. cruzi* infection in the foods. It also facilitates food quality control and assessment of good manufacturing practices involving açai-based products.

**Keywords:** Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. *Euterpe* (açai). PCR detection. Food analysis.

### INTRODUCTION

In Brazil, both inside and outside the Amazon region, several cases of acute Chagas disease (ACD) have been recorded as an outbreak characterized by a group of individuals gathered in one place who, by ingesting the same type of food, became sick almost simultaneously with fever and general manifestations of a systemic infection<sup>(1)</sup>.

Until the year 2004, the occurrence of ACD by oral transmission, as associated with food consumption, constituted a scarcely known or investigated event. For the same reason, what was originally considered a sporadic and circumstantial occurrence has now become frequent in the Amazon region, which is associated with the occurrence of recent outbreaks in several Brazilian states<sup>(2)</sup>. Recent cases of ACD in Brazil are related to the consumption of açai juice where the contamination of the fruit itself or the pulp occurs through waste reservoir

animals or insect vectors infected with *Trypanosoma cruzi* in endemic areas<sup>(3),(4),(5)</sup>.

Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is a typical and popular berry fruit of the Amazon region in Northern Brazil, which in recent years has gained importance due to the health benefits associated with its phytochemical composition and antioxidant capacity.

Brazil is the world's largest producer, consumer, and exporter of açai. This fruit is marketed and consumed by the local people in the producing areas of Pará, Maranhão, Amapá, Rondônia, and Acre, which together comprise a distinct region considered endemic for the disease<sup>(6),(7)</sup>. With the increasing growth in commerce, not only has the consumption of the product spread across larger Brazilian cities, but it is now also being exported to America, Japan, China, and some European countries<sup>(7)</sup>.

The Ministry of Agriculture and Supply, through Normative Instruction number 1 of January 07, 2000, issued the technical regulation for setting the standards of identity and quality for fruit pulp, which includes açai pulp<sup>(8)</sup>. Pertinently, the pulp should be obtained from fruit that is fresh, sound, mature, and free of soil, dirt, parasites, and microorganisms that can render the product unfit for consumption<sup>(8)</sup>.

Although the guidelines for the processing of the fruit have been established with a view to minimize contamination

Corresponding author: Renata Trotta Barroso Ferreira.

e-mail: renata.trotta@incqs.fiocruz.br

Received 18 December 2015

Accepted 5 April 2016

through microorganisms and parasites, it is necessary to assess the quality of açaí-based products, for which appropriate methodologies must be adopted<sup>9</sup>.

Several recommendations and incentives on research methodologies for the detection of *T. cruzi* in food exist<sup>9,10</sup>, however, fully developed methods aimed at the detection of parasites in food are still lacking not only for furnishing a response to epidemiological investigations in cases of outbreaks, but also for controlling the quality of commercialized products.

Molecular methods for the quality control of foods are a reality, and as such, deserve special attention with regard to their availability for the regulation of products subject to sanitary surveillance.

Polymerase chain reaction (PCR) is widely used for the detection of food pathogens. Due to its high sensitivity and specificity, PCR-based methods have the advantage of providing rapid and precise identification of the pathogen and can therefore serve as a powerful tool in the hygienic and sanitary assessment of açaí-based foods.

Polymerase chain reaction requires a high-quality amplifiable deoxyribonucleic acid (DNA). Therefore, the choice of the method for DNA extraction is of great importance and constitutes a pre-requisite for molecular analysis. DNA amplification by PCR is influenced by the structural integrity of the DNA and the presence of matrix co-purification inhibitors or extraction reagents, which may reduce PCR efficiency.

In foods, the problems most often linked to DNA extraction include contamination by phenols and polysaccharides, among others. Açaí is composed of lipids, carbohydrates, fiber, vitamin E, proteins, minerals (Mn, Fe, Zn, Cu, and Cu), and antioxidant compounds such as anthocyanins, and phenolic compounds<sup>11</sup>, which pose a big challenge for DNA extraction from the parasites in such a complex food matrix.

In this context, the aim of this study was to compare the quantity and quality of *T. cruzi* DNA isolated from açaí artificially contaminated with *T. cruzi* cells, whereby four different DNA extraction methods were applied, and spectrophotometric absorbance readings were used to confirm the quality of the extracted DNA by PCR amplification of the gp85 gene superfamily/sialidase.

## METHODS

### Staining

The stains used in the present work were for the identification of 1) *Leishmania (Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903 – IOC-L 0566, *Leishmania (L.) amazonensis* IFLA/BR/1967/PH8 – IOC-L 575), *Leishmania* Collection (CLIOC/FIOCRUZ), Instituto Oswaldo Cruz; 2) *Trypanosoma cruzi* CL Brener, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (INI/FIOCRUZ); and 3) *Trypanosoma rangeli* COLPROT 273, Protozoa Collection (COLPROT/FIOCRUZ), Fundação Oswaldo Cruz.

### Artificial contamination of açaí

Labeled açaí medium, one kilogram of frozen fruit pulp was purchased from a supermarket in Rio de Janeiro, Brazil and thawed at 4°C. The pulp was then homogenized in a Seward Stomacher®400 Laboratory Blender (Seward, UK) and distributed in 50-mL polypropylene vials. For each extraction method, five 30-mL glass bottle vials received 2mL of the homogenate of açaí pulp and *T. cruzi* CL Brener with a cell suspension rate of 1,000 (Dilution 1), 100 (Dilution 2), 50 (Dilution 3), 10 (Dilution 4), and 5 (Dilution 5) parasite cells. This procedure was repeated three times, resulting in 15 glass bottles used per method. The homogenate of açaí pulp and *T. cruzi* was subjected to a freeze-drying for about 20 hours for reducing the volume of the mixture and for obtaining a lyophilisate to allow efficient extraction.

### DNA extraction

Four different methods for genomic DNA extraction were tested as displayed in Table 1. Two of these were performed using cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), as described by Cardarelli et al. 2005<sup>12</sup> and the Joint Research Centre 2005<sup>13</sup>, and the other two were performed using commercially available agents, namely DNAzol® (Invitrogen) and Nucleo Spin® (MACHEREY-NAGEL), strictly in accordance with the manufacturer's recommendations. The extractions were performed in triplicate for each method as indicated in Table 1.

### Assessment of concentration and purity of the extracted DNA

Deoxyribonucleic acid concentration was assessed by spectrophotometric measurement of the optical density (OD) at 260 nm using the GeneQuant™ equipment pro ribonucleic acid/deoxyribonucleic acid (RNA/DNA) calculator (Amersham Biosciences, UK). Ratios of the absorbance at A260/280 and A260/230 were determined to verify the purity of the preparations, which yielded samples that were found to be of acceptable quality and integrity.

### PCR for the detection of *Trypanosoma cruzi*

Standardization of the PCR for evaluating its specificity was performed using strains of *Leishmania chagasi*, *L. braziliensis*, *Trypanosoma rangeli*, and *T. cruzi*, where a pair of *T. cruzi*-specific primers were employed to amplify a telomeric region of the gp85/sialidase superfamily (Tc189Fw2 • 5'CCAACGCTCCGGGAAAAC•3' and Tc189RV3 • 5'GCGTCTTCTCAGTATGGACTT•3'), as described by Chiurillo et al.<sup>14</sup>.

After standardization, the same protocol was used for the detection of *T. cruzi* in different concentrations of cells mixed with açaí. The negative and positive controls used for the PCR were *T. rangeli* and *T. cruzi*, respectively. The fragments amplified by PCR were separated by agarose gel electrophoresis (2%w/v) containing 0.3µg/mL ethidium bromide immersed in 1X tris-borate-ethylenediaminetetraacetic acid (TBE) buffer (90mM Tris-borate, 2mM EDTA pH 8, 4), visualized on the "UVP™-20 Dual-Intensity transilluminator" (Cole-Parmer, US), and recorded in the image analyzer "Image Quant 300 Imager" (Amersham Biosciences, UK).

TABLE 1 - Summary of the DNA extraction methods used in this study.

Method	Description	Extraction/lysis buffer (volume)	Lysis incubation conditions	Final extract volume	Procedure references
CTAB	Selective precipitation of DNA using in-house reagents	2% CTAB, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8.0 (3.5ml)	60 min at 65°C	300µL DNase-free water	12
CTAB	Selective precipitation of DNA using in-house reagents	2% CTAB, 1.4M NaCl, proteinase K, RNase, 20mM EDTA 100mM Tris-HCl pH 8.0 (3.5ml)	60 min at 65°C	300µL DNase-free water	13
DNAzol	DNAzol/RNase (Invitrogen)	Novel guanidine-derivative lysis solution (3.5ml)	Not necessary	300µL DNase-free water	Manufacturer's instructions
NucleoSpin	NucleoSpin® Food Kit (Machery-Nagel) Two washing steps	Buffer C1* with 0.4mg/ml proteinase K (1,100µL)	30 min at 65°C	Elution buffer C1**	Kit instructions

DNA: deoxyribonucleic acid; CTAB: cetyltrimethyl ammonium bromide; EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid; CE: lysis buffer CE; CF: lysis buffer CF; \*included with the kit

### Validation of the selected DNA extraction method

Eighteen glass bottles containing about 2mL of açai were contaminated with 1,000 *T. cruzi* CL Brener cells and subjected to lyophilization. DNA was extracted according to the Join Research Centre (JRC) method, 2005, in 6 replicates, repeated for 3 consecutive days. After extraction, the concentration and purity of the extracted DNA were evaluated using the methods described above. The size of the extracted DNA was assessed by electrophoresis on 1% agarose gel. About 10µL of the DNA solution was deposited on an agarose gel in TBE 1X at 80 V for 1 hour.

## RESULTS

The DNA extracted using the NucleoSpin® method showed no reading in the spectrophotometer. The average concentration of the DNA extracted from açai infected with *T. cruzi* cells using the other three methods is shown in Table 2.

All three methods yielded sufficient quantities of DNA to allow PCR detection. Although the DNA extracted using the DNAzol method produced a four times greater value (about 320ng/µL) than the other two methods using CTAB (about 75ng/µL), the eluate with the extracted DNA had a brownish color due to the inefficiency of the method in eliminating the pigments present in açai. This may have led to overestimation of the DNA concentration and/or may have inhibited the PCR.

The purity of the DNA extracted using the three methods after the removal of outliers using the Grubbs test is shown in Table 2.

The A260/A280 ratio is used to test for the presence of proteins and thus helps estimate the purity of nucleic acids. For pure DNA, the value must be between 1.8 and 2.0. The A260/A230 reflects contamination by substances such as carbohydrates, peptides, phenols, and aromatic compounds. In the case of pure samples, the ratio should be above 2<sup>(19)</sup>.

With respect to the A260/A280 ratios obtained, the method using CTAB, RNase, proteinase, and 70% ethanol washes was able to extract DNA with higher purity<sup>(19)</sup>. The DNA extracted using DNAzol proved to exhibit a high protein contamination ratio, with values appreciably below 1.8.

With reference to the A260/A230 ratio, the method that came closest to the expected value was the CTAB method<sup>(19)</sup>. The use of DNAzol resulted in values far below expectation, wherein the DNA extracted showed a high degree of chemical contamination. The specificity of PCR for *T. cruzi* DNA was established with all four strains belonging to the Trypanosomatidae family (Figure 1).

Five dilutions of the DNA extracted using the CTAB method<sup>(19)</sup> allowed PCR amplification; the results can be observed both in Table 2 and in Figure 2.

The result of the validation of the 18 replicates (first day: 69.2, 66.0, 69.4, 72.4, 84.6, 84.4; second day: 78.2, 52.4, 61.0, 75.2, 54.0, 63.6; and third day: 73.4, 66.6, 76.0, 63.0, 87.2, 74.6) bears out an average of 70.6ng/µL, a standard deviation of 9.8ng/µL, and a coefficient of variation of 13.9%. No PCR inhibition was observed in the agarose gel, and amplicons of 100bp were generated in all the 18 replicates (Figure 3).

TABLE 2 - Evaluation of the average standard deviation with concentrations and coefficient of variation (%), along with purity using absorbance readings at 230, 260, and 280nm of DNA extracted from açai contaminated with *Trypanosoma cruzi*.

Extraction method	2mL açai with dilution	DNA conc. ng/µL (CV)	260:280nm ratio	260:230nm ratio	PCR inhibition
CTAB <sup>(12)</sup>	1,000 cells	80 ± 7 (8.8%)	2.3 ± 0.2	2.7 ± 0.7	No
	100 cells	85 ± 1 (1.2%)	2.4 ± 0.1	3.2 ± 0.5	Yes
	50 cells	79 ± 10 (12.7%)	2.5 ± 0.4	3.1 ± 0.8	Yes
	10 cells	82 ± 11 (13.4%)	2.4 ± 0.1	3.6 ± 0.9	No
	5 cells	82 ± 17 (20.8%)	2.5 ± 0.5	2.8 ± 0.3	Yes
	CTAB <sup>(13)</sup>	1,000 cells	73 ± 18 (24.7%)	2.0 ± 0.2	2.6 ± 1.4
100 cells		76 ± 14 (18.4%)	1.9 ± 0.1	3.0 ± 0.3	No
50 cells		80 ± 20 (25.0%)	2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.1	No
10 cells		66 ± 1 (1.5%)	2.1 ± 0.2	2.8 ± 0.5	No
5 cells		70 ± 6 (8.6%)	1.9 ± 0.0	2.6 ± 1.1	No
DNazol		1,000 cells	302 ± 36 (12.0%)	1.5 ± 0.0	0.42 ± 0.0
	100 cells	331 ± 36 (11.0%)	1.5 ± 0.1	0.40 ± 0.0	Yes
	50 cells	338 ± 119 (35.2%)	1.3 ± 0.0	0.21 ± 0.0	Yes
	10 cells	314 ± 75 (24.0%)	1.3 ± 0.0	0.21 ± 0.0	Yes
	5 cells	349 ± 63 (18.0%)	1.4 ± 0.0	0.21 ± 0.0	Yes

DNA: deoxyribonucleic acid; CV: coefficient of variation; PCR: polymerase chain reaction; CTAB: cetyltrimethyl ammonium bromide.

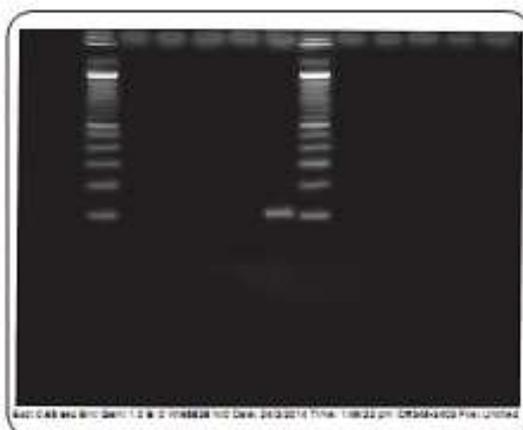


FIGURE 1 - Specificity of PCR for *Trypanosoma cruzi* established with four strains belonging to the Trypanosomatidae family. Lanes 1 and 7 contain a 100-bp size ladder (Gibco-BRL); Lane 2: H2O; Lane 3: *Lalshmania amazonensis*; Lane 4: *Lalshmania braziliensis*; Lane 5: *Trypanosoma rangeli*; Lane 6: *Trypanosoma cruzi* cL Brander. PCR: polymerase chain reaction.

## DISCUSSION

To date, no studies evaluating a methodology for *T. cruzi* DNA extraction directly from food have been conducted. This

study was aimed at identifying an efficient method for the extraction of *T. cruzi* DNA from *T. cruzi*-contaminated açai. Although the Nucleo Spin method has been developed for various types of food such as chocolate-based products and fruit concentrates, among others, it was shown to not be adequate for the detection of *T. cruzi* contamination in this study. DNA extraction by the CTAB method yielded satisfactory results with regard to purity and concentration for use in PCR.

The method employing the CTAB detergent for cell lysis is widely used for genetically modified organisms (GMO) analysis of raw or processed food; it is also commonly used for plants, especially in combination with other substances such as β-mercaptoethanol<sup>(14)</sup> (17) (18). The major difference between the two methods using the CTAB detergent for cell lysis tested in this study was the use of two different enzymes, RNases and Proteinase K, and the 70% ethanol wash<sup>(13)</sup>, which confirms the high sensitivity of the method with amplification of up to 2.5 cells/mL of açai.

Contamination of food by *T. cruzi* may occur especially when triatomines deposit their droppings on the surface of infected food or food ingredients, or when these triatomines are crushed with foods, mainly during fruit juice processing, such as in the processing of açai juice.

Equally important in the epidemiology of foodborne acute Chagas disease (ACD) is the contamination of equipment and utensils, contamination during transport, and contamination in the food processing environment, where it typically occurs by either urine or anal secretions of marsupials as well as by feces of infected bugs caused due to human invasion of forests<sup>(9)</sup> (19).



FIGURE 2 - PCR amplification of the DNA extracted from the homogenate of açai with *Trypanosoma cruzi* CL Brezer with a cell suspension rate of 1,000 to 5 parasite cells using 3 extraction methods. A) Lanes 1 to 5: DNAzol extraction method (no amplification); Lane 6: 100-bp size ladder (Gibco-BRL); Lanes 7 to 11: CTAB extraction method<sup>(23)</sup>; Lane 12: *Trypanosoma cruzi* CL Brezer (positive control). B) Lanes 1 and 6: 100-bp size ladder (Gibco-BRL); Lanes 3 to 7: CTAB extraction method<sup>(23)</sup>. PCR: polymerase chain reaction; DNA: deoxyribonucleic acid; CTAB: cetyltrimethyl ammonium bromide.

So far, it has not been possible to analyze the type of food involved in the outbreaks of orally transmitted Chagas disease to evidence the presence of the parasite. However, as quoted above, PANAFITOSA<sup>(19)</sup> proposes hypotheses that point to an explanation for the several outbreaks that have occurred in recent years in Northern Brazil, which were associated with the intake of possibly *T. cruzi*-contaminated açai juice.

The recorded cases of ACD in the outbreaks are related to the consumption of handmade açai juice.

In Latin America, around 100 million individuals suffer from Chagas disease acquired by various types of transmission. Additionally, the estimated number of people infected with *T. cruzi* in non-endemic countries for the disease is >300,000 in the



FIGURE 3 - Agarose gel electrophoresis of all the 18 amplified products obtained from the validation assay with primers Te189Fw2 and Te189Rv3. Top - Lane 1: H<sub>2</sub>O; Lane 2: *Trypanosoma rangeli* (negative control); Lane 3: 100-bp size ladder (Gibco-BRL); Lanes 4 to 16: homogenate of açai with *Trypanosoma cruzi* CL Brezer with a 100-cell suspension. Bottom - Lanes 1 to 10: homogenate of açai with *Trypanosoma cruzi* CL Brezer with a 100-cell suspension; Lane 11: *T. cruzi* CL Brezer (positive control); Lane 12: 100-bp size ladder.

United States; >5,500 in Canada; >80,000 in Europe and Western Pacific Regions; >3,000 in Japan; and >1,500 in Australia<sup>(20)</sup>. Migratory movements and the subsequent transmission by blood transfusion and organ transplantation have been suggested as the cause of the spread of *T. cruzi* around the World.

In Brazil, 2 million individuals are infected with *T. cruzi*<sup>(21)</sup>. Considering the high consumption of açai by tourists visiting the country, plus Brazilians themselves traveling to the above-mentioned non-endemic areas of the world, the oral transmission is assumed to be contributing to the increase in overseas cases. This assumption is rooted in the fact that, having acquired the asymptomatic disease, or even the manifestation of symptoms similar to those of other types of illnesses, visitors to Brazil are likely to return to their countries where blood banks may not be equipped with the proper framework required to provide an effective diagnosis of the disease.

Barbosa-Labello et al, in 2010<sup>(22)</sup>, used animal models to show that, in addition to surviving in açai pulp by different incubation periods and under different low temperatures treatments, *T. cruzi* was also able to preserve its virulence in mice. Regarded to be of great epidemiological importance, this finding discards the use of cooling processes and conventional freezing during long periods, which have been previously used as control methods

for orally transmitted ACD. This finding also reinforces the need to use bleaching as for the conservation of açai.

In consideration of the above findings, safety measures must be taken at all stages of the commercial or craft supply chain during the processing of açai. The development of large-scale detection and isolation methods for *T. cruzi* in food products is essential so that epidemiological evidence may serve as supporting data to certify that the food in question is actually contaminated with the parasite. Concurrently, despite the fact that DNA identification in foods itself does not constitute a methodology to assess the viability of the parasite, it can become an assessment tool to ensure proper application of good manufacturing practices.

In the case of açai, these tests will allow the identification of possible contamination during the production chain. This procedure is of great importance since oral transmission aggravates an epidemic of the disease, and disposes off refrigeration and food freezing processes as control methods for the oral transmission of ACD, thus inducing a new reflection, strongly related to underdevelopment<sup>(9)</sup>.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dra Maria de Fátima Madeira from *Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/Fundação Oswaldo Cruz (INI/FIOCRUZ)* for their support in cultivating strains of trypanosomatids.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### REFERENCES

1. Ferreira RTB, Branquinho MR, Cardarelli-Leite P. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açai: um desafio para a vigilância sanitária. *Vigil Sanit Debate* 2014; 2:4-11.
2. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 35 de 19 de junho de 2008. Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos (Internet). Brasília: Ministério da Saúde; 2008 (Cited 2009 November 11). Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos-de-Interesse/Informes+Tecnico/2008-06-19-35>
3. Passos LAC, Guaraldo AMA, Alves DP. Relatório final, convênio 667/ 2008 com Ministério da Saúde: "Análise da interferência da polpa de açai na transmissão oral de *Trypanosoma cruzi*, contribuindo para o surgimento de surtos de Doença de Chagas Aguda (DCA) na região Norte do Brasil". Campinas, SP; 2010.
4. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, Passos LAC. Chagas disease as a food borne illness. *J Food Protect* 2009; 72:441-446.
5. Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN, César MJB, Santos MP, Miranda COS, et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triazolinines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 291-297.
6. Homma AKO, Nogueira DL, Menezes AJEA, Carvalho JEU, Nicolli CML, Matos GB. Açai: Novos desafios e tendências. *Amazônia: CI & Desen* 2006; 1:7-23.
7. Menezes EMS, Torres AT, Sebaesrur AU. Valor nutricional da polpa de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) liofilizada. *Acta Amaz* 2008; 38:311-316.
8. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº1, de 7 de janeiro de 2000. Regulamentação técnica para fixação dos padrões de Identidade e Qualidade para polpas de frutas. *Diário Oficial da União*, 10 Jan. 2000. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento; 2000.
9. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Sistema de produção do açai. (Internet). Brasília, DF; 2008 (Cited 2013 November 1). Available at: [http://sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br/Fonte%3DHTML/Acai/SistemaProducao/Acai\\_2ed/pagina%3Dpresentacao.htm](http://sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br/Fonte%3DHTML/Acai/SistemaProducao/Acai_2ed/pagina%3Dpresentacao.htm).
10. Perez-Gutierrez E, Salvatella R, Figueroa R (args). Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos. Relatório Técnico. PANAFOSA; Rio de Janeiro, 2006. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:512-514.
11. Portinho JA, Zimmermann LM, Bruck MR. Beneficial effects of açai. *Int J Nutrit* 2012; 5:15-20.
12. Cardarelli-Leite P, Branquinho MR, Ferreira RTB. Detection of GMD in food products in Brazil: the INCQS experience. *Food control* 2005; 16:859-866.
13. Joint Research Centre (JRC). Event-specific method for the quantification of maize line NK603 using real-time PCR protocol. (Internet). 2005 (Cited 2015 October 1). Available at: <http://gmo-cr.jrc.ec.europa.eu/statusofdocs.htm>.
14. Chierillo MA, Crisante G, Rojas A, Peralta A, Dias M, Guevara, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10:775-779.
15. Corbieler P, Broothaerts W, Gloria S, Schimmel H, Burns M, Baoutina A, et al. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. I. 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.
16. Devi KD, Purnyanti K, Singh NS, Devi HS. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales-suitable for diverse PCR based downstream applications. *Springer Plus* 2013; 2:669.
17. Minas K, McEwan NR, Newbold CJ, Scott KP. Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *Fems Microbiol Lett* 2011; 325:162-169.
18. Moedal TK, Gamle SA. Identification and characterization of salt responsive miRNA-SSR markers in rice (*Oryza sativa*). *Gene* 2014; 535:204-209.
19. Organização Panamericana de Saúde, Organização Mundial de Saúde, PANAFOSA-VP. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. Rio de Janeiro: PANAFOSA-VROPAS/OMS; 2009.
20. Coura JR, Villaes PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010; 465:56-57.
21. World Health Organization. Crompton DWT, Peters P, editors. Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: First WHO Report on Neglected Tropical Diseases. *Nonserial Publication Series*. WHO report on neglected tropical diseases, volume 1; 2010. 172p.
22. Barbosa-Labello R. Transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* pela polpa de açai em camundongos. 2010 (dissertation). [São Paulo]: Universidade Estadual de Campinas; 2010. 120 p.