



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

MESTRADO ACADÊMICO

ALEF HENRIQUE GARCIA

CRUZIPAÍNA (Czp1) COMO BIOINDICADOR NO DIAGNÓSTICO DE
Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909) (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE)
EM SUCO DE AÇAÍ (*Euterpe oleraceae*) POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Araraquara, SP

2023

ALEF HENRIQUE GARCIA

CRUZIPAÍNA (Czp1) COMO BIOINDICADOR NO DIAGNÓSTICO DE
Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909) (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE)
EM SUCO DE AÇAÍ (*Euterpe oleraceae*) POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Dissertação de mestrado, apresentado ao Programa em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Câmpus de Araraquara, como requisito parcial para obtenção do Título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Araraquara, SP

2023

ESTE TRABALHO FOI FINANCEIRAMENTE APOIADO COM UMA BOLSA DE ESTUDOS DO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) DURANTE 24 MESES, PROCESSO 88887.508632/2020-00.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E/OU DIVULGAÇÃO, SEJA ELA TOTAL OU PARCIAL, DESTE DOCUMENTO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

G216c Garcia, Alef Henrique.
Cruzipaína (Czp1) como bioindicador no diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) em suco de açaí (*Euterpe oleraceae*) por ensaio imunoenzimático / Alef Henrique Garcia. – Araraquara: [S.n.], 2023.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área Parasitologia.

Orientador: João Aristeu da Rosa.
Coorientador: Paulo Inácio da Costa.

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Cisteína Proteases. 4. Técnicas Imunoenzimáticas. 5. *Euterpe*. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Costa, Paulo Inácio da, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

/
/

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Cruzipaína (Czp1) como bioindicador no diagnóstico de Trypanosoma Cruzi (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) em suco de açaí (Euterpe Oleraceae) por ensaio imunoenzimático

AUTOR: ALEF HENRIQUE GARCIA

ORIENTADOR: JOAO ARISTEU DA ROSA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOAO ARISTEU DA ROSA (Participação Virtual)
Departamento de Ciencias Biologicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Dra. ALINE RIMOLDI RIBEIRO (Participação Virtual)
Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité (MFP) / Université de Bordeaux (França)

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 15 de março de 2023

DEDICATÓRIA

Para Victor Gabriel, Sueli Ferreira e Alberto, Eliana e Roberto Garcia e para meu estimado orientador Prof. Dr. João Aristeu da Rosa.

Para você, caro colega cientista/acadêmico/curioso, que tirar proveito dos conhecimentos aqui estabelecidos.

AGRADECIMENTOS

Eu Te agradeço, Senhor, por todas as coisas boas e más que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, me fizeram chegar onde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou. Foi a minha jornada de tropeços, vitórias e derrotas, que me fez enxergar o verdadeiro significado e beleza da vida.

Eu amo a minha vida, Senhor! Abençoa-me com boa saúde, segurança, conforto, paz e alegria. Que as minhas preces e a minha gratidão cheguem ao Senhor. Amém!

Gratidão aos meus tios Sueli e Alberto pelas orientações e conselhos.

À minha família, por todo suporte, apoio e momentos de descontração e reflexão.
À Victor Gabriel, pelo amor, pelo carinho, pelo companheirismo essencial para que eu trilhasse esse caminho até o fim.

Ao meu Orientador, Professor João Aristeu, pela oportunidade, amizade, pelos ensinamentos e orientação.

Ao meu Coorientador, Professor Paulo Inácio da Costa, pela oportunidade, pela amizade, pelos ensinamentos e pela orientação.

Aos amigos do laboratório de parasitologia e hematologia clínica: Jader, Thiago, André, Vinícius, Rosana, Letícia, Aline, Heloisa, Lorrane, Rualdo e Lilian, pelos momentos de descontração, pela parceria diária, pelos cafés, pelas risadas e conselhos indispensáveis nos bastidores da produção científica.

Ao professor Adriano Mondini que se tornou um amigo querido que levarei em meu coração.

A Doutora Aline Rimoldi e ao Dr. Tiago Belintani que foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari da Universidade de São Paulo (USP) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), que com muito carinho cedeu o plasmídeo aqui utilizado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Schenkman, Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), que gentilmente cedeu o anticorpo policlonal anti-cruzipaína.

À UNESP, em nome da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, agradecemos o apoio institucional de infraestrutura e recursos humanos, especialmente o pessoal da Seção de Pós-graduação (Claudinha, Ani, Denise e Victor), pelos lembretes e pela ajuda em tudo que foi necessário.

Ao CNPq, agradecemos o auxílio financeiro concedido, que foi indispensável para a realização deste trabalho (Processo 88887.508632/2020-00).

“Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que faz arte em defesa da vida.”

Carlos Chagas, médico sanitarista (1879-1934)

RESUMO

A doença de Chagas é uma enfermidade infecciosa que afeta principalmente populações carentes em países menos desenvolvidos. É endêmica em 21 países das Américas, atingindo cerca de 6 a 7 milhões de pessoas e causando uma média de 14.000 mortes anualmente. O agente causador é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que é veiculado por triatomíneos, insetos hematófagos conhecidos como "barbeiros". Este estudo teve como objetivo avaliar as proteínas secretadas pela cepa Y (TcII) de *T. cruzi* em sua forma tripomastigota em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Para tanto, técnicas de biologia molecular e bioquímica foram utilizadas para identificar a cisteína protease cruzipaina por anticorpos e analisar a quantidade secretada em suco de açaí por meio de *Western blot*. A solução de formas tripomastigotas em PBS foi utilizada como padrão para verificar se a quantidade secretada de cruzipaina era suficiente para um teste imunoenzimático. Utilizou-se o plasmídeo pET21a contendo o gene da cisteína protease natural cruzipaina *Wild Type* (W.T), com uma cauda His6-tag, transformado para expressão em *E. coli* resistente à ampicilina como controle positivo. Para a metaciclogênese induzida *in vitro*, utilizou-se a cepa Y de *T. cruzi* e camundongos heterogênicos machos da linhagem Swiss. Os animais com parasitemia alta foram eutanasiados para coleta de sangue, que foi cultivado em meio LIT. A cruzipaina recombinante expressa em BL21 foi confirmada por *Western blot* com banda de 37 kDa. Os dados apresentados indicam que o método utilizado para expressar a cruzipaina em BL21 foi eficiente, produzindo uma quantidade satisfatória de secretomas. As etapas foram consideradas efetivas para alcançar esse resultado. Os métodos são considerados preliminares e requerem validação e testes adicionais para determinar sua eficácia na detecção de cruzipaina em suco de açaí. No entanto, os resultados obtidos são promissores e ajudam a entender as propriedades da cruzipaina recombinante em ensaios imunoenzimáticos e em amostras de suco de açaí. É importante enfatizar que medidas devem ser tomadas para preservar a integridade da proteína durante o processo de quantificação de proteínas. A degradação do anticorpo usado afeta a eficiência do método *dot blot*.

Palavras -chaves: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Técnicas Imunoenzimáticas. Cisteína Proteases. Eutérpe.

ABSTRACT

Chagas disease is an infectious disease that primarily affects disadvantaged populations in less developed countries. It is endemic in 21 countries in the Americas, affecting around 6 to 7 million people and causing an average of 14,000 deaths annually. The causative agent is the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted by triatomine bugs, blood-sucking insects known as "kissing bugs". This study aimed to evaluate the proteins secreted by the Y strain (TcII) of *T. cruzi* in its trypomastigote form in phosphate-buffered saline (PBS) solution. Molecular biology and biochemistry techniques were used to identify the cysteine protease cruzipain by antibodies and to analyze the secreted quantity in açai juice by Western blot. The trypomastigote forms in PBS solution were used as a standard to verify whether the secreted quantity of cruzipain was sufficient for an immunoassay test. The pET21a plasmid containing the natural cysteine protease gene cruzipain Wild Type (W.T), with a His6-tag, transformed for expression in ampicillin-resistant *E. coli*, was used as a positive control. For the *in vitro* induced metacyclogenesis, the Y strain of *T. cruzi* and male heterozygous Swiss mice were used. Animals with high parasitemia were euthanized for blood collection, which was cultured in LIT medium. The recombinant cruzipain expressed in BL21 was confirmed by Western blot with a band of 37 kDa. The presented data indicate that the method used to express cruzipain in BL21 was efficient, producing a satisfactory quantity of secretomes. The steps were considered effective to achieve this result. The methods are considered preliminary and require validation and additional tests to determine their effectiveness in detecting cruzipain in açai juice. However, the results obtained are promising and help to understand the properties of recombinant cruzipain in immunoassays and açai juice samples. It is important to emphasize that measures should be taken to preserve the protein integrity during the protein quantification process. The degradation of the used antibody affects the efficiency of the dot blot method.

Key-words: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. Immuno-enzymatic techniques. Cysteine proteases. Euterpe.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Breve histórico da doença de Chagas	12
1.2 Epidemiologia	13
1.3 <i>T. cruzi</i>	16
1.4 Triatomíneos: Transmissão vetorial	18
1.5 Outras formas de transmissão	21
1.6 Transmissão oral da doença de Chagas	22
1.7 Mecanismo de invasão da mucosa gástrica pelo <i>T. cruzi</i>	24
1.8 Açaí (<i>Euterpe oleraceae</i>)	26
1.9 Diagnóstico para doença de Chagas em humanos e em alimentos	27
1.10 Ensaio imunoenzimático	29
1.11 Cruzipaína	30
2.JUSTIFICATIVAS	32
3.OBJETIVO	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. ETAPA 1 – METACICLOGÊNESE	35
4.1.1 Metaciclogênese induzida <i>in vitro</i>	35
4.2. ETAPA 2. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS SECRETOMAS	37
4.2.1 Análise dos secretomas por Bradford	37
4.2.2 Análise dos secretomas por SDS – PAGE	37
4.2.3 Análise dos secretomas por <i>Dot Blot</i>	38
4.3 ETAPA 3. AVALIAÇÃO DOS SECRETOMAS EM SUCO DE AÇAÍ	39
4.3.1 Contaminação do suco de açaí para análise de cruzipaína	40
4.4 ETAPA 4 – CRUZIPAÍNA	41
4.4.1 Produção da cruzipaína	41
4.4.2 Produção de células competentes <i>E. coli</i> Bl21	42
4.4.3 Transformação de células	42
4.4.4 Pré-inóculo	43
4.4.5 Expressão	43
4.4.6 Análise da expressão por <i>Western blot</i>	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 BRADFORD E SDS-PAGE	46
5.2 <i>Western blot</i>	48
5.3 DOT BLOT	50
5.3.1 <i>Dot blot</i> com anticorpo policlonal anti-cruzipaína	51
6. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXO I – PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Registro histórico da menina Berenice.....	12
Figura 2. Morfologia das três formas principais do protozoário <i>T. cruzi</i>	17
Figura 3. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> no vetor e em humanos.....	18
Figura 4. Principais gêneros de importância epidemiológica para a transmissão da doença de Chagas.....	19
Figura 5. Programas regionais de controle iniciados nos anos 1990-2000.....	20
Figura 6. Açaí sendo despulpado em máquina própria nas ruas de Belém – Pará.....	22
Figura 7. Modelo esquemático da interação das formas metacíclicas do <i>T. cruzi</i> com componentes gástricos após infecção oral.....	25
Figura 8. Estrutura cristalográfica da cruzipaina	31
Figura 9. Mecanismo de invasão aumentada pela secreção de cruzipaina.....	32
Figura 10. Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil - sulfato de sódio (SDS – PAGE).....	38
Figura 11. Etapas do método <i>Dot blot</i>	39
Figura 12. Amostra sensibilizada na demarcação da membrana de nitrocelulose....	39
Figura 13. Técnica de tamisação forçada proposta por Passos e colaboradores em 2012.....	40
Figura 14. Mapa de plasmídeo.....	42
Figura 15. Constituição do “sanduiche” para transferência semi seca.....	46
Figura 16. A esquerda - Análise eletroforética de secretomas de <i>T. cruzi</i> em gel de poliacrilamida com.....	47
Figura 17. Resultados da eletroforese a esquerda e <i>Western blot</i> a direita, realizado nas amostras de.....	49
Figura 18. Resultados observados na técnica de <i>Dot blot</i> para diagnóstico de Chagas em humanos.....	50
Figura 19. Resultados observados na técnica de <i>Dot blot</i> com anticorpo primário policlonal anti-cruzipaina	51
Figura 20. Resultados observados na técnica de <i>Dot blot</i> com anticorpo primário policlonal anti-cruzipaina, utilizando a amostra de cruzipaina expressa por Bl21....	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico da doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma enfermidade infecciosa causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (TEIXEIRA et al., 2006). Ela foi descrita pelo médico brasileiro sanitarista Carlos Chagas, durante sua pesquisa em Lassance Minas Gerais, Brasil. A descrição da doença de Chagas teve início no ano 1908, quando Chagas estudava insetos hematófagos encontrado nas frestas das casas de pau-a-pique, alimentavam-se no período noturno, e picava sobretudo o rosto dos moradores do vilarejo. Examinando o intestino desses insetos, ele identifica formas flageladas de um protozoário, fazendo posteriormente estudos da contaminação em animais e em seres humanos (COURA; & BORGES-PEREIRA, 1997; DIAS, 2009).

Em 14 de fevereiro de 1909, Carlos Chagas consultou o que seria o primeiro caso clínico da doença de Chagas, uma criança de apenas 2 anos de idade chamada Berenice (figura 1), a menina apresentava febre alta, hepatoesplenomegalia, edema orbito-facial e presença do parasito no sangue. Logo a descrição ganhou atenção internacional, pois uma nova doença que afligia seres humanos tinha sido identificada, o pesquisador havia percorrido um caminho incomum até a doença, identificando antes a causa e a forma que é transmitida. Berenice participou de estudos clínicos dos 55 aos 71 anos, viveu até seus 73 anos assintomática vindo a óbito por insuficiência cardíaca em 1981 (CHAGAS, 1909; SALGADO, 1980).

Figura 1. Registro histórico da menina Berenice. a – Berenice o primeiro caso registrado de doença de Chagas em uma criança de 2 anos de idade; b – jornal brasileiro relatando a doença de Chagas, Berenice à direita com 72 anos de idade.



Fonte: CHAGAS, 1916; Jornal da tarde, 7 de maio de 1979.

A história da doença de Chagas é baseada em dois fatores importantes que influenciam sua evolução: sua origem em regiões andinas pré-históricas e sua disseminação acelerada causada por mudanças socioeconômicas na América Latina no início do século XX. A hipótese clássica sugere que a doença surgiu a partir da domesticação de mamíferos por humanos pré-históricos nos Andes. Estudos paleoparasitológicos baseados em biologia molecular mostraram que o protozoário *T. cruzi* era ubíquo entre os humanos pré-históricos das Américas do Sul e do Norte, antecedendo os humanos no continente americano (FERREIRA et al., 2011).

Por outro lado, a epidemia da doença no início do século XX foi impulsionada pela acelerada urbanização regional decorrente das mudanças socioeconômicas ocorridas nas sociedades rurais latino-americanas no final do século XIX (COURA; e DIAS, 2009). A expansão das terras agrícolas, o desenvolvimento de novas técnicas agrícolas, a construção de barragens e represas e a construção de novas estradas e ferrovias foram fatores que causaram a migração da população rural para a urbana e contribuíram para a disseminação da doença Chagas. Essas mudanças nas comunidades rurais da América Latina facilitaram a disseminação da doença de Chagas da doença rural para a urbana (COURA; e DIAS, 2009).

Atualmente, a doença de Chagas é uma preocupação global de saúde pública, com uma crescente preocupação sobre a sua transmissão para outras partes do mundo. Embora tenham ocorrido avanços significativos na prevenção e no controle da doença nas últimas décadas, a falta de investimento e pesquisa em medicamentos e vacinas continua sendo um obstáculo significativo para o seu controle e erradicação (WHO, 2020).

Portanto, a história da doença de Chagas oferece uma lição importante sobre como as mudanças sociais e ambientais podem impactar a saúde pública. É crucial que a prevenção e o controle da doença sejam abordados não apenas com foco no controle vetorial, mas também por meio de uma abordagem multidisciplinar que inclua investimentos em pesquisa, desenvolvimento de medicamentos e vacinas, além de intervenções na área da saúde pública e educação sanitária.

1.2 Epidemiologia

A doença de Chagas é uma antroponose que historicamente tem afetado predominantemente as populações rurais, devido às características de seus vetores e reservatórios (COURA; & BORGES-PEREIRA, 1997). Entretanto, a crescente urbanização e a degradação ambiental têm exposto cada vez mais as pessoas das áreas urbanas ao risco de infecção por essa doença negligenciada (DIAS, 2009). A doença de Chagas afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, com maior incidência na América Latina, assim como a possibilidade de 70 milhões de pessoas correrem o risco de contrair a doença de Chagas e em sua maioria por via oral (PAHO; WHO, 2019).

As doenças negligenciadas são um conjunto de enfermidades tropicais endêmicas, prioritariamente entre populações pobres da América Latina, Ásia e África. Medidas de prevenção e tratamento medicamentosos para a maioria dessas doenças são conhecidas, porém são indisponíveis para as áreas mais pobres do mundo. A preocupação se dá pelo fato das doenças negligenciadas tornarem outras doenças como a Aids sigla em inglês para (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e tuberculose ainda mais letais. A Organização Mundial da Saúde considera DTNs além da doença de Chagas, a úlcera de Buruli, cisticercose, dengue, dracunculíase, equinococose, fasciolíase, tripanossomíase africana, leishmaniose, lepra, filariase linfática, oncocercíase, raiva, esquistossomose, as parasitoses, o tracoma e a boubá (BRASIL, 2010). Ocorre em 21 países da América Latina. Colocando em risco populações em alta vulnerabilidade socioeconômica, afeta grupos com instabilidade financeira, muitas vezes ligados a trabalhos sazonais, coincidindo com outras doenças emergentes e reemergentes (WHO, 2003).

De acordo com o DATASUS (BRASIL, 2021), a transmissão oral da doença de Chagas foi relatada em vários estados do Brasil de 2008 a 2017. Notadamente, a maioria (95%) dessas ocorrências foi registrada na região norte do país, com destaque para o estado do Pará, que respondeu por 83% das notificações. Durante o período de análise, 72% dos casos foram de transmissão oral, dos quais 9% foram transmitidos por triatomíneos e 18% não puderam ser definidos por qualquer meio de transmissão. Esses dados destacam a importância da vigilância epidemiológica e de medidas preventivas para evitar a transmissão oral da doença de Chagas, principalmente em áreas onde a infecção é mais comum.

A doença de Chagas, causada pode afetar seriamente a saúde dos indivíduos infectados. Cerca de 20 a 30% das pessoas infectadas desenvolvem formas crônicas da

doença que podem afetar o coração (causando insuficiência cardíaca congestiva, aumento cardíaco e coágulos sanguíneos), o trato gastrointestinal (causando megaesôfago e megacólon) ou uma combinação. Pode ser fatal em todos os casos. A doença ainda pode permanecer assintomática por muitos anos, o que pode prejudicar gravemente a atividade profissional do paciente e, em casos graves, reduzir sua capacidade de trabalho (WHO, 2021; RASSI JR et al., 2010; BERN et al., 2011).

Em 2020 houve 146 casos confirmados de doença de Chagas no Brasil, com taxa de letalidade de 2%. As mortes ocorreram no estado do Pará. A maioria dos casos envolveu homens e cerca de 6% das mulheres estavam grávidas. Em relação à raça/cor, 85% dos casos suspeitos se declararam pardos. Sendo a homens jovens a maior proporção de pacientes com doença de Chagas. O modo de transmissão registrado com mais frequência foi a via oral, seguido por modos de transmissão negligenciados, sem possível fonte de infecção identificada (BRASIL, 2021).

O Brasil é um dos principais cenários endêmicos da doença de Chagas na atualidade e o Sistema Único de Saúde (SUS) é o órgão responsável pela prevenção, controle, diagnóstico e tratamento da doença, que fundamenta seus valores e alicerça programas e políticas em saúde pública, utilizando principalmente da atenção primária. O SUS encontra dificuldades não somente em relação à doença de Chagas, como também com outras doenças emergentes. Existem fragilidades institucionais na atenção primária, pois as unidades carecem de infraestrutura adequada, possuem baixa densidade tecnológica, e deficiência no apoio diagnóstico (DIAS et al., 2015; MENDES, 2019).

Atualmente, os únicos medicamentos disponíveis pelo SUS para o tratamento da doença de Chagas no Brasil é o benzimidazol, outro medicamento utilizado é o nifurtimox sendo esse o único tratamento aprovado nos Estados Unidos. Esses dois compostos são tóxicos e podem causar efeitos colaterais graves que requerem supervisão médica, podendo causar febre, linfadenopatia, dores articulares e musculares e púrpura trombocitopênica. O nifurtimox também apresenta efeitos colaterais graves, como perda de peso, neuropatia periférica, erupção cutânea, psicose, náusea e vômito e leucopenia. Os estudos de toxicidade do nifurtimox observaram neurotoxicidade, dano testicular e ovariano e efeitos adversos nos tecidos adrenal, cólon, esôfago e mama. Ambas as drogas são potencialmente mutagênicas e carcinogênicas (RASSI et al, 2002).

A baixa eficácia do tratamento está relacionada ao fato de *T. cruzi* ser um parasita intracelular, o que representa um desafio adicional para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois eles devem ser capazes de atravessar a membrana plasmática da célula do hospedeiro para chegar ao parasito. Assim, mais de cem anos após a identificação de *T. cruzi* a terapêutica permanecer parcialmente ineficaz, leva a toxicidade inaceitável, resistência a medicamentos, longas internações hospitalares e altos custos para o paciente (COURA, 2002).

Apesar dos desafios para o desenvolvimento de novas drogas eficazes contra *T. cruzi*, as pesquisas científicas continuam avançando na busca de soluções. Novas abordagens terapêuticas, como a terapia medicamentosa combinada e o uso de terapias baseadas em anticorpos, têm mostrado resultados promissores em estudos pré-clínicos e clínicos (BUSTAMANTE et al., 2014; FRANCO et al., 2019). Além disso, ações preventivas, diagnóstico precoce e tratamento adequado são essenciais para reduzir a incidência da doença de Chagas e controlar a transmissão de *T. cruzi* (GASPE et al., 2010). Ainda há um longo caminho a percorrer, mas com o avanço da ciência e a cooperação de todos os setores da sociedade, a erradicação dessa doença pode ser possível no futuro (OMS, 2020).

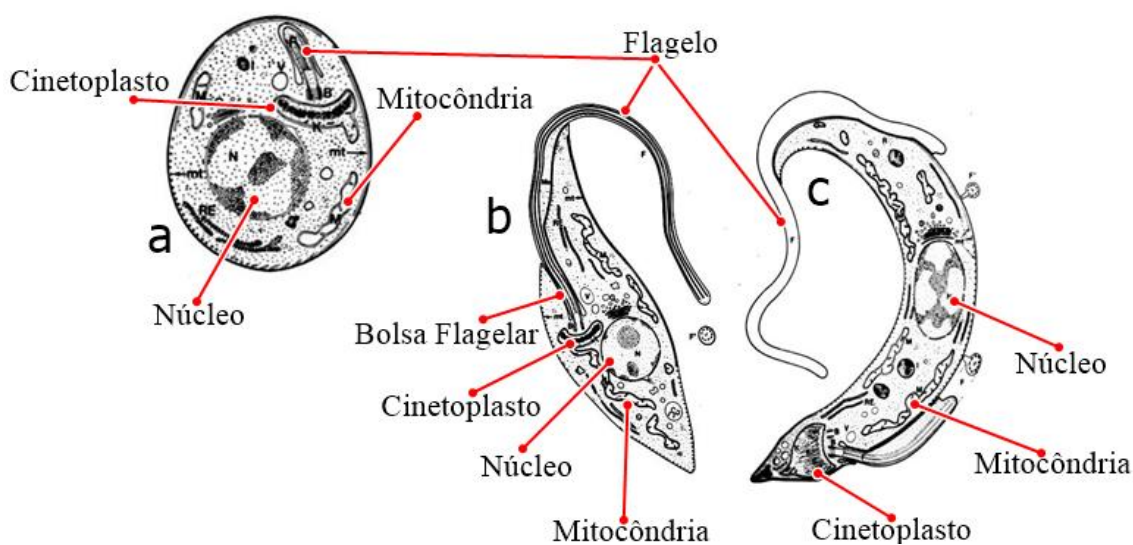
1.3 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é um protozoário flagelado do gênero *Trypanosoma* classe Kinetoplastea e família Trypanosomatidae, que primariamente circula no ambiente silvestre entre mamíferos e seus vetores triatomíneos, no entanto podem ser encontrados em áreas rurais, periurbanas e urbanas. Qualquer mamífero pode transportar o parasita, sendo os principais reservatórios do ciclo natural os gambás, tatus, cães, gatos, ratos, etc. No ambiente doméstico, como as habitações humanas estão próximas aos ambientes silvestres, os reservatórios são humanos e mamíferos domesticados ou sinantrópicos como cães, gatos, ratos e porcos (FERNANDES et al., 1993).

T. cruzi é um dos parasitos mais bem sucedidos em relação a sua distribuição na natureza pela sua capacidade de infectar um amplo espectro de mamíferos distribuídos em oito ordens, além de sua variabilidade genética intraespecífica devido a uma evolução clonal antiga e independente (TIBAYRENC; AYALA, 1988).

Os membros da família Trypanosomatidae são caracterizados por possuírem um único flagelo que lhes permite se mover em meio ao sangue e outros fluidos, além do cinetoplasto, uma organela que contém DNA e está localizada na mitocôndria (BRENER, 1973). Se apresenta predominantemente sob três formas, as quais são identificadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e do flagelo (figura 2) (DIAS, 2011; SOUZA, 2017).

Figura 2. Formas sob as quais *T. cruzi* se apresenta: a) amastigota; b) epimastigota; c) tripomastigotas.



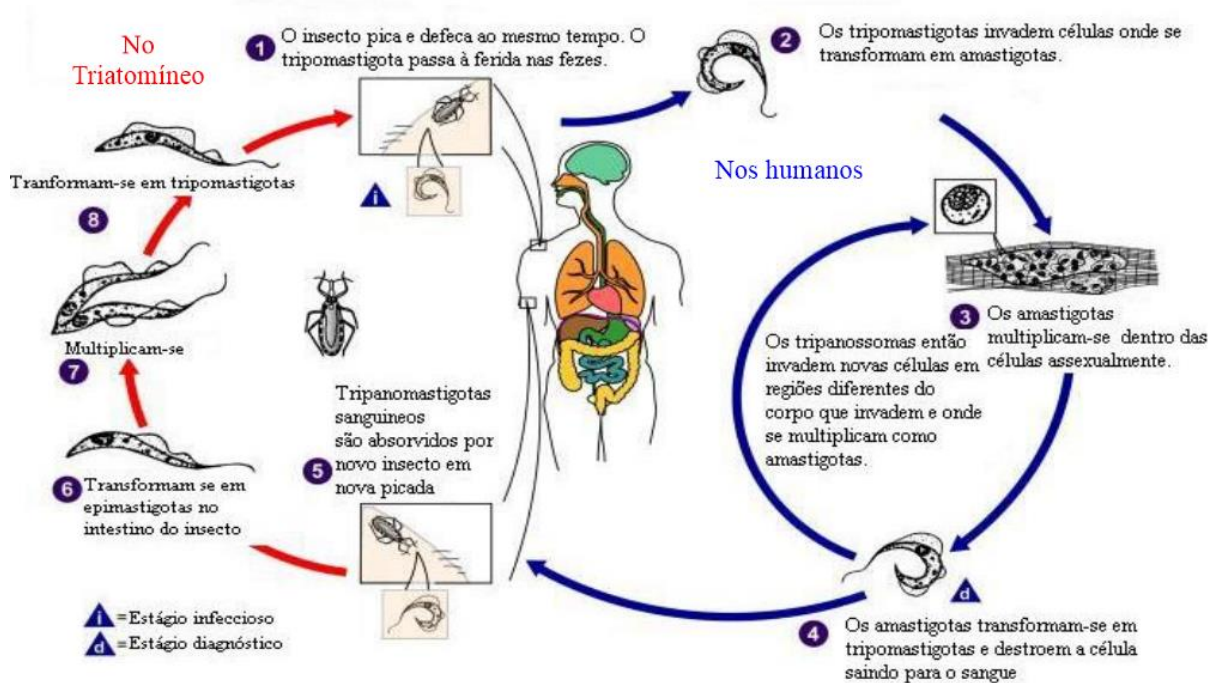
Fonte: Modificado de GUZMÁN-MARÍN., et al (1998).

Na forma tripomastigota o cinetoplasto encontra-se na parte posterior do flagelado, em posição terminal ou subterminal, emergindo o flagelo da bolsa flagelar próxima ao cinetoplasto. Apresenta-se morfológicamente alongada podendo ser finas e largas, fusiforme (em forma de S ou C), possui membrana ondulante, infectante para mamíferos e não se reproduz (NOGUEIRA, 2015; CARVALHO, 2017).

Na forma epimastigota, o cinetoplasto e a bolsa flagelar estão em posição anterior ao núcleo. Apresenta-se morfológicamente mais alongada, possui membrana ondulante, encontrado no tubo digestório dos triatomíneos e em culturas axênicas, com reprodução assexuada por divisão binária. As formas amastigotas são organismos intracelulares arredondados ou oval que apresentam inconspícuo flagelos exteriorizados, se reproduz assexuadamente e encontra-se na fase crônica da doença (NOGUEIRA, 2015; CARVALHO, 2017).

A forma epimastigota presente no tubo digestório dos triatomíneos ao atingir a porção retal se diferencia na forma tripomastigota metacíclica por um processo denominado metaciclogênese. Essa forma é altamente infecciosa e é expelida pelas fezes dos triatomíneos. A forma tripomastigota de *T. cruzi* que circula no sangue dos mamíferos infecta células do sistema fagocítico mononuclear e se diferencia em amastigota. As formas amastigotas se multiplicam intensamente até romper as células e ao invadirem a corrente sanguínea transformam-se em tripomastigotas para infectar mais células e dar continuidade ao ciclo de vida do parasito (figura 3) (NOGUEIRA, 2015; CARVALHO, 2017).

Figura 3. Ciclo biológico de *T. cruzi* no vetor e em humanos.



Fonte: Modificado da CDC (2009).

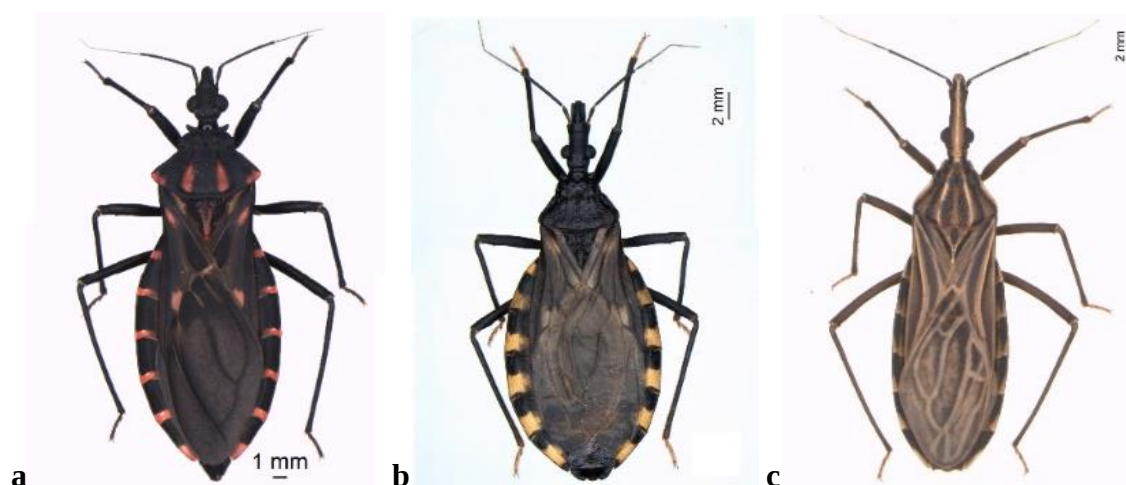
O conhecimento sobre os aspectos morfológicos e o ciclo de vida do *T. cruzi* é essencial para a compreensão da biologia e patogênese da doença de Chagas. O controle e a prevenção da doença dependem de medidas que visem interromper o ciclo de vida do parasita, como o controle do inseto vetor, além do desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da doença.

1.4 Triatomíneos: Transmissão vetorial

Os triatomíneos popularmente conhecidos como “barbeiros”, são insetos hematófagos, pertencentes a ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (LENT; & WYGODZINSKY, 1979). Embora todas as espécies sejam potenciais vetores de *T. cruzi*, os que reúnem condições para serem transmissores da doença de Chagas, são aqueles que colonizam domicílios ou peridomicílios. Dentre os triatomíneos, os gêneros de maior importância para o cenário epidemiológico atual são: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (figura 4) (DIAS, 2011).

Os três gêneros epidemiologicamente importantes podem ser distinguidos entre si pelo tubérculo da antena (onde as antenas se fixam na cabeça), no *Triatoma* a cabeça é de tamanho médio e as antenas estão localizadas a meio caminho entre os olhos e a coroa da cabeça, a cabeça do gênero *Panstrongylus* é um "tubo" curto, as antenas estão localizadas na frente dos olhos, a cabeça do gênero *Rhodnius* é alongada e as antenas estão localizadas próximas ao topo da cabeça (BRENNER, 1988).

Figura 4. Principais gêneros de importância epidemiológica para a transmissão da doença de Chagas. **a** - Gênero *Panstrongylus*: *P. megistus* **b** – Gênero *Triatoma*: *T. infestans* **c** – Gênero *Rhodnius*: *R. robustus*



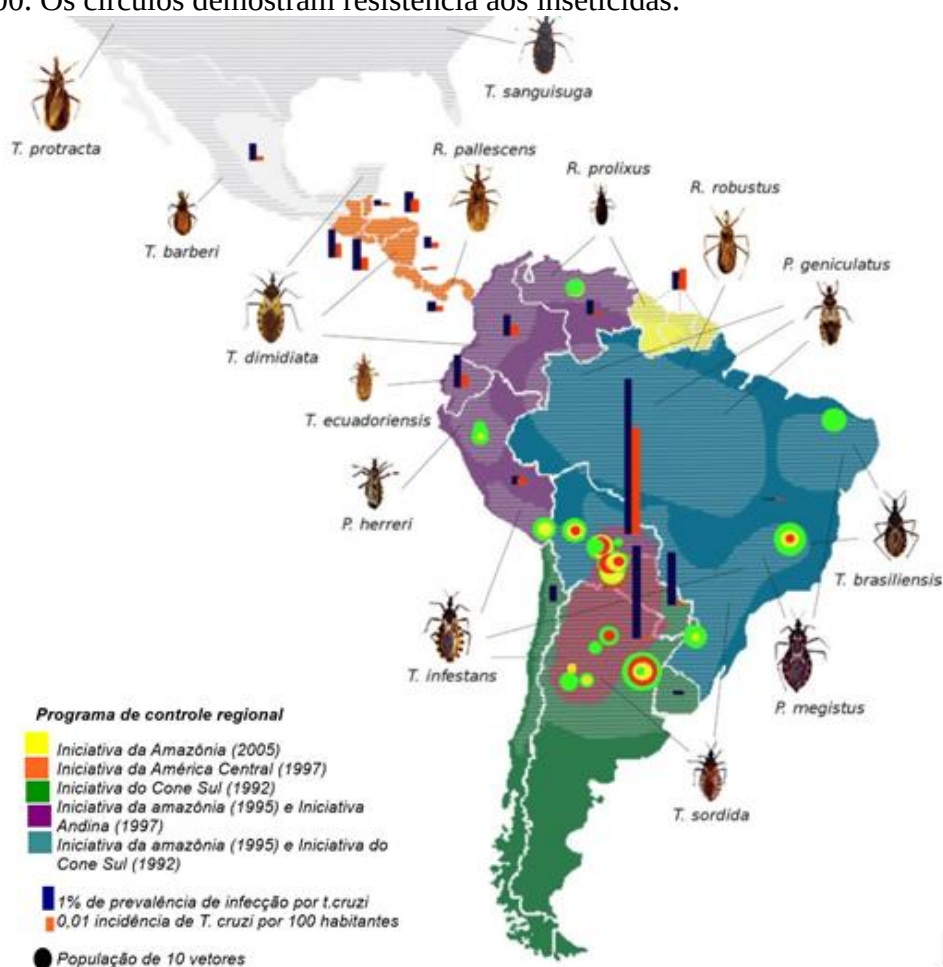
Fonte: Coleção de Triatominae Unesp Araraquara (2020).

Entre 1990 e 2000, governos e autoridades em saúde voltaram seus esforços em programas para o controle dos vetores da doença de Chagas, obtiveram sucesso significativo, reduzindo o impacto da transmissão por triatomíneos em até 80%. Assim uma grande área da América do Sul como: Brasil, Chile, Uruguai, em regiões da Argentina, Bolívia, Paraguai e América Central, foi certificada pela Organização Pan-

Americana da Saúde (OPAS) quanto ao controle do principal vetor da doença de Chagas: *Triatoma infestans* (DIAS et al., 2002; SALERNO et al., 2015).

A partir de então o manejo de vetores passou ser efetuado por meio de controle químico a partir de inseticidas de ação residual, tanto no intradomicílio quanto peridomicílio, de forma periódica e sistemática. Porém, o uso rotineiro do mesmo composto, acaba selecionando vetores mais resistentes, criando assim ao decorrer de décadas de controle a resistência de triatomíneos aos inseticidas (figura 5) (NAUEN, 2007; WHO, 1957; WHO, 1992).

Figura 5. Programas regionais de controle de triatomíneos iniciados nos anos 1990-2000. Os círculos demonstram resistência aos inseticidas.



Fonte: Modificado de Flores-Ferrer (2017).

É importante ressaltar que o uso indiscriminado de inseticidas pode levar à resistência do vetor, dificultando o controle da doença de Chagas (DIAS et al., 2018). Portanto, além do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratar a doença (MOLINA et al., 2014), é necessário um manejo integrado e sustentável para controle de

triatomíneos, incluindo medidas eficazes de prevenção e vigilância (MONCAYO et al., 2003). O avanço do conhecimento científico e a colaboração entre os setores da saúde e da pesquisa são fundamentais para o combate e erradicação da doença de Chagas (COURA et al., 2009).

1.5 Outras formas de transmissão

A transmissibilidade de *T. cruzi* é considerada alta, uma vez que o protozoário se diferencia para atingir o hospedeiro definitivo e completar o ciclo biológico. O mecanismo de transmissão vetorial é pelas fezes do triatomíneo que ao defecarem após o repasto, levando as formas infectantes de *T. cruzi* das fezes para o local da picada pelo ato de coçar (MASSAD, 2007).

Outro mecanismo de transmissão com importância epidemiológica, a forma congênita, foi descrita no ano de 1911 por Carlos Chagas e em 1919-22 esse mecanismo foi estudado em nível experimental. A transmissão por transfusão de sangue foi descrita entre os anos de 1935-44, onde é novamente mencionada a transmissão por via oral e leite materno (DIAS et al., 1999).

A infecção por via transfusional, pode ocorrer por falhas no processo de triagem de pacientes e análise e processamento do sangue doado. Considerada ainda como importante causa em países não endêmicos (Canadá, Espanha, EUA e outros) e em países que estejam em processo de controle da transmissão por via vetorial. A forma congênita ou vertical também entra para a lista das formas mais infectantes, passando a infecção da gestante para o feto por via transplacentária em qualquer fase da doença (DIAS et al., 1998; CASTRO et al., 2016).

Existem vias com mecanismos de transmissão menos comuns, no caso do leite materno, podendo ocorrer a transmissão por meio da ingestão do leite contaminado pelo recém-nascido ou por fissura mamilar (TORRICO, 2004; GONTIJO, 2009).

A literatura apresenta como forma de contaminação acidentes laboratoriais, onde o pesquisador fica exposto a fezes de triatomíneos ou sangue de mamíferos contaminados. Existe a possibilidade de transmissibilidade por meio de transplantes de órgãos e tecidos humanos o que facilita a infectividade se o paciente estiver imunocomprometido, assim como por meio de secreções no ato da relação sexual sem uso de preservativo, oriundos de microfissuras e sangramentos (DIAS et al., 2011).

Compreender as diferentes formas de transmissão da Doença de Chagas é essencial para a prevenção e controle da doença. Por isso, é fundamental que sejam adotadas medidas de prevenção adequadas para cada uma dessas vias, como uso de repelentes, triagem de doadores de sangue, órgãos e tecidos, além da garantia da qualidade sanitária dos alimentos (WHO, 2020). A adoção dessas medidas pode ajudar a reduzir a incidência da Doença de Chagas e, conseqüentemente, contribuir para melhorar a saúde pública em nível mundial.

1.6 Transmissão oral da doença de Chagas

A transmissão oral da doença de Chagas foi verificada no ano de 1921, por meio de modelos experimentais, quando foi testada a capacidade de mamíferos se infectarem com fezes de triatomíneos (NATTAN-LARRIER, 1921). Os primeiros casos humanos da doença de Chagas por veiculação oral no Brasil foram identificados no ano de 1960 no Rio Grande do Sul, posteriormente no Pará, Paraíba, regiões amazônicas, Santa Catarina, Bahia e Ceará (DIAS et al., 2011).

Atualmente a transmissão oral representam um grande problema de saúde pública e ocorrem pelo consumo de alimentos contaminados, em que triatomíneos são triturados durante o processamento dos frutos (figura 6), como por exemplo o açaí (*Euterpe oleracea*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinalis*) e bacaba (*Oenocarpus bacaba*) entre outras. Outra possibilidade é a contaminação de frutos ou alimentos por meio das fezes de triatomíneos positivos para *T. cruzi*, ou ainda a contaminação pelas secreções anais de marsupiais (SHIKANAI-YASUDA et al., 2012; PASSOS et al., 2012; SANTANA et al., 2019).

Figura 6. Açaí sendo despulpado em máquina própria nas ruas de Belém – Pará.



Fonte: Yokota (2004).

O primeiro surto por transmissão oral da doença de Chagas ocorreu no ano de 1968 em Estrela (Rio Grande do Sul) em uma escola agrícola, a suspeita foi de alimentos contaminados, nessa ocasião 17 alunos apresentaram quadro agudo da doença e seis vieram a óbito. Um segundo surto aconteceu em Catolé (Paraíba) atingindo 26 pessoas onde uma veio a óbito. Em março de 2005 constatou-se um novo surto da doença de Chagas na região litorânea de Santa Catarina, 26 pessoas foram contaminadas ao ingerir caldo de cana em um quiosque, o que resultou em três mortes, entre outros casos envolvendo contaminação de alimentos por triatomíneos levando a transmissão da doença de Chagas (STEINDEL et al, 2015).

Há mais de um século, a literatura científica aponta que os triatomíneos são hematófagos estritos, porém uma pesquisa Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) mostrou que esses insetos podem também se alimentar de frutos, a alimentação fitófaga de forma complementar à ingestão de sangue traz benefícios, como por exemplo o aumento da expectativa de vida promovendo nutrientes, hidratação prolongando a vida desses insetos nos períodos de jejum. Sabe-se que o hábito fitófago não é suficiente como fonte de alimentação dos triatomíneos, tendo em vista que eles não conseguiriam atravessar todas as suas fases de desenvolvimento sem a ingestão de sangue. Buscar por nutrientes de origem vegetal pode estar associado com a escolha do inseto pelo habitat, o que pode levar esses triatomíneos a serem encontrados junto com frutos (DÍAZ-ALBITER et al; 2016).

Não existe relação direta entre o açaí e *T. cruzi*, ele pode ser levado até o suco pela maceração do triatomíneo nos batedores de açaí ou através das fezes dos insetos nesses frutos. Pode-se destacar nessa situação o cuidado que se tem no manejo e preparo desse alimento, sendo que a falta de inspeção e higienização na manipulação pode aumentar o risco de contaminação (DÍAZ-ALBITER et al; 2016).

A prevenção da transmissão oral da doença de Chagas é uma questão complexa que envolve segurança e higiene alimentar, melhoria do saneamento e das condições de vida em áreas endêmicas, monitoramento e controle de populações de tripanossomas e promoção de educação e conscientização pública sobre os riscos da transmissão oral (OMS, 2020). Além disso, o diagnóstico precoce e o tratamento da doença de Chagas são fundamentais para prevenir a disseminação da doença para outras pessoas (BERN; KJOS; & YABSLEY, 2011).

Detectar a transmissão oral da doença de Chagas é um desafio de saúde pública, pois muitos casos podem ser assintomáticos ou apresentar sintomas inespecíficos (CASTRO-SESQUEN et al., 2013). Portanto, o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos para a detecção da transmissão oral é fundamental para melhor identificação e controle da doença (SCHIJMAN et al., 2011).

O envolvimento da comunidade e o apoio das autoridades locais são essenciais para a prevenção e controle da transmissão oral da doença de Chagas (BERN; KJOS; & YABSLEY, 2011). A conscientização da população sobre a importância de medidas preventivas, como a segurança alimentar e o controle de insetos vetores, pode ajudar a reduzir o risco de transmissão oral da doença de Chagas (WHO, 2020).

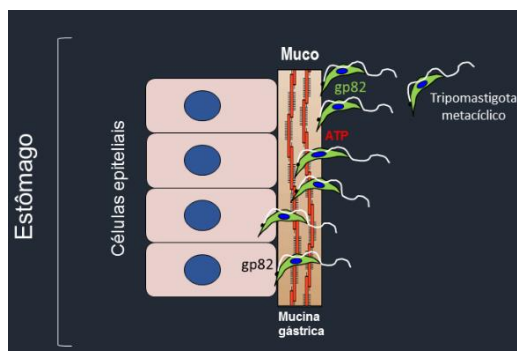
1.7 Mecanismo de invasão da mucosa gástrica por *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi utiliza várias proteínas de superfície para penetrar e se disseminar dentro das células do hospedeiro. Entre essas proteínas, destacam-se as GPs (proteínas de superfície do flagelo), como a GP82/GP90, que estão envolvidas na adesão e invasão de células do hospedeiro. Essas proteínas se ligam a receptores específicos na superfície celular do hospedeiro, desencadeando a internalização do parasita por endocitose. Outra família de GPs importante no processo de invasão celular é a Tc85, que além de estar envolvida na adesão e invasão celular, também atua na modulação da resposta imune do hospedeiro. A GP Tc52, por sua vez, está envolvida na ligação do parasita às células cardíacas, o que pode levar à miocardite e doença cardíaca crônica. Por fim, a GP TcD é fundamental para a sobrevivência do *T. cruzi* dentro das células do hospedeiro e na sua capacidade de se disseminar pelo organismo. Essa proteína está envolvida em diversos processos biológicos do parasita, como a regulação do pH interno e a modulação da resposta imune do hospedeiro (ANDREWS, 2012; BUSCAGLIA et al., 2015; CAMPOS, et al., 2015; SCHENKMAN et al., 2001).

A forma metacíclica de *T. cruzi* expressa uma molécula altamente glicosilada, semelhante à mucina, em sua superfície, que é altamente resistente à proteólise e, portanto, não é digerida pelos sucos gástricos. Para atingir suas células-alvo, o parasita deve ultrapassar a espessa camada de muco que protege a mucosa gástrica. Os principais componentes macromoleculares da mucosa gástrica são vários tipos de mucinas. A ligação seletiva da molécula de superfície metacíclica específica gp82 ao muco gástrico

é importante na orientação do parasita em direção ao seu alvo. O movimento subsequente da forma metacíclica através da camada de muco é impulsionado pelo ATP (adenosina trifosfato) (figura 7) (STAQUICINI et al., 2010).

Figura 7. Modelo esquemático da interação de formas metacíclica de *T. cruzi* com componentes gástricos após infecção oral. Os parasitas se ligam a mucina gástrica via gp82 e são impulsionados por ATP para atravessar a camada de muco e alcançar as células-alvo que invadem de maneira gp82-dependente.



Fonte: CARVALHO, 2017.

Os componentes envolvidos na infecção oral por *T. cruzi* foram demonstrados em modelos experimentais, sendo evidenciado que o parasita pode entrar em mamíferos através da mucosa gástrica. A forma tripomastigota de *T. cruzi* é capaz de invadir células epiteliais gástricas quando ingerida, processo que envolve interação com glicoproteínas de membrana estágio-específicas (gp82 e gp30) (HOLF, et al., 1996; STAQUICINI, et al., 2010).

Estudos de interação parasita-hospedeiro mostraram que gp82 e gp30 se ligam às células hospedeiras em um mecanismo mediado por receptor, desencadeando cascatas de sinalização intracelular em parasitas e células que desencadeiam a mobilização intracelular de Ca^{2+} , necessária para a internalização intracelular do parasita. No entanto, gp30 tem uma afinidade mais baixa para mucinas infecciosas do que gp82, *T. cruzi* sem gp82 é menos infeccioso apesar de expressar gp30 (STAQUICINI, et al., 2010; YOSHIDA, 2009; YOSHIDA, et al., 2011; CORTEZ, et al., 2003).

Como a gp82 é resistente aos sucos gástricos, foi demonstrado que parasitas expostos às condições do ambiente gástrico *in vivo* ou *in vitro* deixam a gp82 intacta e funcional quando tratados com pepsina em pH ácido. Outra glicoproteína estágio-

específica presente nos tripomastigotas, a gp90, também se liga a receptores da célula hospedeira, mas não leva a um aumento do cálcio intracelular que promove efeitos negativos na invasão. Portanto, cepas que expressam baixos níveis dessa molécula são mais infecciosas (MALAGA; YOSHIDA, 2001).

As características clínicas da fase aguda da doença de Chagas transmitida por via oral parecem ser mais graves do que aquelas observadas nas formas clássicas de infecção. Os doentes com infecções orais apresentam febre prolongada, cefaleias, tosse, edema facial, edema palpebral, edema dos membros inferiores, mialgia, dor abdominal, meningoencefalite e miocardite grave, sendo, portanto, a contaminação oral mais letal que a forma clássica vetorial (RUEDA, et al., 2014; SHIKANAI-YASUDA, 2012, TOSO, et al., 2011).

Portanto, a capacidade do parasito *T. cruzi* de invadir células epiteliais gástricas e se disseminar pelo corpo pode ter implicações importantes para o controle e prevenção da doença de Chagas.

1.8 Açaí (*Euterpe oleraceae*)

O fruto açaí são drupas globosas ou levemente depressas, possui coloração violácea a roxa quando maduros, ricos em proteínas, fibras, lipídios, vitaminas, minerais, elevado teor de antocianinas, flavonoides e antioxidantes. O fruto não é costumeiramente consumido *in natura*, necessita ser processado para ser despulpado com adição de água, produzindo uma bebida (suco) espessa, roxa, cremosa, com aparência oleosa e sabor característico (ROGEZ, 2000).

O açaí é o fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) (EMBRAPA, 2013), originário da região amazônica, de grande importância social, econômica e cultural na região Norte do Brasil (FERREIRA et al., 2019) e é um dos três principais fornecedores do coração da palma (LEMOS et al., 2015). Embora o açaí esteja disponível inteiro, seus frutos se destacam e são utilizados como alimento pelos povos da Amazônia desde os tempos pré-colombianos, fazendo parte da alimentação diária das pessoas até hoje. Uma variedade de brasileiros, muitos deles às vezes fazem dela sua única refeição do dia devido ao seu preço acessível e alto valor nutricional (DANTAS et al., 2014). Nessa região, é comercializado e consumido imediatamente após o processamento, sem qualquer tratamento térmico (EMBRAPA, 2013).

O reconhecimento do açaí como fonte alimentar de alto valor nutricional ultrapassou as fronteiras da região amazônica e atualmente é comercializado nas principais capitais do Brasil nas mais diversas formas, como sorvetes, picolés e alimentos energéticos e geleias (FERREIRA; & MONTEIRO, 2018). Diante da expansão comercial do Brasil, os produtores de açaí exportam sua polpa como fruta exótica e de alto valor nutricional para países como Japão, Estados Unidos, China e Europa continental (FERREIRA; & MONTEIRO, 2018).

Portanto, a implementação de medidas rigorosas de higiene é essencial para garantir a segurança alimentar e evitar a contaminação por *T. cruzi* e outras doenças transmitidas por alimentos (BRASIL, 2009). Para o açaí, produtores e comerciantes devem aplicar boas práticas de higiene em todas as etapas do processo de produção, desde a colheita até o processamento, armazenamento e transporte do produto.

Algumas medidas importantes incluem o uso de equipamentos e utensílios devidamente higienizados, a implementação de protocolos de limpeza e higienização de áreas e equipamentos, o controle de pragas e vetores e o treinamento de boas práticas de higiene dos funcionários (BRASIL, 2009).

Além disso, os consumidores também desempenham um papel importante na prevenção da contaminação. Devem conhecer a origem e o processamento do açaí que consomem e escolher produtos devidamente processados e armazenados em condições adequadas de higiene e segurança. Ressalta-se que a contaminação por *T. cruzi* e outras doenças transmitidas por alimentos podem trazer prejuízos à saúde dos consumidores, além de prejuízos econômicos para produtores e comerciantes. Portanto, medidas rigorosas de saneamento são necessárias para garantir a segurança alimentar e a qualidade dos produtos exportados (BRASIL, 2009).

1.9 Diagnóstico para doença de Chagas em humanos e em alimentos

O teste de Chagas a fresco é um teste sorológico que utiliza técnicas microscópicas para detectar a presença do parasita *T. cruzi*. Neste teste, uma amostra de sangue é colocada em uma lâmina de vidro e examinada ao microscópio. A presença do parasita é confirmada pela observação direta de seus movimentos rápidos e característicos. O teste é considerado rápido e sensível, sendo recomendada a coleta de sangue até 30 dias após o início dos sintomas em pacientes com suspeita da doença. Se a primeira amostra der

resultado negativo, recomenda-se coletar uma segunda amostra dentro de 12-24 horas (FOCACCIA, 2014; BRASIL, 2017).

Segundo BONNEY et al. (2017), o método focalizado, também conhecido como strout, microhematócrito ou *buffy coat*, é um teste de diagnóstico que utiliza uma técnica de centrifugação para separar as células sanguíneas do plasma. Uma pequena camada de glóbulos brancos, conhecida como "camada leucocitária", é então removida e examinada ao microscópio. Este método pode detectar a presença de parasitas causadores da doença de Chagas com alta sensibilidade e é especialmente recomendado quando outros testes são negativos. No entanto, para aumentar a precisão diagnóstica, é comum realizar métodos focados em combinação com outras investigações, como uso de lâminas grossas coradas ou esfregaços de sangue (BONNEY et al., 2017).

O método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é amplamente utilizado no diagnóstico da doença de Chagas, consistindo na amplificação seletiva da sequência de uma determinada região do DNA de *T. cruzi*. Compreender a diversidade genética do parasita é crucial para pesquisas epidemiológicas, estudos biológicos, diagnóstico e evolução do processo. Por meio da técnica de PCR, é possível detectar DTUs (Discrete Typing Units) de *T. cruzi*, são classificadas em sete unidades taxonômicas, como TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e TcBat (LEWIS et al., 2009; ZINGALES et al., 2009). A utilização dessa técnica permite uma melhor compreensão da diversidade genética do *T. cruzi* e ajuda a identificar a origem e a distribuição das diferentes cepas do parasita.

Nos estágios intermediários da doença de Chagas, os parasitas estão presentes no sangue e podem causar uma série de sintomas graves. O diagnóstico precoce é importante para prevenir a progressão da doença e complicações. Existem vários métodos de diagnóstico para detectar parasitas nesta fase. Dentre elas, estão as técnicas diagnósticas heterogêneas, consideradas métodos de referência para o diagnóstico da doença na fase aguda com alta sensibilidade e especificidade (BRASIL, 2013).

No entanto, o xenodiagnóstico é um método complexo e demorado que requer condições técnicas adequadas. Além disso, são invasivos e podem ser desconfortáveis para os pacientes, o que limita seu uso generalizado. Por outro lado, a hemocultura é um método mais simples e menos invasivo de hemocultura em meio específico para a detecção do parasito *T. cruzi*. No entanto, as hemoculturas são menos sensíveis do que o xenodiagnóstico e podem ocorrer resultados falso-negativos, especialmente em pacientes

com parasitemia reduzida. Portanto, uma combinação de diferentes técnicas é recomendada para o diagnóstico da doença de Chagas no estágio intermediário para melhorar a precisão e reduzir o risco de resultados falsos negativos (BRASIL, 2013; COURA e VIÑAS, 2010).

Na fase crônica da doença de Chagas a parasitemia é considerada baixa e intermitente, o que gera problemas com as técnicas moleculares, exigindo a combinação de vários marcadores genéticos, além de ter uma sensibilidade muito limitada (SULLEIRO et al, 2020). Para superar essas deficiências os testes sorológicos como Imunofluorescência Indireta (IFI), Hemaglutinação Indireta (HAI) e enzimas ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) são utilizados, tendo alto desempenho no diagnóstico na fase crônica, pois nesse período os anticorpos marcadores para esse tipo de teste estão elevados (ALVEZ et al, 2018; BHATTACHARYYA et al, 2010).

O método de PCR que seria fundamental para o diagnóstico na fase aguda da doença de Chagas ainda não tem aplicabilidade comercial, pois necessita de profissionais habilitados, laboratório com alta tecnologia com espaço exclusivo para sua realização, e por ainda ser de alto custo. Os testes parasitológicos diretos são comumente utilizados na fase aguda da doença de Chagas que são testes tradicionais por serem mais acessíveis e por ter menor custo (ALEVZ et al, 2018).

O método de PCR é usualmente utilizado para detecção de *T. cruzi* em alimentos à base de açaí, sendo padronizado pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), consiste em uma técnica de amplificação exponencial dos ácidos nucleicos por eletroforese em gel de agorose ou poliacrilamida, amplificando uma fita específica DNA/cDNA (SCHIJMAN et al., 2011; GILBER, et al., 2013).

Em estudos realizados por Mattos em 2017, os autores mostram a detecção de *T. cruzi* por meio de amostras sorológicas nas fezes de triatomíneos. Neste trabalho pelo método de PCR convencional, utilizando especificamente a parte do sobrenadante, verificou-se a detecção da forma tripomastigota de *T. cruzi* em diluições de 1×10^4 e 1×10^1 . O método de qPCR atestou sensibilidade maior para sedimentos e menor para sobrenadantes.

1.10 Ensaio imunoenzimático

O ensaio imunoenzimático é comumente utilizado para detectar uma molécula ligante (geralmente proteína) em uma amostra líquida utilizando anticorpos específicos ligados a uma fase sólida. Esse tipo de ensaio depende de uma reação enzimática entre um marcador conjugado com enzima e um substrato afim de produzir um produto colorimétrico, quimioluminescente ou fluorescente, sendo detectados por meio de espectrofotômetro, sua intensidade é diretamente proporcional à quantidade de anticorpo específico presente na amostra, sendo comparados depois com uma curva padrão (WISDOM, 1976).

Dot blot é uma técnica imunológica rápida, simples e barata em comparação com outras técnicas imunológicas, como ELISA e *Western blot*. Dot blots também são caracterizados por um alto nível de sensibilidade que permite a detecção de antígenos de baixa abundância em amostras biológicas. Além disso, a técnica é prontamente adaptável para detectar diferentes antígenos em diferentes amostras biológicas, incluindo amostras clínicas e ambientais (CHEN et al., 2020, WANG et al., 2017).

A tecnologia de imunoensaio é amplamente utilizada para detectar substâncias específicas em amostras biológicas e pode ser utilizada em muitos campos, incluindo a segurança alimentar. Em seu trabalho, Meirelles (2006) deu vários exemplos de imunoensaios enzimáticos que podem ser usados para detectar fungos virulentos em alimentos. Este teste é baseado na interação entre anticorpos específicos de fungos e toxinas produzidas por fungos, permitindo a detecção oportuna e eficaz de contaminação em alimentos.

Adicionalmente, WU (2014) desenvolveu um método de detecção baseado em um marcador luminescente acoplado a um aptâmero, uma molécula que reconhece especificamente patógenos. Este método é usado para detectar *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella typhimurium* em amostras de alimentos. A vantagem desse método é que ele é rápido, sensível e específico, permitindo a detecção de patógenos com maior precisão e rapidez do que os métodos convencionais.

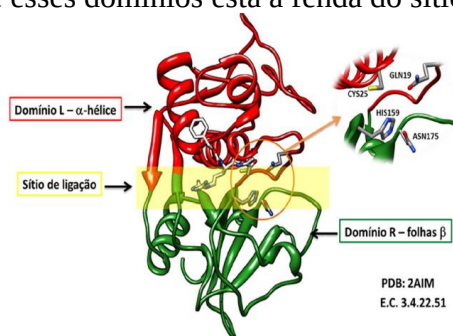
Em resumo, a tecnologia de imunoensaio é uma metodologia valiosa para triagem de segurança alimentar, que pode detectar com precisão a contaminação por patógenos e substâncias tóxicas nos alimentos.

1.11 Cruzipaína

A cruzipaina (também conhecida como cruzaína em sua forma recombinante, ou GP57/51) é uma enzima cisteína protease, ou seja, é uma enzima que quebra ligações peptídicas específicas entre aminoácidos em proteínas, capaz de quebrar proteínas da matriz extracelular, permitindo que o parasita se mova através dos tecidos. Apresenta peso molecular de 57 kDa altamente homóloga com a família de enzimas cathepsina, abundante em *T. cruzi*, porém sua extensão C-terminal é exclusiva de *Trypanosoma* sp., que representa funções essenciais nos processos de invasão e sobrevivência do parasito. Está presente em todas as formas do parasito, responsável por estimular respostas imunes humorais e celulares potentes em humanos e camundongos (SCHNAPP et al., 2002; CARZOLA, et al., 2015).

A cruzipaina consiste em uma cadeia polipeptídica de 215 resíduos de aminoácidos, envolve dois domínios diferentes, sendo o domínio L (helicoidal), e o domínio R constituído por folhas β antiparalelas. Entre esses dois domínios existe uma fenda do sítio ativo onde se localiza a tríade catalítica (Cys25, His159 e Asn175). Segundo a *Enzyme Commission* o número de classificação da cruzipaina é EC3.4.22.51, o número 3,4 e 22 correspondem à classe de hidrólise, à sua atuação em ligação peptídica e ao grupo de cisteína endopeptidases, o número 51 é específico da cruzipaina (figura 8) (BRAK, et al., 2008; MCGRATH, et al., 1995).

Figura 8. Estrutura cristalográfica da cruzipaina, co-cristalizada com a benzoilarginina-alaninafluorometilcetona, enovelada em dois domínios distintos: domínio L (vermelho) e domínio R (verde), entre esses domínios está a fenda do sítio ativo (amarelo).

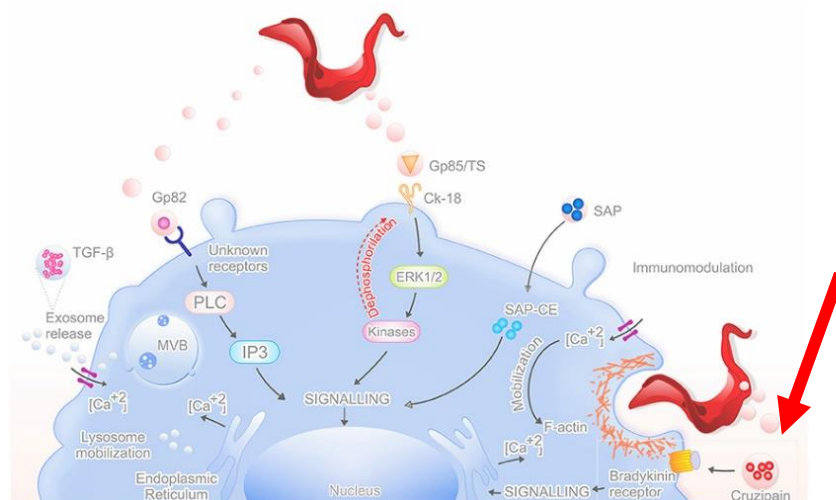


Fonte: Protein Data Bank (PDB: 2AIM).

A internalização de *T. cruzi* na célula hospedeira requer moléculas secretadas e de superfície iniciando a invasão celular utilizando principalmente: TGF- β (*Transforming growth factor*- β), Gp82, Gp85/TS (tramsialidase), SAP (*Serum amyloid P*), e a cruzipaina (figura 9). Essa enzima está associada com a invasão em cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos, modulando a interface entre receptores de endotelina-1 (ETAR and ETBR) e

bradicinina (B2R). Interação responsável pela modulação e ativação de TGF- β , implicado dessa forma na evolução da fibrose cardíaca (FERREIRA et al., 2016; WAGHABI et al., 2002).

Figura 9. Mecanismo de invasão aumentada pela secreção de cruzipaina (seta vermelha).



Fonte: Borges et al (2016).

Além da utilização dessas glicoproteínas, o parasito utiliza vários mecanismos para invadir células do hospedeiro, como adesão, internalização mediada por receptores, fagocitose, penetração ativa e transcitose. Após a invasão, o parasita é capaz de se replicar dentro das células, causando a doença (CAMPOS, et al., 2015).

A cruzipaina mais estudada foi denominada primeiramente como “clássica” e em 1990, recebeu a denominação de cruzipaina 1 (Czp1). Um segundo subtipo foi descrito em 1994, designado como cruzipaina 2 (Czp2). Elas diferem principalmente pelas suas especificidades a substratos e inibidores, essa diferenciação se dá pelo fato de os parasitos precisarem realizar funções biológicas distintas (MURTA et al, 1990, CAZZULO et al, 1990; LIMA et al, 1994).

2.JUSTIFICATIVAS

O açaí é um fruto da Amazônia e em especial do Pará que apresenta importância para a economia regional, assim como cultural e nutricional. O comércio que envolve a colheita e processamento do açaí ganhou relevância em meados da década de 1990, em

que as populações ribeirinhas foram pioneiras na extração (ROGEZ, 2000). O consumo do suco de açaí disseminou-se para outras regiões brasileiras assim como para outros países. Dado que o crescimento do consumo do suco de açaí acompanhou a transmissão oral de doença de Chagas, são necessárias pesquisas que indiquem a presença ou não de *T. cruzi* nesses alimentos (SANTOS et al., 2013; FERREIRA et al., 2014).

Deve-se considerar que o açazeiro não é ecótopo que reúne condições para a colonização de triatomíneos, portanto a transmissão por via oral de *T. cruzi* está relacionada diretamente com a higiene e inspeção na hora da colheita, debulha, transporte, processamento e armazenamento do produto. Assim, as fezes ou mesmo a trituração de triatomíneos podem propiciar a contaminação de alimentos por *T. cruzi*, uma vez que estudos realizados por microscopia óptica comprovam a existência de partes de insetos em produtos de açaí (PASSOS et al., 2012; BARROS et al., 2018).

As populações mais atingidas pela doença de Chagas em sua maioria são de alta vulnerabilidade social e econômica, levando a óbito mais de 14.000 pessoas por ano (BRASIL, 2020). Em dados de 14 de abril de 2021 a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) em comemoração ao Dia Mundial da Doença de Chagas, alertou que existe 70% de pessoas vivendo com a doença sem saber que estão infectadas (PAHO, 2021).

Existe a possibilidade dessa patologia se disseminar por áreas não endêmicas devido ao consumo de suco açaí contaminado por *T. cruzi* (BRASIL, 2014). Outra constatação deve ser considerada, a de que o diagnóstico da doença de Chagas é realizado muitas vezes depois do início da infecção, dificultando assim a terapia medicamentosa pouco eficiente em casos crônicos (RIBEIRO et al., 2020). Assim a profilaxia e a vigilância epidemiológica devem ser priorizadas no intuito de prevenir a ocorrência de novos casos (WHO, 2020).

Como se desconhece atualmente métodos rápidos e de fácil realização na detecção de *T. cruzi* no suco de açaí, por se tratar de populações que necessitam serem assistidas com maior cuidado, e medicações parcialmente eficazes, fazem necessárias pesquisas relacionadas aos fatores de infecção, diagnósticos adequados, análises sorológicas e melhores formas preventivas (SILVA et al., 2012; BARROS et al., 2018; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2021).

A técnica investigada neste estudo é o *Dot blot*, uma técnica simples, barata e sensível para a detecção de antígenos em amostras biológicas (JABERI-DELIVERY et al., 2020). Sua eficácia já foi comprovada em diversos estudos, mostrando-se promissora como método diagnóstico para diversas doenças infecciosas, entre elas a doença de Chagas (PÉREZ-MORALES et al., 2017). Além disso, o *Dot blot* pode ser usado para detectar anticorpos, ampliando ainda mais sua aplicabilidade. Sua simplicidade e velocidade o tornam uma opção atraente para análises em larga escala em ambientes com recursos limitados (MENDES et al., 2021). O *Dot blot* é, portanto, uma alternativa viável aos ensaios imunoenzimáticos tradicionais para ajudar a melhorar o diagnóstico e o controle de doenças infecciosas em todo o mundo.

Para o desenvolvimento deste projeto, existe ainda a justificativa do informe técnico da ANVISA nº35 de 2008 que propõe à comunidade científica:

- Viabilidade de *T. cruzi* em diferentes alimentos, considerando fatores intrínsecos e extrínsecos;
- Técnicas de detecção e de inativação de *T. cruzi* em alimentos;
- Formas de contaminação dos alimentos por *T. cruzi*;
- Condicionantes socioculturais e ambientais da preparação de alimentos em condições de risco.

3.OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia que permita utilizar a cisteína protease cruzipaina (Cz1) de *T. cruzi* (TcII) como bioindicador para ensaio imunoenzimático.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar quanti-quali as proteínas secretadas pela cepa Y (TcII) de *T. cruzi* em sua forma tripomastigotas padronizado em PBS por meio de biologia molecular/bioquímica, identificando a cisteína protease cruzipaina por anticorpos;

- Avaliar a cruzipaina secretada pela cepa Y (TcII) de *T. cruzi* em sua forma tripomastigotas em suco de açaí por *Western Blot* utilizando o que foi realizado em PBS como padrão, afim de analisar se a quantidade secretada é suficiente para um teste imunoenzimático;
- Desenvolver uma metodologia para teste de ensaio imunoenzimático por *Dot blot* para análise da cruzipaina em suco de açaí.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ETAPA 1 – METACICLOGÊNESE

4.1.1 Metaciclogênese induzida *in vitro*

Foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*, que pertence ao grupo TcII que foi isolada por Silva e Nussenzweig em 1953 por xenodiagnóstico de um humano. A cepa Y de *T. cruzi* que foi utilizada é mantida em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*) e em animais no laboratório de Parasitologia, departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Unesp/Araraquara.

Foram utilizados camundongos heterogênicos machos, linhagem *Swiss* de três semanas pesando de 20g a 30g, do biotério central da Unesp de Botucatu - São Paulo. Registrado com Protocolo CEUA/FCF/CAR. 22/2020. Os camundongos foram utilizados em parasitemia alta, seguindo de eutanásia por CO², punção cardíaca de forma asséptica com seringa de 1 mL heparinizada. O sangue puncionado (0,2 mL) foi cultivado em meio LIT 6 mL (tabela 1).

Tabela 1. Componentes do meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*).

Componentes	g/L
NaHPO ⁴ .7H ² O	11,6g
NaCl	4g
KCl	0,4g
Glicose	2,2g
Triptose	5g
Caldo de infuso de fígado	5g
Extrato de levedura	15g
Hemina Tris Base 0,1 N	25 mg/20 ml Tris Base 0,1 N
Soro fetal bovino	100mL
Penicilina	200.000U
Estreptomicina/gentamicina	50mg
H ₂ O qsp.	1.000mL

Fonte: Modificado de CAMARGO, 1964.

O pH do meio LIT foi ajustado a 7,5 com HCl, o meio foi inativado por 60 minutos entre 58°C e 60°C (sem a presença do antibiótico) passando por processo de filtração com membrana de 1,2mm e 0,2mm estéril (CAMARGO, 1964; MOURÃO, CHIARI, 1975).

Para o cultivo em meio de cultura LIT foi utilizado sangue de camundongos contaminados com a cepa Y (TcII) de *T. cruzi*, isto é, utilizou-se formas epimastigotas de cultivo recente (BARBOSA, 2000).

Após manutenção semanal da cepa de *T. cruzi* Y em meio LIT obteve-se 5×10^8 parasitos/mL, alíquotas de 10 mL foram ressuspensas em meio TAU por duas horas a 28°C (tabela 2), um meio sabidamente pobre em nutrientes, para induzir estresse nos parasitos. O meio TAU contém baixas concentrações de nutrientes que podem inibir o crescimento do parasita e fornecer adaptações fisiológicas para sobrevivência em condições adversas (CONTRERAS et al., 1985). Após as duas horas de incubação em meio TAU, foi realizada uma nova contagem de formas para o inóculo onde a concentração final foi determinada em $2,45 \times 10^7$ parasitos/mL.

Tabela 2. Componentes do meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*).

Componentes	mM	g/L
NaCl	190	11,10
KCl	17	1,26
MgCl ₂	2	0,407
CaCl ₂	2	0,294
Tampão fosfato	8	0,294
NaHCO ₃	0,6	0,005

Fonte: CONTRERAS, et al., 1985.

Os parasitos foram incubados em 10 mL de meio TAU3AAG (tabela3) em garrafa de cultura homogeneizado, deitando rapidamente, foram mantidos por quatro dias a 28°C. Após quatro dias, as formas tripomastigotas foram obtidas evitando a nata que se forma na superfície, as formas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos, ressuspensão em 1 mL de meio de cultura e levado para quantificação e morfologia do parasito para confirmação da metaciclogênese (CONTRERAS et al., 1985).

Tabela 3. Componentes do meio TAU3AAG (*Triatomine Artificial Urine*) adicionado de prolina, ácido glutâmico e ácido aspártico.

Componentes	mM	g/L
Glicose	10	1,80
I-Prolina	10	1,17
Glutamato de sódio	50	8,46
Aspartato de sódio	2	0,31

Fonte: CONTRERAS, et al., 1985.

4.2. ETAPA 2. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS SECRETOMAS

A cultura foi mantida até atingir a concentração de 1×10^9 , sendo lavadas por três vezes em PBS (1x) não suplementado, intercalados com centrifugações 3.500 rpm por 10 min a 4 °C. A cultura foi incubada com o mesmo meio por três horas a 26°C em triplicata. Foi realizado contagem e análise morfológica dos parasitos antes e após os experimentos, evidenciando que não houve lise celular no período de incubação.

A cultura passou por três etapas de centrifugações para retirada do sobrenadante, primeiro a 3.132 rpm por 10 min a 4 °C, na segunda etapa a 4.430 rpm por 10 min a 4 °C e a terceira etapa a 5.425 rpm por 10 min a 4 °C, cada etapa foi realizada a análise para verificar se não ocorreu lise celular por centrifugação, e a última etapa foi analisada em microscopia, para confirmação que o sobrenadante se encontrava livre de parasitos. A solução passou por liofilização (Labconco FreeZone™ 4.5ly) a -100.5°C e 0.008mbar por 24 horas (CUERVO, et al, 2009).

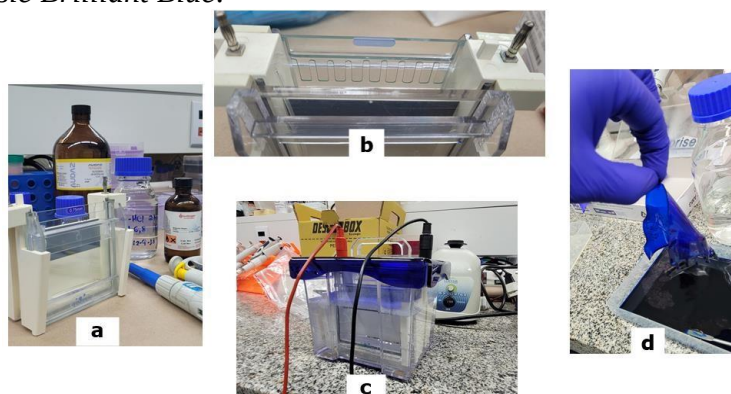
4.2.1 Análise dos secretomas por Bradford

O liofilizado foi ressuspensão (1 mL) e as amostras passaram pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), que consiste na determinação de proteínas utilizando o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250, esse corante interage com as macromoléculas de proteínas de alto peso molecular, foi utilizado uma curva padrão para a BSA (*Bovine Serum Albumin* da Sigma-Aldrich). O método utilizado para a medição da absorbância das concentrações de 0,10 µl, 0,20 µl, 0,30 µl, 0,40 µl, 0,50 µl foi o mesmo utilizado por Mattos em 2017, e foi realizado em triplicata (MATTOS, 2017). A leitura foi feita por meio de um leitor de microplacas.

4.2.2 Análise dos secretomas por SDS – PAGE

As proteínas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, contendo dodecil – sulfato de sódio, descrito por Laemmli, 1970. O gel unidimensional foi corado em uma solução de 2,5mg/mL de Comassie blue, 10% de Ácido acético e metanol/água 1:1 v/v. O gel bidimensional teve uma solução de Comassie coloidal com ácido orto-fosfórico 2%, sulfato de amônia 10% p/v, diluída em 4:5 v/v em metanol. A solução *destaining* é constituída de ácido acético a 10%, metanol/ água 1:1 v/v (figura 10).

Figura 10. Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil - sulfato de sódio (SDS – PAGE), a – montagem e preparo dos géis; b - polimerização correta dos géis com a presença de poços; c – eletroforese do gel de empacotamento a 30 mA (30 minutos) e do gel de corrida a 60 mA (120 minutos); d – Coramento com solução corante *Comassie Brilliant Blue*.



Fonte: Autoria própria (2022).

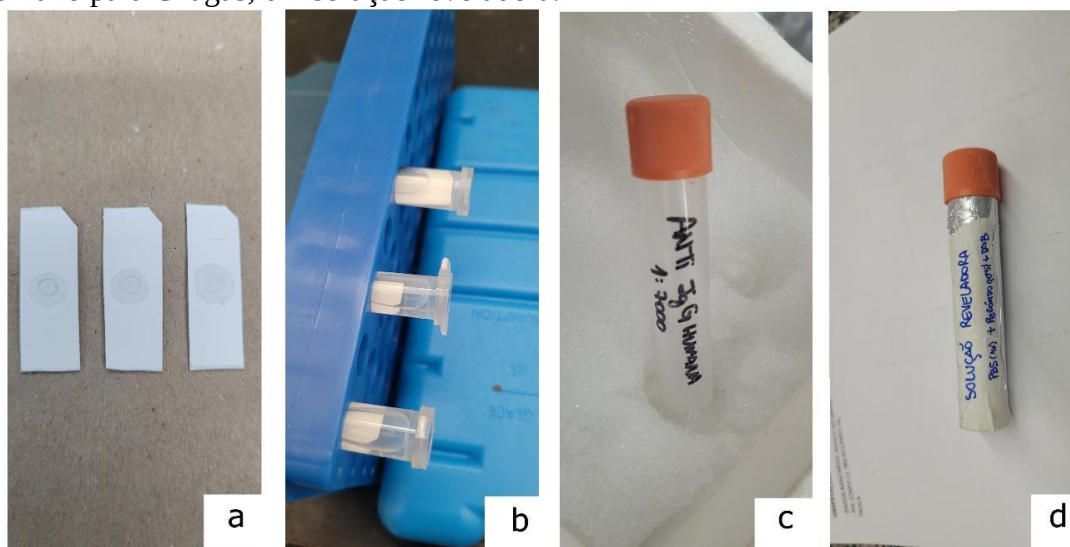
4.2.3 Análise dos secretomas por *Dot Blot*

Os testes foram elaborados em microtubo de 2 mL, sendo adaptado dentro a membrana de nitrocelulose na medida de 0,5 cm x 2,0 cm. Aplicado uma marcação circular no meio da membrana, em seguida foi aplicado 3uL de amostra na região marcada, ficando em temperatura ambiente até secagem. Realizado bloqueio de membrana por 2 horas com tampão de bloqueio (PBS 1x, Tween 20 0,05% v/v, Albumina 1,5% m/V). A membrana foi lavada por 3x, sendo 5 min cada com tampão de lavagem (PBS 1x, Tween 20 0,05% v/v). O anticorpo primário (soro positivo para doença de Chagas) do laboratório de hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, foi incubado sob leve agitação *overnight*.

A membrana passou ser lavada 3x, foi incubada com anticorpo secundário (por 1 hora, seguindo novamente com 3 lavagens. Realizada aplicação do tampão de revelação (PBS 1x, peróxido de hidrogênio 0,03% v/v, diaminobenzidina 0,06% m/V), seguido de lavagem com água MiliQ (figura 11 e 12).

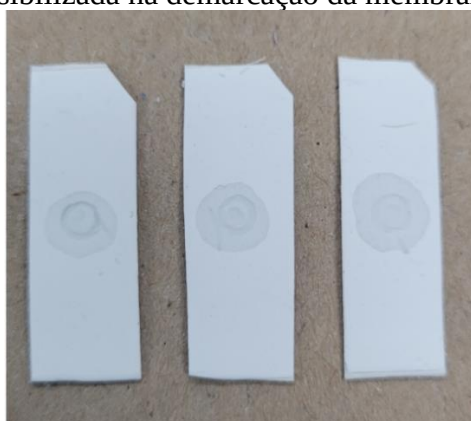
O mesmo procedimento foi realizado para o *Dot blot* com anticorpo policlonal anti-cruzipaína, cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Sérgio Schenkman, Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Figura 11. Etapas do método *Dot blot*. a – Amostra sensibilizada na demarcação da membrana de nitrocelulose; b – amostras na solução de bloqueio; c – antígeno igG humano para Chagas; d – solução reveladora.



Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 12. Amostra sensibilizada na demarcação da membrana de nitrocelulose.



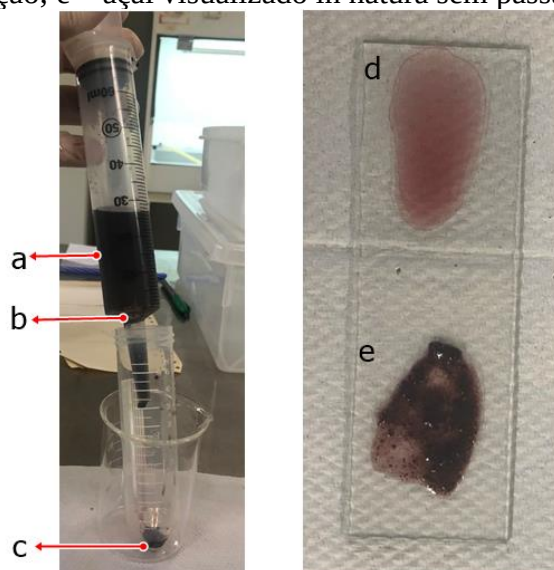
Fonte: Autoria própria, 2022.

4.3 ETAPA 3. AVALIAÇÃO DOS SECRETOMAS EM SUCO DE AÇAÍ

A polpa do açaí foi processada *in natura* e foi obtida de um estabelecimento na feira em Belém – Pará, no bairro da Marambaia, cedida pelo Dr. Éder dos Santos Souza, da fundação Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado - AM. A mesma passou por congelamento em recipiente isotérmico e transportados até o laboratório de Parasitologia para acondicionamento, até o dia da análise (YUYAMA et al., 2011, WWF, 2014).

O açaí passou por um processo denominado “tamisação forçada”, que consiste em criar coluna de filtração com uma camada de lã de nylon com uma seringa de 60 mL (figura 13), colocou-se o açaí *in natura* dentro da seringa preparada, fazendo força no embolo até se obter 50 mL da fase líquida do açaí, essa técnica empregada na mistura da polpa de açaí facilita a separação das fases sólida e líquida da polpa (PASSOS et al., 2012).

Figura 13. Técnica de tamisação forçada proposta por Passos e colaboradores em 2012. a – Fase sólida do açaí (não passa pelo filtro); b – filtro adaptado com lã; c – fase líquida do açaí; d – observação em lâmina com fundo branco da fase líquida do açaí, e facilidade de visualização; e – açaí visualizado *in natura* sem passar pelo método.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Esse meio de açaí passou pelas mesmas fases que nos testes com PBS, incubando os parasitos na concentração de 1×10^9 , passando por uma centrifugação para obtenção do *pellet* de parasitos. O *pellet* foi ressuspenso na fase aquosa do açaí e incubado por três horas. Seguiu para os três processos de centrifugação para somente restar o sobrenadante, primeiro a 3.132 rpm por 10 min a 4 °C, na segunda etapa a 4.430 rpm por 10 min a 4 °C e a terceira etapa a 5.425 rpm por 10 min a 4 °C.

Após retirada dos parasitos do sobrenadante, foi realizado o congelamento da amostra a -80 por 24 horas, seguiu para o processo de liofilização (Labconco FreeZone™ 4.5ly) a -100.5°C e 0.008mbar por 24 horas, peso final 1,0874g (CUERVO et al., 2009).

A amostra foi ressuspensa em 1 mL de PBS, seguindo para quantificação de proteínas com método de Bradford em triplicata nas concentrações de 0,10 µl, 0,20 µl, 0,30 µl, 0,40 µl, 0,50 µl, podendo assim ser medido sua absorbância por meio de leitor de microplacas a 595nm, seguindo para a etapa de SDS-PAGE a 12%, dot-immunobinding e Western Blot repetindo os mesmos métodos citados anteriormente.

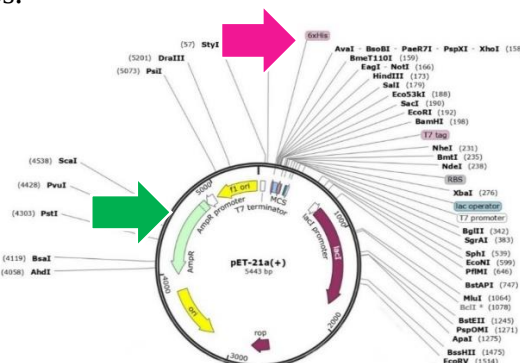
4.4 ETAPA 4 - CRUZIPAÍNA

4.4.1 Produção da cruzipaína

O plasmídeo pET21a é amplamente utilizado em pesquisas biotecnológicas para a expressão de proteínas recombinantes em bactérias. Esse plasmídeo contém o promotor T7 e os sinais de terminação da transcrição, permitindo a expressão regulada do gene introduzido pela adição de IPTG ao meio (STUDIER et al., 1990).

O plasmídeo pET21a (figura 14) que contém o gene da cruzipaína *Wild Type* (W.T) foi cedido pelo Dr. Carlos Alberto Montanari, Universidade de São Paulo (USP) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), constituindo portando uma cisteína protease natural que não passou por processo de alterações de seus genes por manipulação do homem. O gene contém cauda de histidina constituída por seis resíduos consecutivos de histidina (His6-tag), a transformação para expressão foi feita por meio da bactéria *E. coli* (*Escherichia coli*) resistente a ampicilina (ampR).

Figura 14. Mapa de plasmídeo: seta em rosa indicando seis resíduos consecutivos de histidina (His6-tag), contendo 18 pares de base (pb) de sequência 140-157, 6 aminoácidos de 840.9 Da (Dalton). Seta verde indicando resistência a ampicilina (amp^R) com 861 pares de base em sequência 3985-4845, 286 aminoácidos com 31,5 kDa, produto: lactamase, conferindo resistência para ampicilina, carbenicilina e antibióticos relacionados.



Fonte: Modificado do site SnapGene (2022).

Esse protocolo utilizando a expressão em bactéria *E. coli* BL21 da proteína fusionada com cauda de histidinas para permitir sua purificação em coluna de níquel, estratégia essa utilizada na maioria dos centros de genômica estrutural no mundo (*The Southeast Collaboratory for Structural Genomics – SECSG; UCLA–DOE Center for Genomics and Proteomics*, por exemplo).

Para a produção da enzima cruzipaina, foram empregados o plasmídeo Cz2.8 e o vetor pET21a. O processo de produção da enzima ocorre seguindo as etapas de competência celular, transformação celular, inoculação das bactérias transformadas no meio de cultura e expressão da enzima.

4.4.2 Produção de células competentes *E. coli* BL21

As células competentes foram preparadas a partir de *E. coli* BL21 (estocado à -80), o crescimento bacteriano foi realizado e tubo tipo cônico de 50 mL a 37 °C sob agitação contínua a 250 rpm, em 5 mL em meio LB (*Luria Bertani Miller*) (HIMEDIA) preparado de acordo com as instruções do fabricante, até a fase de crescimento exponencial verificado com espectrofotometria (WPA Biowave) no comprimento de onda de 600 nm (0,2 a 0,3). As células foram centrifugadas a 4.500 (ROTOFIX 32) rpm por três minutos em temperatura ambiente e descartado o sobrenadante, foi adicionado 1 mL de solução tampão de CaCl₂ estéril e centrifugado mais três vezes a 4.500 rpm por um minuto com descarte do sobrenadante.

4.4.3 Transformação de células

Utilizou-se o plasmídeo pET-21a (+) que codifica o gene ampR que confere resistência ao antibiótico ampicilina. A propagação do plasmídeo foi realizada em uma cepa de propagação BL21 de *E. coli* e diluída para uma concentração de 80 ng/μL. Ao microtubo contendo originalmente 100 μL de solução de células *E. coli* (Lucigen®), foi adicionado 1,5 μL do plasmídeo a uma concentração de 50 ng/μL, a solução passou por banho de gelo por 30 minutos e colocado imediatamente a 42 °C por 30 segundos em banho térmico para permitir que plasmídeos exógenos penetrem nas células.

As células competentes e a solução de plasmídeo foram então colocadas no banho de gelo novamente por 3 minutos, 250 μL de meio LB foram adicionados e colocados em uma incubadora (Mettler) agitadora a 37°C a 250 rpm por 60 minutos. Em seguida, centrifugou-se o microtubo contendo essa solução em uma centrífuga de bancada (HERMLE Z 126 MK), descartado o sobrenadante e utilizou-se o *pellet* resultante com auxílio de uma alça de Drigalski em uma placa de Petri descartável estéril com 100 μg/mL de ampicilina em 25 mL de meio LB ágar Miller (tabela 4) e finalmente colocado *overnight* em uma estufa bacteriológica (Olidex) a 37 °C.

Tabela 4. Componentes para o preparo de LB ágar Miller.

Componentes	g/L
Triptona	10g
Extrato de levedura	10g
NaCl	5g
Ágar	20g
Água destilada	1000mL

Fonte: BERTANI, 1951; MILLER, 1972.

*pH:7,2

4.4.4 Pré-inóculo

Adicionado ampicilina (100 μg/mL) em 5 mL meio LB Miller (triplicata) em tubo cônico de 50 mL, coletado colônia com alça de inoculação descartável estéril (a mais isolada), colocado em agitador incubadora (Mettler) a 37°C a 250 rpm *overnight*.

No dia seguinte foi adicionado 5 mL do inóculo em 50 mL de meio LB Miller ampicilina (100 μg/mL) colocado em estufa agitadora por aproximadamente 2 horas,

realizado avaliação de crescimento exponencial por espectrofotômetro com densidade óptica de 0,4 em comprimento de onda de 600nm (OD₆₀₀) observados em cada hora.

4.4.5 Expressão

O fator mais importante durante o processo de expressão de proteínas é a nutrição do microrganismo, ou seja, a composição do meio de expressão, que pode ser ajustada de acordo com a cepa do microrganismo, bem como a proteína a ser expressa, por isso utilizou-se IPTG (Isopropyl β - d-1-thiogalactopyranoside).

Após fase exponencial da cultura, foram aliqüotados 5 mL de inóculo em todos do tipo falcon 50 mL, adicionado indutor IPTG nas proporções: 0,5mM, 1mM, 1,5mM e uma alíquota sem indutor, ficando as amostras sob agitação em temperatura de 37C° por 3 horas. As amostras foram aliqüotadas novamente em 2 mL em microtubo, passando por centrifugação a 15.000 rpm por 2 minutos, o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de tampão de lise (tabela 5), sendo submetidas a pulsos de 15 segundos 10 vezes a 300 W em sonicador para lise celular em gelo, passando por centrifugação a 15.000 rpm por 10 minutos em centrífuga à 10 °C, realizando a separação do *pellet* e sobrenadante. O pellet foi ressuspensão em 1 mL de tampão de lise, o sobrenadante passou por processo de filtração em filtro centrífuga (Amicon® Ultra-0.5 *centrifugal filter*) com corte de 10 kDa, já que se trata de proteínas acima de 10 kDa.

Tabela 5. Componentes do tampão de lise.

Componentes	Medidas
Tris 500mM pH7,4 -	1 mL
NaCl 500mM	2 mL
EDTA 500mM pH8,0	20 uL
EGTA 200mM	50 uL
Triton X100	100 uL
DTT 100mM	100 uL
H2O miliQ qsp	10 mL
PMSF	1 mM

Fonte: Autoria própria (2023).

A mistura foi colocada em um agitador (Lab Companion Incubated Shaker modelo SIF600R) a 18 °C a 200 rpm por 72 h e então essa solução foi centrifugada a 5000 rpm (Hitachi Centrifuge modelo CR21GIII) a 4 °C e o pellet foi congelado a -80°C. Durante o processo de expressão, é importante garantir que o meio seja misturado, pois é

necessário que as bactérias realizem o metabolismo aeróbico sem alterar as condições ácidas do meio devido à fermentação.

Temperaturas relativamente baixas são usadas para o processo de expressão para evitar o supercrescimento bacteriano e maximizar a síntese protética, pois as bactérias gastam recursos de mídia para se multiplicar ou produzir a proteína desejada, além disso, a baixa temperatura também é importante para evitar a formação de corpos de inclusão.

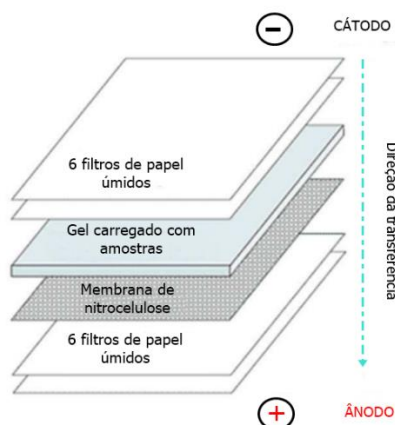
Utilizou-se a proteína com a cauda de histidina que é a cauda mais comumente usada pois adiciona apenas um peptídeo de 2 kDa (20 aa) à proteína de interesse, em vez da proteína de 26 kDa em GST (*glutathione-S-transferase*) e a proteína de 0 kDa em MBP (*maltose-binding protein*). A presença do marcador His em proteínas permite a purificação em uma etapa diretamente de lisados celulares por cromatografia de afinidade de metal imobilizado (IMAC, *metal ion affinity chromatography*).

4.4.6 Análise da expressão por Western Blot

Primeiramente foi realizado eletroforese SDS-PAGE 12% nas amostras, sem a fase de coramento por *Coomassie brilliant blue*, o gel foi retirado das placas e cortado a parte de empilhamento (*stacking*), ficando apenas a gel de corrida (*running*) com as amostras carregadas.

Realizado a transferência do gel para uma membrana de nitrocelulose (NC) constituído um “sanduiche” (figura 15) com seis camadas de papel filtro cortados no tamanho do gel, o gel carregado com as amostras, o papel de nitrocelulose cortado do tamanho do gel, e nessa etapa atentou-se para que a nitrocelulose fosse pouco manipulada com luvas, mais seis papéis filtros por baixo, todos os constituintes desse “sanduiche” foram embebidos ou lavados em tampão de transferência pH 8.3 (Trizma base 250 mM 15,1g, Glicina 1,92M 72 g, H₂O destilada 500 mL). O procedimento foi realizado por transferência horizontal semi seca.

Figura 15. Constituição do “sanduiche” para transferência semi seca. As amostras foram transferidas sob voltagem controlada para amperagem do transferidor em 0,8mA/cm² de membrana. Deixado transferir durante aproximadamente uma hora.



Fonte: Modificado de Miguel, et al; 2012.

Após transferência confirmada pela banda de peso molecular marcada na membrana. A membrana foi então, lavada em TBS/Tween (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e 0,05% de Tween-20, v/v) e incubada por 2 horas com tampão de bloqueio BSA 1% (Sigma Aldrich) em TBS/Tween. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com um anticorpo primário *Monoclonal Anti-polyHistidine - antibody produced in mouse* (Sigma-Aldrich) 1/1500 *overnight* em TBS/Tween.

Após a incubação a membrana foi lavada em TBS/Tween e, em seguida, incubada com o anticorpo secundário *Anti-Mouse IgG (whole molecule) –Peroxidase antibody produced in rabbit* (Sigma-Aldrich) 1/40.000 por uma hora em TBS/Tween. Após a incubação, as membranas foram lavadas 10 vezes com TBS/Tween e reveladas usando tampão de revelação constituído por DAB (Diaminobenzidina, tetrahydrocloro) 0,005mg + 10 mL de PBS + 100µL de Peróxido de Hidrogênio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BRADFORD E SDS-PAGE

Foi utilizado como padrão o BSA por Bradford, a equação de ajuste apresentou-se linear e de alta precisão ($y=3,572x+0,176607$) como apontado pelo coeficiente de determinação de 0,990 (R^2), sendo estimado em 72 µg secretadas por *T. cruzi* em sua

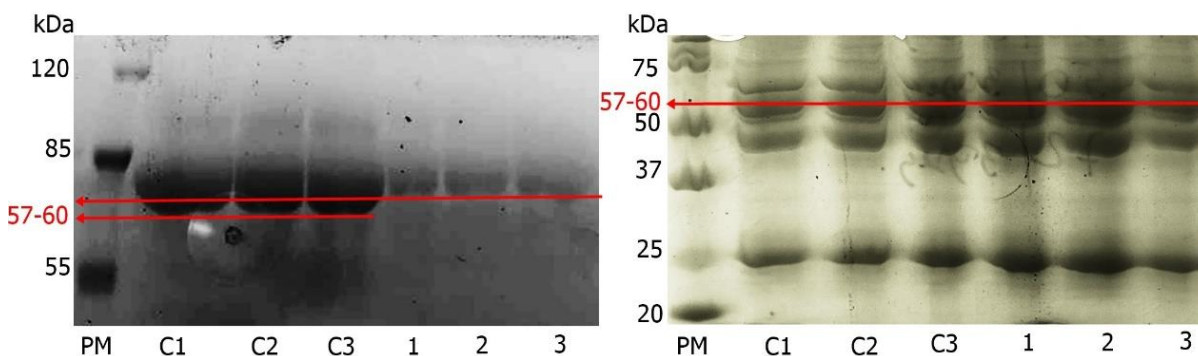
forma tripomastigota em quantidade de 1×10^9 de parasitos, utilizando equação matemática para o método de Bradford.

O mesmo teste realizado por Machado (2013), demonstrou uma quantidade de proteínas secretadas de 60 μg para formas tripomastigotas e 212 μg de proteínas secretadas pela forma epimastigota, demonstrando que o método utilizado foi adequado para quantificação de proteínas secretadas.

A equação de ajuste apresentou alta precisão e linearidade, indicada pelo coeficiente de determinação de 0,990 (R^2). Isso sugere que o método de Bradford é confiável para a quantificação de proteínas secretadas por *T. cruzi*.

A análise SDS-PAGE (figura 16) mostrou que as amostras testadas continham bandas com pesos moleculares variando de 57 a 60 kDa. Essa faixa de peso molecular geralmente está associada a proteínas de tamanho médio, como algumas enzimas e proteínas estruturais. Portanto 72 μg de proteínas secretadas por 1×10^9 foram utilizados nos experimentos a seguir:

Figura 16. A esquerda - Análise eletroforética de secretomas de *T. cruzi* em gel de poliacrilamida com dodecil - sulfato de sódio, corado com Coomassie Brilliant Blue em PBS. PM - *Prestained Protein Molecular Weight Marker*; 1C, 2C e 3C – triplicata amostras concentradas 10x; 1, 2 e 3 – triplicata amostras não concentradas; aproximadamente 57 a 60 kDa. sendo as amostras 1C, 2C e 3C concentradas 10x com dispositivo de ultrafiltração (Amicon®) 10kDa em triplicata, e as amostras 1, 2 e 3 não concentradas foram colocadas em triplicatas para comparação. A direita - eletroforese SDS-PAGE 12% Dodecil Sulfato de Sódio corado com *Coomassie Brilliant Blue* de secretomas de *T. cruzi* em suco de açaí. PM: marcador de peso molecular 250-10 kDa - *Precision Plus Protein™ Standards* (BIO-RAD). 1C, 2C e 3C – triplicata amostras concentradas 10x; 1, 2 e 3 – triplicata amostras não concentradas. 57-60 kDa amostra característico de cruzipaina. Notou-se melhor desempenho de corrida nas bandas das amostras concentradas, ficando as amostras concentradas e não concentradas em torno de 57 a 80 kDa.



Fonte: Autoria própria, 2022.

O peso molecular da cruzipaina em várias formas de *T. cruzi* tem sido estudado por vários grupos de pesquisa, Lima et al. (2001) mostraram que a cruzipaina presente em epimastigotas e tripomastigotas Dm28c de *T. cruzi* tinham pesos moleculares diferentes de 66 kDa e 57 kDa, respectivamente, em comparação com a n-cruzipaina, que foi analisada por Western blot usando anti-cruzipaina. Por outro lado, Uehara (2010) utilizou em sua análise uma fração enriquecida de cruzipaina e o *Western blot* apresentou uma banda entre 55 e 72 kDa, o que poderia ser explicado pela presença de outras proteínas na fração utilizada ou pela metodologia utilizada.

Batista et al. (2014) utilizaram o anticorpo monoclonal anti-cruzipaina mAb-CZP315.D9 para *Western blot* e obtiveram resultados diferentes de estudos anteriores com uma banda de 50-60 kDa. Esses resultados podem ser devidos à especificidade dos anticorpos utilizados que podem reconhecer diferentes epítopos de cruzipaina.

Esses resultados destacam a importância de avaliar cuidadosamente a metodologia utilizada nos estudos da cruzipaina e considerar os diversos fatores que podem influenciar a identificação e quantificação dessa enzima em diferentes amostras de *T. cruzi*.

Essas diferenciações verificadas entre a cruzipaina em *Western blot* e SDS-PAGE são chamadas de isoformas, sendo a cruzipaina expressa como uma mistura de isoformas. A isoforma menos homóloga com as propriedades mais diferentes foi chamada de "Cruzipaina 2 – Czp2". Além disso, existem isoformas menores associadas à membrana plasmática, presumivelmente por meio de âncoras GPI. Algumas isoformas são secretadas no meio por tripomastigotas e isso é crucial para o papel da cruzipaina como fator de virulência na doença de Chagas. A cruzipaina 2 é predominantemente expressa em tripomastigotas e amastigotas (ALVAREZ et al., 2012).

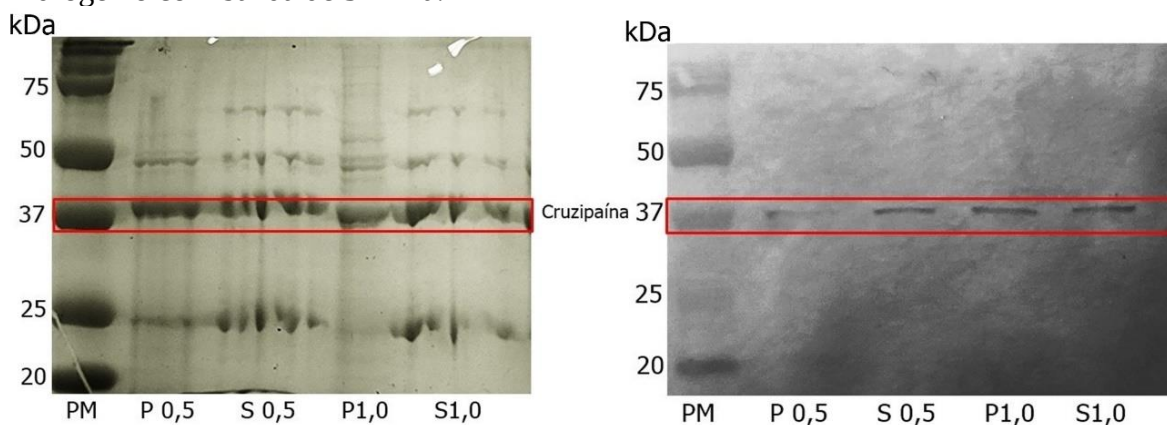
O parasito *T. cruzi* é capaz de secretar diferentes formas de proteínas celulares tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Algumas dessas proteínas foram identificadas como membros de TC85, T-DAF e transialidases, conforme relatado por Gonçalves et al. ano de 1991. Proteases de cisteína foram identificadas como secretadas por trimastigotas conforme relatado por Yokoyama-Yasunaka et al. em 1994, foi sugerido que aqueles com peso molecular de 50-60 kDa poderiam corresponder à cruzipaina, conforme descrito por Bontempi et al. em 1984, Scharfstein em 1986 e outros também realizaram pesquisas (AFFRANCHINO et al., 1989; MURTA et al., 1990; JOINER et al., 1988; ARAÚJO, 1988; CAMPETELLA et al., 1992).

Estudos realizados por Grupi et al. (1997), revelaram que a principal cisteína protease de *T. cruzi* que é objeto deste estudo é um dos componentes liberados pelo parasito, não estando a cruzipaína apenas no interior de vesículas do sistema endossômico-lisossomal, mas pode ser encontrada na sua superfície celular.

5.2 Western blot

A cruzipaína recombinante expressa em BL21 foi confirmada com método de *Western blot* evidenciando banda de 37 kDa (figura 17) que foi utilizada como controle positivo neste trabalho. Estudos apontam que a cruzipaína apesar de ser sintetizada como um zimogênio apresenta propriedade autocatalítica sofrendo modificações autofágicas desencadeada pelos meios e tampões utilizados em *Western blot* (ALVAREZ, et al., 2002). Portanto notou-se que o método utilizado sem inibição da autofagia faz com que a cruzipaína quando madura (íntegra) de peso molecular de 66-57 kDa seja degradada ficando com 37 a 25 kDa.

Figura 17. Resultados da eletroforese a esquerda e *Western Blot* a direita, realizado nas amostras de cruzipaína expressa em BL21. Eletroforese SDS-PAGE 12% Dodecil sulfato de Sódio, corado com *Coomassie Brilliant Blue*: PM – Marcador de peso molecular 250-10 kDa - *Precision Plus Protein™* Standards (BIO-RAD). P 0,5; P 1,0 – Pellet em concentração 1/10 com indutor IPTG 0,5 mM e 1,0 mM; S 0,5 e S 1,0 – Sobrenadante com indutor IPTG 0,5 mM e 1,0 mM. Western Blot a direita evidenciando detecção da cruzipaína pelo anticorpo anti-histididina, revelado com DAB + PBS + Peróxido de Hidrogênio com banda de 37 kDa.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Em estudo publicado por Soares Medeiros e Silva (2005), foram avaliadas a expressão e purificação da cruzipaína recombinante em *E. coli* BL21 (DE3) e as

propriedades bioquímicas da proteína, demonstrando que a cruzipaína recombinante expressa por BL21 foi purificada com sucesso e sua proteína tem atividade enzimática similares à da cruzipaína natural.

Outro estudo publicado em 2011 por Ferreira, investigou a degradação da cruzipaína por proteases celulares em diferentes condições de armazenamento e manuseio. Estudos demonstraram que a cruzipaína é uma proteína autolítica que pode ser hidrolisada em pH baixo, alta temperatura ou na presença de certas proteases. O autor também relatou que a cruzipaína pode ser degradada durante o *Western blot* em condições específicas.

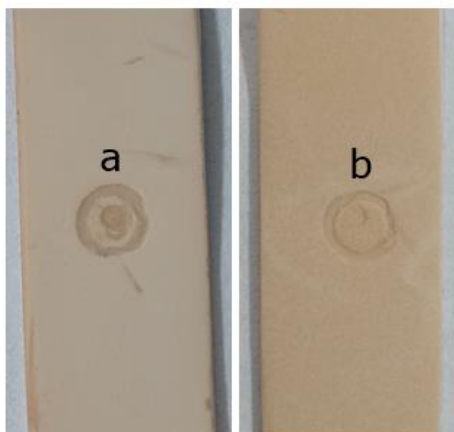
Além disso, um estudo publicado em 2019 por Fernandez, Mortara e Andrews avaliou o efeito da temperatura e do pH na atividade da cruzipaína recombinante expressa em *E. coli*. Os autores relataram que a atividade da proteína diminui em temperaturas acima de 40°C e pH abaixo de 4,5.

A cruzipaína é uma proteína sensível às condições de armazenamento, manuseio e análise e pode degradar sob certas condições. Portanto, é importante tomar medidas para garantir a integridade da proteína durante os experimentos, como o *Western blot*, para evitar a degradação e obter resultados confiáveis.

5.3 Dot blot

A interpretação dos resultados na análise por *Dot blot* foi realizada de forma observacional. Utilizou-se a amostra contendo 72 µg em triplicata. A reação foi realizada com controle positivo de soro inativado contendo anticorpos contra *T. cruzi* (Wiener Lab[®]). O resultado expresso por esse método, atestou positividade na presença de proteínas secretadas pelo parasito (Figura 18).

Figura 18. Resultados observados na técnica de *Dot blot* para diagnóstico de Chagas em humanos, utilizando a amostra concentrada 10x. a – Amostra com reação positiva apresentando coloração do círculo; b – Amostra controle negativo, não apresenta coloração no círculo.



Fonte: Autoria própria, 2022.

A interpretação dos resultados foi realizada cuidadosamente de acordo com as melhores práticas na área. Amostras contendo 72 µg em triplicata foram obtidas pelo método de Bradford, que é amplamente considerado um método eficiente para quantificação de proteínas. Este método usa BSA como padrão e é altamente preciso para determinação da concentração de proteína. Além disso, para garantir a confiabilidade dos resultados, a reação foi realizada com um controle soropositivo inativo contendo anticorpo contra o *T. cruzi* (Wiener Lab®). Essa validação confirmou a presença de proteínas secretadas pelo parasito e a eficiência do método utilizado para quantificar essas proteínas.

Essa validação confirmou a presença de proteínas secretadas pelo parasito e a eficiência do método utilizado para quantificar essas proteínas. Os resultados obtidos por este método mostraram-se, portanto, positivos para a presença de proteínas secretadas por *T. cruzi*. É importante ressaltar que o uso de métodos rigorosos de quantificação de proteínas e a validação de métodos com controles positivos são essenciais para a obtenção de resultados confiáveis e precisos.

5.3.1 *Dot blot* com anticorpo policlonal anti-cruzipaína

Foi realizado o método de *Dot blot* utilizando o anticorpo policlonal anti-cruzipaína em fita de nitrocelulose, em que uma era controle positivo e a outra controle

negativo, o resultado se deu pela oxidação da peroxidase tanto no controle positivo quanto no controle negativo (Figura 19), o que demonstrou uma possível degradação do anticorpo (EDWIN, 2015).

Outra possível explicação para resultados negativos no *Dot blot* com o uso do anticorpo anti-cruzipaína é a baixa especificidade ou afinidade do anticorpo pela cruzipaína na amostra (GUIMARÃES, et al., 2012). Isso pode ocorrer devido à baixa pureza do anticorpo ou à presença de outras proteínas que competem com a cruzipaína pelo reconhecimento do anticorpo. É importante lembrar que anticorpos policlonais são produzidos a partir de vários clones de células B e, portanto, podem ter diferentes especificidades e afinidades por sua proteína alvo.

Referente aos métodos utilizados no processo do *Dot blot*, é importante garantir que as etapas de transferência e bloqueio tenham sido realizadas corretamente e que as concentrações de anticorpo e substrato de detecção tenham sido otimizadas (CHUANG, et al., 2012).

Figura 19. Resultados observados na técnica de *Dot blot* com anticorpo primário policlonal anti-cruzipaína, utilizando a amostra concentrada 10x. A esquerda – Amostra com reação positiva apresentando coloração marrom pelo composto cromogênico. A direita – Amostra controle negativo, apresentando positividade pela coloração marrom pelo composto cromogênico.



Fonte: Autoria própria, 2022.

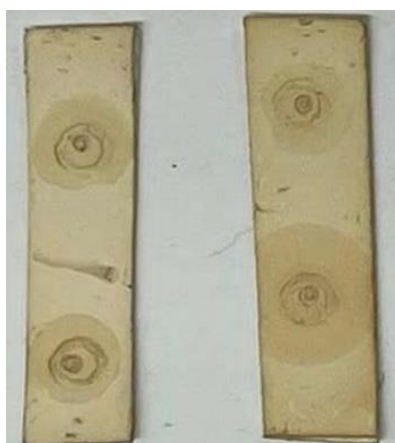
Em resumo, a baixa especificidade ou afinidade do anticorpo policlonal anti-cruzipaína, as diferenças na sensibilidade e especificidade dos métodos de detecção podem ter contribuído para os resultados inconclusivos.

Neste estudo, foi utilizado como controle positivo a cruzipaína expressa em B121 (figura 20). Um anticorpo policlonal anti-cruzipaína foi utilizado para identificar a presença da proteína no papel de nitrocelulose.

No entanto, quando os resultados são analisados, percebe-se que não houve detecção positiva de cruzipaína expressa por B121 no *Dot blot*, utilizando o anticorpo policlonal anti-cruzipaína. É possível que a degradação tenha sido responsável por essa falta de detecção, uma vez que foi exposto à temperatura ambiente por quatro dias durante o envio.

Conforme mencionado acima, a depleção de anticorpos pode levar a resultados falso-negativos, reduzindo a eficácia dos estudos. A importância de garantir que os anticorpos estejam em boas condições antes do uso foi enfatizada por vários autores, incluindo Gross et al. (2009) e Dain et al. (2012).

Figura 20. Resultados observados na técnica de *Dot blot* com anticorpo primário policlonal anti-cruzipaína, utilizando a amostra de cruzipaína expressa por B121. A esquerda – Amostra com reação negativa em duplicata não apresentando coloração marrom pelo composto cromogênico. A direita – Amostra controle negativo, apresentando negatividade pela não coloração marrom pelo composto cromogênico.



Fonte: Autoria própria, 2022.

A degradação do anticorpo policlonal anti-cruzipaína pode ser uma possível explicação para os resultados obtidos no ensaio *Dot blot* para detecção de cruzipaína. Os anticorpos podem perder especificidade e sensibilidade devido ao armazenamento ou manuseio inadequado, levando a resultados falsos positivos ou negativos (GROSS et al., 2009).

Portanto, é importante garantir que o anticorpo esteja em boas condições por meio de testes de controle de qualidade. A detecção de anticorpos específicos é crucial em experimentos, pois a degradação de anticorpos pode levar a uma interpretação errônea

dos resultados e afetar a validade da pesquisa. Portanto, é importante implementar controles adequados e avaliar cuidadosamente os resultados obtidos, a fim de minimizar a possibilidade de falha experimental e garantir a confiabilidade dos resultados (DAIN et al., 2012; GROSS et al., 2009).

6. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos para a quantificação de proteínas secretadas por *T. cruzi* pelo método de Bradford são consistentes e sugerem que pode ser considerado uma metodologia confiável para este fim. Aproximadamente 72 µg de proteína secretada pelos parasitas 1×10^9 utilizados nos experimentos podem fornecer informações importantes para estudos posteriores desses secretomas.
- Os estudos apresentados foram conduzidos com rigor, apesar da sensibilidade da cruzipaína recombinante às condições de armazenamento, manuseio e análise. É fundamental adotar medidas para garantir a integridade da proteína durante os experimentos. Este estudo contribui para a compreensão da expressão, purificação e propriedades da cruzipaína recombinante como controle positivo para ensaio imunoenzimático.
- Os resultados obtidos confirmaram a presença de proteínas secretadas pelo *T. cruzi* por meio da análise por *Dot blot*. A quantificação das amostras foi realizada de acordo com as melhores práticas e validada com controle positivo, garantindo a confiabilidade dos resultados.
- O anticorpo policlonal utilizado no método de *Dot blot* estava degradado, o que pode ter comprometido sua capacidade de detecção da cruzipaína. É importante ressaltar que este foi um estudo preliminar e que serão necessários outros testes e validações para determinar a eficácia deste método na detecção de cruzipaína em suco de açaí.
- O teste imunoenzimático por *Dot blot* tem boas práticas padronizadas e validado com controles positivos, para garantir a confiabilidade dos resultados. Diferentes diluentes e concentrações de amostra foram usados para a sensibilidade e especificidade do ensaio. No entanto, o anticorpo policlonal utilizado no método foi o que pode ter comprometido sua capacidade de detectar a cruzipaína.

É importante ressaltar que este estudo é considerado um estudo preliminar e apesar dos resultados metodológicos promissores, validação e testes adicionais são necessários para determinar a eficácia do método para detecção de cruzipaina por *Dot blot* em suco de açaí. No entanto, os resultados apresentados neste estudo fornecem uma base sólida e ajudam a entender a expressão, purificação e caracterização da cruzipaina recombinante como controle positivo para ensaios imunoenzimáticos em suco de açaí e outras aplicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFRANCHINO, J. L.; IBANEZ, C.F; LUQUETTI, A. O; REYES, M. B; MACINA, R. A; ASLUND, L; PETTERSON, U. E FRASCH, A. C. C. Identificação de um antígeno de *Trypanosoma cruzi* que é eliminado durante a fase aguda da doença de Chagas .**Mol. Bioquim. Parasitol.** v. 34, p. 221–228, 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2499788/>. Acesso em: 22 fev. 2021.
- ALVEZ, D. F.; MUNIZ, A. S. C.; ABREL, C. D. R.; FREITAS, N. R.; TEIXEIRA, A. B.; FERREIRA, E. S. Métodos de diagnóstico para a doença de Chagas: uma atualização. **Rev. Bras. Anál. Clín.** Fortaleza-CE, v. 50, n. 4, p. 330-3, 2018. Disponível em: <https://www.ufmt.br/ppgcs/images/uploads/editais/Selecao2020/8Metodosdediagnostico paraadoencadeChagasumaatualizacao.pdf>. Acesso em: 10 de nov. 2020.
- ARAUJO, P. L.; ALMEIDA, A. B.; PIMENTEL, C. F.; SILVA, A. R.; SOUSA, A.; VALENTE, S. A.; VALENTE, V. C.; BRITTO, M. M.; ROSA, A. C.; ALVES, R. M.; HAGSTROM, L.; TEIXEIRA, A. RL. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 112, n.6 jun. 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&nrm=iso&lng=pt&tlng=pt&pid=S0074-02762017000600437. Acesso em: 12 dez. 2019.
- BARBOSA, H. S. **Doença de Chagas:** manual para experimentação animal: Manutenção e Obtenção dos Diferentes Estágios Evolutivos em Laboratório. Editora FIOCRUZ. Antropologia e Saúde collection. Rio de Janeiro, v. 75, n. 2, p. 368, 2000. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/cdbjg/pdf/araujo-9788575413937-11.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2020.
- BARROS, J. H. S.; XIMENES, R. A. A.; RAMOS Jr, A. N.; MIRANDA, M. G. Aspectos da epidemiologia da doença de Chagas relacionados ao consumo de alimentos: uma revisão de literatura. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 51, n. 6, p. 703-710, 2018. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822018000600703&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 03 mai. 2023.
- BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. **Clin Microbiol Rev.**, v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011. doi:

10.1128/CMR.00005-11. Disponível em: <https://cmr.asm.org/content/24/4/655>. Acesso em: 11 de abril de 2023.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 62, p. 293-300, 1951. PMID 14888646 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14888646/> Acesso em: 26 mar. 2022.

BHATTACHARYYA, T; BROOKS, J.; YEO, M; CARRASCO, H. J.; LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M.S.; MILES, M. A. A análise da diversidade molecular do pequeno antígeno de superfície tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* revela novos epítomos, evidências de seleção positiva e implicações potenciais para a sorologia específica de linhagem. **Int. J. Parasitol.** v. 40, p. 921–928, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020751910000202?via%3Dihub>. Acesso em: 04 de nov. 2020.

BOMTEMPI, E; MARTINEZ, J; CAZZULO, J. J. Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 33, n. 1, February, p. 43-47, 1989. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685189900406>. Acesso em: 04 fev. 2022.

BONTEMPI, E; FRANKE DE CAZZULO, B. M; RUIZ, A. M; CAZZULO, J. J. Purification and properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 77B, p. 599–604, 1984. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0305049184902827>. Acesso em: 08 mar. 2023.

BONNEY, Kevin M.; LANNING, Sarah E.; HIGHTOWER, Allen W. Focused Diagnostics for Neglected Tropical Diseases: Case Study for Chagas Disease. **PLOS Negl Trop Dis.**, v. 11, n. 1, p. e0005131, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005131>. Acesso em: 03 maio 2023.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** May v. 72, p. 248-54, 1976. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>. acesso em: 04 jan. 2022.

BRAK, K.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ELLMAN, J. A. "Identification of a New Class of Nonpeptidic Inhibitors of Cruzain. **J. Am. Chem. Soc.** v. 130, n. 20, p. 6404, 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja800374s>. Acesso em: 30 abr. 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº35, de 19 de junho de 2008. Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35_190608.pdf. Acesso em: 10 dez. 2019.

BRASIL. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev Saúde Pública.** Brasília, v. 44, n.1, p. 200-2, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/SGgpSRmvyByDF3bKphbd3Tx/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 05 jan 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial da União**, 10 jan. 2000. Seção 1, p. 54. Disponível em: <<https://www.ibravin.org.br/admin/arquivos/leis/1456251935.pdf>> Acesso em: 30 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. **Bol Epidemiol.** v. 51, n.esp. p. 1-43, 2020. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Acesso em: 30 de jul. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico. Doença de Chagas 14 de abril Dia Mundial. Brasília, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf. Acesso em: 02 fev. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância da doença de Chagas: controle de vetores, diagnóstico laboratorial e tratamento. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_doencachagas_controle_vetores.pdf. Acesso em: 03 mai. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas: uma nova realidade de enfrentamento: O consumo de alimentos contaminados com parasitos, como caldo de cana e açaí, é a principal forma de transmissão da doença. Brasília, janeiro de 2019. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/index.php/promocao-da-saude/53710-doenca-de-chagas-uma-nova-realidade-de-enfrentamento>. Acesso em: 05 nov. 2019.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **A. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 347-382, 1973. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>. Acesso em: 03 fev. 2023.

BRENNER, R. I. L.; STOKA A. I. M. **Chagas Disease Vectors**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 1-3.

BUSTAMANTE, J. M.; FERNÁNDEZ-GÁLVEZ, C.; GONZÁLEZ-CALDERÓN, M.; SAUGER, J. M.; MORALES-HENRÍQUEZ, J. D. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 1917-1927, 2014. Disponível em: <https://www.dovepress.com/drug-discovery-and-development-for-neglected-diseases-the-dndi-model-peer-reviewed-article-DDDT>. Acesso em: 11 abr. 2023.

CAMARGO, E. F. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. trop.** São Paulo v. 6, p. 93-100, 1964. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14177814/>. Acesso em: 15 jan. 2021.

CAMPETELLA, O; SANCHEZ, D; CAZZULO, J. J; FRASCH, A. C. C. A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens. **Parasitol. today** v. 8, p. 378–381, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15463546/>. Acesso em: 03 jan. 2023.

CARVALHO, T. U. Organização Estrutural: Microscopia Óptica. In: SOUZA, Wanderley de. (Editor). **Microscopia Óptica: fundamentos e Aplicações às Ciências Biomédicas**. Rio de Janeiro: 2017. Programa de Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2017. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/>. Acesso em: 14 fev. 2020. /

CARVALHO, T. U; BARRIAS, E. Mecanismo de Interação: Adesão, reconhecimento, sinalização e invasão. In: SOUZA, Wanderley de. (Editor). **Microscopia Óptica: fundamentos e Aplicações às Ciências Biomédicas**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2017. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/interacao/>. Acesso em: 25 fev. 2022.

CASTRO, C. N.; FRIEDMAN, I. V.; CAMPBELL, L.; MAGALHÃES, A. V.; PIRES, L. L. Transmissão congênita da doença de chagas em gestações sucessivas. **Rev. Med. Saúde Brasília**. v. 5, n. 2, p. 273-80, 2016. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/7142-33129-1-PB.pdf>. Acesso em: 09 de fev. 2020.

CASTRO-SESQUEN, Y. E.; GILMAN, R. H.; YAURI, V.; ANGULO, N.; VERASTEGUI, M.; BERN, C. Use of a Rapid Test on Umbilical Cord Blood to Screen for *Trypanosoma cruzi* Infection in Pregnant Women in Tumbes, Peru. **The. Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 89, 1, p. 141-144, 2013. doi: 10.4269/ajtmh.12-0604. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/89/1/article-p141.xml>. Acesso em: 11 de abril de 2023.

CAZORLA, S. I.; FRANK, F. M.; BECKER, P. D.; BUA, J., FERREIRA, É. L.; GÓMEZ, K. A., ... MIRKIN, G. A. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. **AJP-Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 11, p. H1233-H1241, 2015. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00282.2003>.

CAMPOS, F. M. F.; FRANKLIN, B. S.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FILHO, B. G. C.; DE PAULA OLIVEIRA, F.; VIEIRA, M. A.; ... & TEIXEIRA, M. M. The importance of the complement system in the pathogenesis of Chagas disease: a review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 48, n. 2, p. 125-131, 2015. DOI: 10.1590/0037-8682-0035-2015.

CAZZULLO, J. J.; FRANKE, M. C. C.; MATÍNEZ, J.; CAZZULO, B. M. F. Algumas propriedades cinéticas de uma cisteína proteinase (cruzipaína) de *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Estrutura de Proteína e Enzimologia Molecular** v. 1037, p. 186–191, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2407295/>. Acesso em: 23 nov. 2021

CHAGAS, C. Tripanosomíase americana. Forma aguda da moléstia. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 8, p. 37-67, 1916. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/JmJKC7XCtq85hb6VdwmyZLB/?lang=pt>. Acesso em: 14 fev 2022.

CHEN, H. ZHANG, X.; JIN, Z.; HUANG, L.; DAN, H.; XIAO, W.; TANG, Y. Tang Differential diagnosis of PRV-infected versus vaccinated pigs using a novel EuNPs-virus antigen probe-based blocking fluorescent lateral flow immunoassay **Biosensors & Bioelectronics**. v. 155, 2020, 112101, ISSN 0956-5663. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566320300981>. Acesso em: 25 out. 2021.

CHUANG, J.-Y.; CHANG, H.-W.; CHEN, C.-S.; HSU, T.-C.; WU, S.-Y. Gold nanoparticle-based dot-blot immunoassay for rapid detection of Salmonella. **Anal. Chim. Acta**, v. 712, p. 82-87, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.051>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267011016786>. Acesso em: 12 de abril de 2023.

CONTRERAS, V. T.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 14, p. 83-96, 1985. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685185901082?via%3Dihub>. Acesso em: 10 de nov. 2020.

CORTEZ, M; NEIRA, I; FERREIRA, D; LUQUETTI, A. O; RASSI, A; ATAYDE, V. D. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. **Infect Immun.** v. 71, n. 11, p. 6184-91, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC219548>. Acesso em: 12 mar. 2020.

COURA, J. R. et al. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature09221>. Acesso em: 11 abr. 2023.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta tropica**, v. 68, n. 2, p. 93-133, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X96000587>. Acesso em: 02 maio 2023.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease—100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, suppl 1, p. 31-40, 2009. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000900006. Acesso em: 11 abr. 2023.

COURA, JOSE RODRIGUES ; CASTRO, SOLANGE, L. DE. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p.3-24, jan. 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/znm8Y8wxydQRx98HJnKbCPS/?lang=en>. Acesso em:14 dez.2021

CUERVO, P. J.J. B; SABOIA-VAHIA, L; MENDONÇA-LIMA, DOMONT, G. B; CUPOLILLO, E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **J Proteomics**. v. 73, n.1, p. 79-92, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19703603/>. Acesso em: 20 fev. 2021

DAIN, L.; GOLOD, M.; PERRY, A. S.; TIROSH, B.; BRIEL, A. Antibody specificity control in the development of diagnostic tools for protein misfolding diseases. **J. Neurochem.**, v. 120, n. 1, p. 37-45, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07554.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-4159.2011.07554.x>. Acesso em: 12 de abril de 2023.

DANTAS, M.C.C.O.; SOUZA, M.A.F.; BRITO, E.S. Caracterização nutricional do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) de diferentes áreas do Estado do Pará. **Arch. Latinoam. Nutr.**, Caracas, v. 64, n. 2, p. 87-92, June 2014. Disponível em: <https://www.redalyc.org/journal/819/81931008009/html/>. Acesso em: 02 maio 2023.

DE MEIS, J; CASTRO, R. S. S. **Manual para diagnóstico em doença de Chagas para microscopistas de base do Estado do Pará**. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/wp-content/uploads/2018/08/02-Manual-de-Chagas-Diagramado.pdf>. Acesso em: 30 de nov. 2020.

DE TITO, E. H.; ARAÚJO, F. G. Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease. **Clin. Immunol. Immunopathol.** v. 46, p. 157-161, 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3121225/>. Acesso em: 02 mar. 2023.

DIAS, E. Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v.35, n.2, p.335-342, mar 1940. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761940000200006. Acesso em: 11 dez. 2019.

DIAS, J. C. P. **Doença de Chagas e globalização: ciência, tecnologia e saúde**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2009. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=Q2HaHyhoG6QC&printsec=frontcover&dq=doenca+de+chagas+e+globalizacao&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwiS8JLuvMLvAhXeGbKGHcPiB8sQ6AEwAHOECAUQA#v=onepage&q=doenca%20de%20chagas%20e%20globalizacao&f=false>. Acesso em: 02 maio 2023.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas urbana no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 42, supl. 2, p. 96-100, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822009000900014. Acesso em: 02 maio 2023.

DIAS, J. C. P, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde**. Brasília, v. 25, núm. esp., p. 7-86, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ress/v25nspe/2237-9622-ress-25-esp-00007.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2020.

DIAS, J. C. P. et al. Doença de Chagas: manejo clínico. Recomendações da Sociedade Brasileira de Cardiologia e da Sociedade Brasileira de Infectologia. **Arq Bras Cardiol**, v. 111, n. 3, p. 484-490, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2018000300484. Acesso em: 11 abr. 2023.

DIAS, J. C. P. Problemas e possibilidades de participação comunitária no controle das grandes endemias no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, Sup. 2, p. 19-37, 1998. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/csp/v14s2/1323.pdf>. Acesso em: 04 de fev. 2020.

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 44, supl. 2, p. 68-72, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000800011&lng=en&nrm=iso. Acesso em 04 Nov. 2020.

DIAS, J. V. L.; AVELAR, B. A.; JUNIOR, H. B. C.; HERTON, L. D.; PIRES, H. R. Capture of *Triatoma arthurneivai* (Hemiptera: Reduviidae) using a new luminous trap in Southeast Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v. 44, n.6, Nov./Dec. 2011. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-de-chagas/triatomineos_do_estado_de_sao_paulo.pdf. Acesso em: 13 fev. 2020.

DIAS, J.C.P.; SCHOFIELD, C.J. The evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 94, suppl. 1, p.103 – 121, 1999. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/mioc/v94s1/6700.pdf>. Acesso em: 04 de nov. 2020.

DIAS, JCP. O controle da doença de Chagas no Brasil. In: SILVEIRA, AC (organ.). **El control de la Enfermedad de Chagas en los Países del Cono Sur de América**. Historia de uma iniciativa internacional. Uberaba. 2002. P. 145-250. (OPS/Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro). Disponível em: https://www.paho.org/uru/index.php?option=com_docman&view=download&alias=54-el-control-de-la-enfermedad-de-chagas-en-los-paises-del-cono-sur-de-america&category_slug=informes-generales&Itemid=307. Acesso em: 11 de dez. 2020.

DÍAZ-ALBITER, HM.; FERREIRA, TN.; COSTA, S.G. et al. Todo mundo adora açúcar: primeiro relato de alimentação vegetal em triatomíneos. **Parasites Vectors**, v. 9, p. 114, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1401-0>. Acesso em: 12 abr. 2023.

EAKIN, A.E.; MCGRATH, M. E.; MCKERROW, J. H.; FLETTRICK, R. J.; CRAIK, C. S. Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 268, p. 6115-6118, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8454586/>. Acesso em: 06 jul.2022.

EDWIN, W. Immunochemical Techniques for Detection and Identification of Microorganisms. In: JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; LANDRY, M. L.; RICHTER, S. S.; WARNOCK, D. W. (eds). **Manual of Clinical Microbiology**. 11th. ed. American Society of Microbiology, 2015, p. 186-212.

EMBRAPA. Açaizeiro. In: AGROVETERINÁRIA, 2013. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/957620/acai-azeizeiro>. Acesso em: 02 maio 2023.

FERNANDES, A. P.; NELSON, K.; BEVERLEY, S. M. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origin of

parasitism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 11608-11612, 1993. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/90/24/11608>. Acesso em: 03 mai. 2022.

FERREIRA R. R.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, F. L.; FERRÃO, P. M.; GOMES, H. F.; LIMA, M. L.; MEUSER-BATISTA, M.; BAILY, S.; FEIGE, J. J.; JORGE, T. C. A.; WAGHABI, M. C. Proteins involved on TGF- pathway are up-regulated during the acute phase of experimental Chagas disease. **Immunobiology**, Jena, v. 221, n. 5, p. 587-594, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26852285/>. Acesso em: 25 jan. 2021.

FERREIRA, L. F. C.; MONTEIRO, M. A. R. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): a tropical fruit with high levels of essential minerals - a review. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 1-11, 2018. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612018005002101&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 03 mai. 2023.

FERREIRA, I. O. R.; JESUS, G. A.; PEREIRA, D. D.; ANDRADE, L. F. A.; BIZZO, H. R.; BRAGA, A. R. C.; SILVA, R. R.; MIRANDA, C. R.; MAGALHÃES, L. G.; CAMPOS, R. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; ASSIS, L. M.; FELICIO, R. C.; GODOY, R. L. O.; SILVA, R. A.; CARVALHO, J. E. Uso e conservação de recursos genéticos de plantas na Amazônia. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 347 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1115095>. Acesso em: 02 maio 2023.

FERREIRA, L. F.; BRITO, C. F. A.; CARDOSO, M. A. Doença de Chagas: 100 anos de história. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, Suppl 2, p. 3-4, 2011. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000800002. Acesso em: 11 abr. 2023.

FERREIRA, L. F.; JANSEN, A. M.; ARAÚJO, A. Chagas disease in prehistory. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 83, n. 3, p. 1041-1044, 2011a. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/XxsXDr39dqc7HFbBWbsNL9q/?lang=en>. Acesso em: 05 fev. 2023.

FERREIRA, R. T. B.; BRANQUINHO, M. R.; LEITE, P. C. 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, 2-14. 2014. DOI: 10.3395/VD.V2I4.358. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/9712/2/Vig_Sanit_Debate_2_4-11.pdf. Acesso em: 29 de nov. 2020.

FIEAM. Informações gerais sobre o açaí. Federação das Indústrias do Estado do Amazonas, 2013.

FLORES-FERRER, A. O.; MARCOU, E.; WALECKX, E.; DUMONTEIL, S.; GOUBIÈRE. Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need? **Evol. Appl.** v. 11, n. 4, p. 470-487, 2017. doi: 10.1111/eva.12582.eCollection 2018 Apr.11: 470-487. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5891055/>. Acesso em: 04 jan.2021.

- FOCACCIA, R. et al. **Medicina Tropical**: Abordagem Prática. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2014.
- FRANCO, J. R.; SIMPSON, A. J.; MONCAYO, Á. Chagas disease: a continuing burden on Latin America. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 10, e0007617, 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007617>. Acesso em: 11 abr. 2023.
- GASPE, M. S.; PROVECHO, Y. F.; CARDINAL, M. V.; FERNÁNDEZ, M. P.; DELPONTE, M. G.; KLEIN, E.; ENRIQUEZ, G. F. Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 4, p. 824-831, 2010. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/83/4/article-p824.xml>. Acesso em: 11 abr. 2023.
- GLASSER, E. J.; GOMES, M. L.; CORBETT, C. E. P.; PEREIRA, J. B. Estudos sobre a doença de Chagas. I. Isolamento de um *Trypanosoma* da corrente circulatória de um paciente com a forma aguda da moléstia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 20, n. 1, p. 3-13, 1927. Disponível em: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/article/download/2222/2916>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- GONÇALVES, M. P.; UMEZAWA, E. S.; KATZIN, A. M.; ZINGALES, B.; ALVES, M. J. M.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi* : derramamento de antígenos de superfície como vesículas de membrana. **Exp. Parasitol.** v. 72, p. 43-53, 1991. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/interacao/>. Acesso em: 08 dez. 2022.
- GONTIJO, E. D.; ANDRADE, G. M. Q.; SANTOS, S. L.; GALVÃO, L. M. C.; MOREIRA, E. F.; PINTO, F. S.; DIAS, J. C. P.; JANUÁRIO, J. N. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. **Revista Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 18, n. 3, p. 243-245. 2009. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v18n3/v18n3a07.pdf>. Acesso em: 04 de nov. 2020.
- GROSS, J.; HARROWER, T.; HALDER, T. et al. Antibody control in the detection of circulating antigens. **Nat Methods** v. 6, p. 204-206, 2009. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1307>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmeth.1307>. Acesso em: 12 de abril de 2023.
- HOLF, D. F.; FARRAR, P. L.; KRATZ-OWENS, K.; SHAFFER, D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. **Infect Immun.** v. 64, n. 9, p. 3800-10, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8751932/>. Acesso em: 25 dez. 2021.
- JABERI-DELIVERY, M.; JAFARIZADEH-MALIKAH, M.; ZEINALI, M.; KHODABAKHSH, A.; KARAMI, C.; POUROZMANNESH, M.; AZIMZADEH, A. Development and optimization of dot blot immunoassay for the rapid detection of human serum albumin. **BioMed Res. Int.**, v. 2020, p. 1-6, 2020. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/1326053/>. Acesso em: 29 abr. 2023.
- JOINER, K. A.; DIAS DA SILVA, W.; RIMOLDI, M. T.; HAMMER, C. H.; SHER, A.; KIPNIS, T.L. Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes

of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. **J. Biol. Chem.** v. 263, n. 23, p. 11327–11335, 1988. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818379626>. Acesso em: 29 nov. 2022.

KROPF, SIMONE PETRAGLIA; SÀ, MAGALI ROMERO. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **Hist. Cienc. Saude-Manguinhos**. Rio de Janeiro, v.16, supl. 1, p.13-34, jul. 2009, Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hcsm/a/5CLtpKKWctKjWqFpz78mX9f/abstract/?lang=en> Acesso em: 11 dez. 2021.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5432063/>. Acesso em: 07 nov 2022.

LENT, H; WYGODZINSKY, P.W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. . **Bulletin of the American museum of Natural History**, v. 163, n. 3, p. 123-520, 1979. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19822902845>. Acesso em:14 jul. 2020.

LEMOS, A. M. A.; PEREIRA, A. A.; PEREIRA, M. G.; PEREIRA, J. A. Variabilidade genética em populações de açaieiro avaliadas por descritores morfoagronômicos e moleculares. **Pesq. Agropec. Bras.** Brasília, v. 50, n. 12, p. 1175-1183, dez. 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/nBYx5p7qMJFT6JPWw6kzvwh/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 02 maio 2023.

LEWIS, M. D.; MA, J.; YEO, M.; CARRASCO, H. J.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* : Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 6, p. 1041-1049, 2009. Disponível em: doi: 10.4269/ajtmh.2009.09-0305. <file:///C:/Users/Usuario/Desktop/0002-9637-article-p1041.pdf>. Acesso em: 26 dez. 2022.

LIMA, A. P. C. A; DOS REIS, F. C. G.; SERVEAU, C; LALMANCH, G; JULIANO, L; MENARD, R; VERNET, T; THOMAS, D. Y; STORER, A; SCHARFSTEIN, J. Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors, **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 114, n. 1, p. 41-52, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11356512/>. Acesso em: 27 mar. 2021.

LIMA, A. P.; TESSIER, D. C.; THOMAS, D. Y.; SCHARFSTEIN, J.; STORER, A. C.; VERNET, T. Identificação de novas isoformas do gene da cisteína protease em *Trypanosoma cruzi* . **Mol. Biochem. Parasitol**. v. 67, p. 333–338, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7870137/>. Acesso em: 24 jan. 2021.

MACHADO. M. O. **Análise do secretoma/excretoma da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi***. Tese, Brasília, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/14105>. Acesso em: 26 nov. 2022.

- MALAGA, S; YOSHIDA, N. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. **Infect Immun.** v. 69, n. 1, p. 353-359, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11119524/>. Acesso em: 31 dez. 2021
- MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. **Epidemiol Infect** 2007;136(9):1153-64. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2870925/>. Acesso em: 04 de out. 2020.
- MATTOS, E. C. **Associação de métodos para detecção de *Trypanosoma cruzi* em alimentos.** Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <https://ses.sp.bvs.br/lildbi/docsonline/get.php?id=6540>. Acesso em: 11 dez. 2019.
- MCGRATH, M. E.; EAKIN, A. E.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. The crystal structure of cruzain - a therapeutic target for Chagas disease. **J. Mol. Biol.**, v. 247, n. 2, p. 251-259, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283695701882>. Acesso em: 03 de maio de 2022.
- MEIRELLES, P. G; BIAZON, L; ONO, M. A; HIROOKA, E. Y; ONO, E. Y. S. Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 613-627, outubro-diciembre, 2006. Universidade Estadual de Londrina Londrina, Brasil. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744082016.pdf>. Acesso em: 06 fev. 2022.
- MENDES, J. S.; MENEZES, F. T.; ANDRADE, C. A. D.; MOREIRA, G. M. S. G.; PAULA, A. M. D.; GONÇALVES, R. V. Dot-blot assay using gold nanoparticles for detection of botulinum neurotoxin serotype A. **Sensors Actuators B Chem**, v. 330, p. 1-6, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400521000908>. Acesso em: 29 abr. 2023.
- MENDES, E. V. Desafios do SUS. Brasília, DF: CONASS, 2019. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/08/1104190/desafios-do-sus.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2022.
- MILLER, J. H. **Experiments in Molecular Genetics.** New York, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. Disponível em: https://openlibrary.org/books/OL5298363M/Experiments_in_molecular_genetics. Acesso em: 29 out. 2020
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Técnico para o Diagnóstico da Doença de Chagas.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_doencachagas.pdf. Acesso em: 02 abr. 2023. Página 38.
- MOLINA, I. et al. Chagas disease: a review. **The Lancet**, v. 383, n. 9920, p. 899-912, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067361362733X>. Acesso em: 11 abr. 2023.

MONCAYO, Á. et al. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000500001. Acesso em: 11 abr. 2023.

MOURÃO, O. G.; CHIARI, E. Comprovação parasitológica na fase crônica da doença de Chagas por hemoculturas em meio "LIT". **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online]. v. 9, n. 5, 1975. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/VcVVnppqqzX9Qdk63qTgjLS/?lang=pt>. Acesso em: 06 jan. 2021.

MURTA, A. C.; PERSECHINI, P. M.; PADRON, T. S.; SOUZA, W.; GUIMARÃES, J. A.; SCHARFSTEIN, J. Identificação estrutural e funcional do antígeno GP57/51 do *Trypanosoma cruzi* como uma cisteína proteinase. **Mol. Bioquímica. Parasitol.** v. 43, p. 27–38, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1705310/>. Acesso em: 05 fev. 2021.

NATTAN-LARRIER, L. Infections à Trypanosomes et voies de penetrations des virus. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 14, p. 537-542, 1921. Disponível em: <https://www.biusante.parisdescartes.fr/sfhm/hsm/HSMx1921x014x01/HSMx1921x014x01x0537.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2023.

NAUEN, R. Perspective insecticide resistance in disease vectors of public health importance. **Pest Manag Sci** v. 63, p. 628-633, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ps.1393>. Acesso em: 12 abr. 2023.

NOGUEIRA, K. S. **Avaliação do metabolismo energético *in vitro* de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* pré e pós tratamento específico com benzonidazol**. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Biologia Das relações Parasito-Hospedeiro. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/8204/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Kamilla%20Soares%20Nogueira%20-%202015.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2020.

PAHO / WHO. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. Washington, D.C. 2019. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49653/9789275120439_eng.pdf?sequence=6&isAllowed=y. Acesso em: 16 dez. 2019.

PAHO. 70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas. 13 abr 2021. Disponível e: <https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas>. Acesso em: 30 jul. 2021.

PAHO/WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **World Health Organization**. Genebra, v.90, n. 6, p33-44. 2015, disponível em: <https://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1>. Acesso em: 11 dez. 2019.

PASSOS, L. A. C.; GUARALDO, A. M. A.; BARBOSA, R. L.; DIAS, V. L.; PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; FRANCO, R. M. B.; ALVES, D. P. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*.

Epidemiol. Serv. Saúde. Brasília, v. 21, n.2, p.223-232, abr-jun 2012. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v21n2/v21n2a05.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2019.

RASSI, A; NETO, V. A; SIQUEIRA, A. F; FILHO, F. F; AMATO, V. S; RASSI, G. G; JUNIOR, A. R. Tratamento da fase crônica da doença de Chagas com Nifurtinox associado a corticoide. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 35, n. 6, p. 547-550, nov-dez, 2002. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/fMdtRXBzFzG6JYjDf8XSfhg/?lang=pt&format=pdf>.

Acesso em: 22 abril. 2021.

RASSI Jr, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet.** v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(10\)60061-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(10)60061-X/fulltext). Acesso em: 02 maio 2023.

PÉREZ-MORALES, D.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, I.; SERRANO-MIRANDA, E.; CAZARES-RODRÍGUEZ, R.; MARTÍNEZ-GORDILLO, M. N.; VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J. C.; GÓMEZ-ALBINO, I.; RENDÓN-FRANCO, E. A simple dot-blot assay for serological detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 112, n. 2, p. 122-128, 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5305248/>. Acesso em: 29 abr. 2023.

RIBEIRO, V.; CASTRO, K. M.; LOBATO, F. B.; KRAHENBUHL, M. P.; SILVA, R. A. Doença de Chagas: diagnóstico tardio e tratamento inadequado em uma comunidade ribeirinha da Amazônia brasileira **J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 32, n. 1, p. 81-85, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbdst/a/PqVgszW8Jrkvgc6ghrvdfGz/>.

Acesso em: 03 mai. 2023.

RIOS, A; RIBEIRO, M; SOUSA, A. PIMENTEL, F.; HAGTROM, L.; ANDRADE, R.; ALVES, R. M.; ROSA, A. C.; TEIXEIRA, A. RL.; NITZ, N.; HECHT, M.M. Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v.113, n.1, jan. 2018. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&nrm=iso&lng=pt&tlng=pt&pid=S0074-02762018000100003. Acesso em: 12 dez. 2019.

ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação.** Belém: EDUFPA, 2000. Disponível em: <https://www.worldcat.org/pt/title/acai-preparo-composicao-e-melhoramento-da-conservacao/oclc/709088258>. Acesso em: 15 jan.2022.

RUEDA, K; TRUJILLO, J. E; CARRANZO, J. C; VALLEJO, G. A. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* : a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. **Biomedica.** v. 34, n. 4, p. 631-41, 2014.

Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/mioc/a/Mk9d3zZYcYmMKbZ4yQhfp6y/?lang=en> Acesso em:

25 fev. 2020

SALERNO, R.; SALVATELLA, R.; ISSA, J.; ANZOLA, M. C. A regional fight against Chagas disease: lessons learned from a successful collaborative partnership. **Rev Panam Salud Publica.** v. 37, n. 1, p. 38-43, 2015. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25791186/>. Acesso em: 10 de nov. 2020.

SALGADO, J. A. O cenário de Carlos Chagas e a menina Berenice. **Men, Inst, Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 1-2, p. 193-195, 1980. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/LfPm3fzPWF6z8FY6kNVMw6C/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 06 jan. 2023.

SANTANA, R. A. G.; GUERRA, M. G. V. B.; SOUSA, D. R. et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**. Manaus, v.25, v.1, p. 132-135, jan 2019. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/1/18-0646_article. Acesso em: 05 dez. 2019.

SANTOS, F. L.; PEREIRA, C. R.; COSTA, M. A.; PEREIRA, G. A.; GONÇALVES, R. B.; SOUZA, M. F.; BRITO, M. A. Açaí na alimentação humana: um alimento funcional. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 72, n. 2, p. 93-104, 2013. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/revista/vol72_n2_artigo4.pdf. Acesso em: 03 mai. 2023.

SANTOS, J. R.; GOTO, R. L.; GOMES-RUFFI, C. R.; SILVA, P. R.; PINTO, L. C.; NAVES, M. M. A review on the potential human health benefits of the açaí fruit. **J. Food Sci. Technol**, v. 52, n. 6, p. 3159-3168, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4444475/>. Acesso em: 03 mai. 2023.

SANTOS, F. L.; CUNHA, A. M.; ROSSO, V. V.; KAWAKAMI, K. Y. Açaí na alimentação humana: um alimento funcional. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 72, n. 2, p. 93-104, 2013. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/revista/vol72_n2_artigo4.pdf. Acesso em: 03 mai. 2023.

SCHARFSTEIN, J; SCHECHTER, M; SENNA, M; PERALTA, J. M; MENDONÇA-PREVIATO, L; MILES, M. M. *Trypanosoma cruzi* : caracterização e isolamento de proteínas de superfície de 57/51.000 mw (GP 57/ 51) expressa por epimastigotas e tripomastigotas da corrente sanguínea. **J. Immunol**. v. 137, p. 1336–1341, 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3090146/>. Acesso em: 09 mar. 2023.

SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; MEJIA JARAMILLO, A. M.; ... & YADON, Z. E. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 1, e931, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0000931. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000931>. Acesso em: 11 de abril de 2023.

SCHNAPP, A. R.; EICKHOFF, C. S.; SIZEMORE, D.; CURTISS, R.; HOLFT, D. F. “A cruzipaina induz proteção mucosa e sistêmica contra o *Trypanosoma cruzi* em camundongos.” **Infect. Immun**. v. 70, n. 9, p. 5065-5074, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC128245/>. Acesso em: 30 de jul. 2021.

SCUBLINSKY, D.; PINONI, M. V.; IBELLI, F. et al. Formas clínicas y diagnóstico de la enfermedad de Chagas e inmunosupresores. **Revista Argentina de Reumatología**. Argentina, v.30, n.1, p.11-14, mar 2019. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/pdf/reuma/v30n1/v30n1a03.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2019.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral Transmission of Chagas Disease. **Emerg. Infect.** São Paulo, v. 54, n.6 p.845-852, mar 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/221741330_Oral_Transmission_of_Chagas_Disease/link/55a6cb2308ae92aac77f4cf2/download. Acesso em: 09 dez .2019.

SILVA, E. O.; NUSSENZWEIG, V. S. Sobre uma cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clinica et Biologica**, v. 20, p. 191-207, 1953. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0015-56811953000200006. Acesso em: 29 abr. 2023.

SOUZA, W; VIDAL, J. Cultivo: Meio axênico. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. FIOCRUZ. Rio de Janeiro, jun 2017. Site. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/ciclo-evolutivo/>. Acesso em: 13 fev. 2020.

STAQUICINI, D. I; MARTINS, R.M; MACEDO, S; SASSO, G. R; ATAYDE, V.D; JULIANO, M.A. Role of GP82 in the selective binding to gastric mucin during oral infection with *Trypanosoma cruzi* . **PLoS Negl Trop Dis**. v. 4, n. 3, e613, 2010. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000613>. Acesso em: 23 jan. 2022.

STEINDEL, M.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J. Doença de Chagas mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**, v. 37, n. 217, 2015. Disponível em: <http://www.dbm.ufpb.br/~marques/Artigos/chagas.pdf>. Acesso em: 28 dez. 2022.

STUDIER, F. W.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; DUBENDORFF, J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in enzymology**, v. 185, p. 60-89, 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799082034S>. Acesso em: 11 abr. 2023.

SULLEIRO, E.; SALVADOR, F.; SALAZAR, F. M.; SILGADO, A.; SERRE-DELCOR, N.; OLIVEIRA, I.; MOURE, Z.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; AZNAR, L.; GOTERRIS, L.; MOLINA, I.; PMAROLA, T. Aportaciones de las técnicas moleculares en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas en ausencia de tratamiento. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.** Barcelona, v. 38. n. 8, p. 356-360, 2020. doi: 10.1016/j.eimc.2020.01.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X20300045?via%3DiHub>. Acesso em: 10 de nov. 2020.

TEIXEIRA, A. R. L.; NISHIYAMA, A.; DE LIMA, R. S.; GAZZINELLI, R. T. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease: From Discovery to Control. **J Infect Dis.**, v. 204, n. 6, p. 1622-1630, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/204/6/1622/2175799>. Acesso em: 02 maio 2023.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. **Evolution**, v. 42, p. 277-292, 1988.

TORRICO, F.; ALONSO-VEGA, C.; SUAREZ, E.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, M.C.; DRAMAIX, M. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome,

morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **Am J trop Méd Hyg.** v. 70, n. 2, p. 201-209, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14993634/>. Acesso em: 06 de set. 2020.

TOSO, M. A; VIAL, U. F; GALANTI, N. [Oral transmission of Chagas' disease]. **Rev Med Chil.** v. 139, n. 2, p. 258-266, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22238161/#:~:text=Oral%20transmission%20of%20Chagas%20disease%20is%20considered%20when%20%E1%20acute,fluid%20sample%20from%20the%20patient>. Acesso em: 28 fev. 2020

UEHARA, L. Cruzipain Promotes *Trypanosoma cruzi* Adhesion to *Rhodnius prolixus* Midgut. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.6, n.12, e1958, 11p, Dec. 2012. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/16226>: Acesso em: 06 fev 2022.

WAGHABI, M. C. ; COUTINHO, C. M. L. M. ; SOEIRO, M. N. C. ; P, MCS ; FEIGE, J. J. ; KERAMIDAS, M. ; COSSON, A. ; MINOPRIO, P. ; LEUVEN, F. V. ; JORGE, T. A. . Increased *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high TGF-levels in mice deficient in alpha-2-macroglob. **Infect. Immun.** v. 70, n.9, p. 5115-5123, 2002.

WANG, X.; CHOI, N.; CHENG, Z.; KO, J.; CHEN, L.; CHOO, J. Simultaneous Detection of Dual Nucleic Acids Using a SERS-Based Lateral Flow Assay Biosensor. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 1163-1169, 2017. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03536. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.6b03536>. Acesso em: 29 abr. 2023.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2020. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1. Acesso em: 11 de abril de 2023.

WHO. **Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2016 estimates**. Geneva: World Health Organization, 2020. (WHO/HTM/NTD/IDM/2020.1). Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/333925/WHO-HTM-NTD-IDM-2020.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 11 abr. 2023.

WHO. 7th report of the World health expert comité on insecticides. (Série de Informes Técnicos, 125). Geneva; 1957.

WHO. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. World Health Organization. **Technical Report Series**, n. 905, p. 1-109, 2002. Disponível em: https://www.who.int/trypanosomiasis_african/resources/who_trs_905/en/. Acesso em: 03 mai. 2023.

WHO. The World Health Report 2003, annex 2. Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2003/en/Annex2-en.pdf> Acesso em: 05 de nov. 2020.

WHO. Vector resistance to pesticide. Expert Committee on vector biology and control. **Série de Informes Técnicos**, 818. Geneva: WHO, 1992

WISDOM, G. B. Enzyme-immunoassay. **Clin Chem.** v. 22, n. 8, p. 1243-1255, 1976. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/780003/>. Acesso em: 7 jan. 2023.

WU, S.; DUAN, N.; SHI, Z.; FANG, C.; WANG, Z. Simultaneous aptasensor for multiplex pathogenic bacteria detection based on multicolor upconversion nanoparticles labels. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 6, p. 3100-3107, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac404205c>. Acesso em: 12 abr. 2023.

WWF - WWF Brasil. Boas práticas de manejo, comercialização e beneficiamento dos frutos de açaí. Disponível em: http://www.angulo.com.br/madeira2015/downloads/pub_pdf_cartilha_acai.pdf. Acesso em: 09 de nov. 2020.

YOKODA-YASUNADA, J. K. U; PRAL, E. M. F; OLIVEIRA JR, O. C; ALFERI, S. C; STOLF, A. M. S. *Trypanosoma cruzi*: identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. **Acta Tropica** v. 57, p. 307–315, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7810387/>. Acesso em: 09 mar. 2023.

YOKOTA, D. H. Açaí sendo despulpado em máquina própria nas ruas de Belém, ao lado do Mercado do Ver-o-peso. Belém, 2004. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Despolpadeira_de_a%C3%A7ai.jpg. Acesso em: 25 jan. 2020.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 104, Suppl , p. 101-107, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19753464/#:~:text=Studies%20on%20oral%20Trypanosoma%20cruzi,and%20to%20target%20epithelial%20cells>. Acesso em: 02 dez, 2022.

YOSHIDA, N; TYLER, K, M; LLHEWELLYN, M. S. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. **Trends Parasitol**. v. 27, n. 10, p. 459-66, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21840261/>. Acesso em; 02 jan. 2021.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; FILHO, D. F. S.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M. J.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLHOS M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amaz., Manaus**, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011 . Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672011000400011&lng=en&nrm=iso>. access on 04 Dec. 2020.

ZINGALES, B.; ANDRANDE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MILES, A. M.; ROMANHA, A. J.; STURM, M. R.; TIBAYRENC, M. R.; SCHIJMAN, A.J. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 104, n.7, p.1051-1054, November 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v104n7/21.pdf>. Acesso em: 26 dez. 2019.

ANEXO I – PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Diagnóstico de Trypanosoma cruzi (kinetoplastida, trypanosomatidae) em suco de açaí (euterpe oleracea) por marcadores metabólitos e biomoléculas”**, registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR. 22/2020, sob a responsabilidade do pesquisador Alef Henrique Garcia, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 16 de dezembro de 2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Outubro de 2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de animais	120
Peso/idade	3-4 semanas / 20-30 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério central UNESP - Botucatu
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 22 de dezembro de 2020.

Prof. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros
Coordenadora da CEUA