



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

DIANA ZAPPAROLI

“Pesquisa da contaminação e avaliação da infectividade por *Trypanosoma cruzi* em polpas de açaí comercializadas em municípios do Estado de São Paulo”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Mattos dos Santos

**Botucatu- SP
2021**

DIANA ZAPPAROLI

“Pesquisa da contaminação e avaliação da infectividade por *Trypanosoma cruzi* em polpas de açaí comercializadas em municípios do Estado de São Paulo”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Mattos dos Santos

Botucatu- SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Zapparoli, Diana.

Pesquisa da contaminação e avaliação da infectividade por *Trypanosoma cruzi* em polpas de açaí comercializadas em municípios do Estado de São Paulo / Diana Zapparoli. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Coorientador: Rodrigo Mattos dos Santos

Capes: 40101096

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Chagas, Doença de. 3. Euterpe.
4. Diagnóstico. 5. Açaí.

Palavras-chave: Açaí; Diagnóstico; Doença de Chagas; Euterpe oleracea; *Trypanosoma cruzi*.

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos que apoiaram meus sonhos, acreditaram em mim e sempre ajudaram a manter-me focada em meus objetivos.

*Aos meus pais Símon e Paulo Roberto, ao meu irmão Paulo Diego, as
minhas avós Marlene, Ivanil,*

*Pelas sábias palavras em momentos delicados, pelas conversas, pelo apoio e
compreensão. Pela atenção e amor dedicados a mim. E por sempre me
encorajarem quando os caminhos se estreitavam durante esta jornada. E
também por sempre despertarem minha curiosidade, que hoje se tornou a
base para o meu conhecimento.*

Em especial a memória do meu Avô Geraldo,

Por deixar como legado grandes virtudes, o sábio silêncio e sua serenidade.

Por me acalmar mesmo agora sendo luz.

Agradecimentos

Primeiramente agradecer a Deus Pai, por permitir que eu fosse personagem da sua história, por ter escrito uma jornada de conhecimento e crescimento não apenas profissional e sim pessoal, ao qual não apenas escreveu, mas me capacitou para isso. Não poderia deixar de agradecer, em meio a pandemia, a saúde que concedeu não apenas a mim, mas a todos os envolvidos em minha vida científica e pessoal. Obrigada por me permitir viver a arte da VIDA.

Agradeço ao meu anjo da guarda, por me manter focada nos meus objetivos, por guiar os meus passos, e iluminar os meus caminhos. Por me mostrar a luz quando a dificuldade me cercava.

A minha orientadora Simone Baldini Lucheis, por toda a ajuda, por todo conhecimento transmitido e por toda orientação. Agradeço também ao meu co-orientador Rodrigo Mattos dos Santos, por ter me aconselhado a seguir este caminho, tão gratificante, e pelas colaborações científicas.

Agradeço à minha banca de qualificação, aos suplentes Erika Alessandra Pellison Nunes da Costa e Ricardo de Souza Cavalcante, e aos titulares Rinaldo Poncio Mendes e Cilmery Suemi Kurokawa pelas valiosas sugestões realizadas para o crescimento e melhora da dissertação.

Agradecer ao programa de pós-graduação em Doenças Tropicais pela oportunidade de colaborar com o avanço científico, através do meu egresso ao mestrado, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecer aos meus amigos que o mestrado me deu a oportunidade de conhecer e conviver. À Livia Maísa Giraldi e ao Wesley José dos Santos,

que me passaram toda a base do meu conhecimento prático preciso para esta pesquisa. À **Thainá Valente Bertozzo**, colega de faculdade e hoje parceira de bancada, por ser aquela luz no fim do túnel, quando tudo estava perdido eis que surgia a Tainá com uma gota de esperança, e também por ser minha parceira de comer doces e sair da dieta. À **Suzane Manzini**, por ser paciente e me passar calma, ter mãos de fada pra PCR e tanto me ajudar, e também comer docinhos comigo. À **Isabella Neves Aires**, por me socorrer sempre que precisei, pelas conversas descontraídas e pela torta de limão maravilhosa. À **Daniela Filadelfo Sanches** e à **Marcela Alexandrino**, por todos os momentos de descontração, todas as risadas, mas também por todo o auxílio com minhas camundongas, e lâminas.

Agradecer à minha amiga **Mariana Zanchetta**, e ao meu amigo **Jonas Atique Sawazaki**, pela companhia nas disciplinas, por tornar tudo mais leve e feliz, pelas boas conversas e por todos os almoços juntos.

Agradecer aos meus **famíliares**, que sempre estiveram comigo dia a dia, e me fizeram persistir em meu sonho, e alcançar assim meu objetivo, agradecer também os dias de descontração, tão necessários, para que a produtividade fosse impulsionada, por serem minha base, meu espelho e o meu tudo.

Nesta vida nada e nem ninguém é por acaso. Acredito que todos têm uma missão, até mesmo porque, Deus já sabia de todos esses encontros, ele me mostrou que nada é possível sozinho e que tudo tem valor quando agregado há outras pessoas.

A todos que contribuíram com seu conhecimento, ou auxílio para este trabalho ser concretizado, muito obrigada!

*“Aprenda com o ontem, viva para o hoje, esperança
para o amanhã. O importante é não parar de
questionar”*

(Albert Einstein)

Resumo

A doença de Chagas tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*). Segundo a Organização Mundial da Saúde, de sete a oito milhões de pessoas encontram-se infectadas com *T.cruzi*, tendo-se como principais vias de transmissão a vetorial e a oral, a qual tem assumido uma grande importância epidemiológica, tendo em vista a não obrigatoriedade da pasteurização da polpa de açaí. O presente trabalho visou pesquisar *T. cruzi* em 35 amostras de sorvete de açaí comercializados em 11 diferentes pontos de venda da região de Botucatu-SP, bem como realizar a inoculação via gavagem de amostras de açaí em modelo murino. Para estes objetivos, as alíquotas de polpas de açaí foram submetidas ao método de tamisação direta e visualização sob microscopia óptica, sendo analisadas sob diferentes temperaturas de armazenamento e em diferentes períodos. Análises moleculares pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) com os *primers* 121/122 e V7/V8 para *T.cruzi*, foram realizadas a partir das 35 amostras de açaí. Pela tamisação direta verificou-se uma (01) amostra positiva (2,86%), pela leitura das seis horas em temperatura ambiente, porém sem motilidade, a qual não se confirmou pela técnica molecular de PCR utilizando-se os *primers* 121/122 e V7/V8, para *T. cruzi*. No entanto, duas amostras de açaí (5,71%) e negativas à tamisação foram positivas à técnica de PCR com o uso do *primer* 121/122. Realizou-se a inoculação das amostras de açaí positivas à tamisação e à PCR, por via oral (gavagem) em camundongos Balb-C, a fim de se verificar a infectividade das amostras, tendo-se observado que, após período de incubação de 7 dias, a partir de microscopia direta em sangue e tecidos, verificou-se a presença de formas amastigotas em língua e formas tripomastigotas em esfregaço sanguíneo nos grupos de camundongos que receberam as amostras de açaí positivas à tamisação ou à PCR, o que indica a sua capacidade de produzir a infecção *in vivo* nos camundongos. Desta forma, reforça-se a importância da pasteurização do açaí, já que, até o momento, não há legislação que obrigue a pasteurização deste fruto comercializado como sorvete, necessitando-se de um controle de qualidade e boas práticas de manufatura do mesmo, para o consumo seguro de produtos derivados do açaí.

Palavras-chave: doença de Chagas, diagnóstico, *Trypanosoma cruzi*, açaí, *Euterpe oleracea*.

Abstract

The etiological agent of Chagas disease is the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). According to the World Health Organization, between seven and eight million people are infected with *T. cruzi*, with the main routes of transmission being vectorial and oral, which has assumed great epidemiological importance, in view of the açai pulp pasteurization is not mandatory. The present work aimed to research *T. cruzi* in 35 samples of açai ice cream marketed in 11 different points of sale in the region of Botucatu-SP, as well as to carry out the inoculation via gavage of açai samples in a murine model. For these purposes, the açai pulp aliquots were submitted to the forced sieving technique and visualization under optical microscopy, being analyzed under different storage temperatures and in different periods. Molecular analyzes using the conventional Polymerase Chain Reaction technique (cPCR) with *primers* 121/122 and V7/V8 for *T. cruzi*, were carried out from 35 açai samples. By forced sieving, one (01) positive sample (2.86%) was verified, by reading at six hours at room temperature, but without motility, which was not confirmed by the molecular PCR technique using *primers* 121/122 and V7/V8, for *T. cruzi*. However, two samples of açai (5.71%) that were negative by forced sieving were positive by the PCR technique using *primer* 121/122. The inoculation of açai samples positive to forced sieving and PCR, orally (gavage) was carried out in Balb-C mice, in order to verify the infectivity of the samples. After seven days, it was observed from direct microscopy in blood and tissues, the presence of amastigote forms in the tongue and trypomastigote forms in blood smears in the groups of mice that received the açai samples positive to forced sieving or PCR, which indicates its ability to produce infection *in vivo* in mice. In this way, the importance of pasteurization of açai is reinforced, since, to date, there is no legislation that requires the pasteurization of this fruit sold as ice cream, requiring quality control and good manufacturing practices, to the safe consumption of derived açai products.

Keywords: Chagas disease, diagnosis, *Trypanosoma cruzi*, açai, *Euterpe oleracea*.

Lista de figuras

Figura 1: Testes diagnósticos para a doença de Chagas segundo períodos de infecção	26
Figura 2: Municípios do Estado de São Paulo selecionados para compra de açaí e pesquisa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Figura 3: Processo de tamisação das amostras de açaí. Colunas de filtração prontas para tamisação, com algodão ortopédico e microesfera de aço (A). Adição da amostra de açaí à coluna de filtração (B). Obtenção de eluato de açaí pela técnica de tamisação forçada (C).	37
Figura 4: Obtenção do controle positivo. Aspiração de 5mL de açaí pasteurizado para obtenção de eluato (A). Adição do eluato de açaí ao tubo de centrifugação (B). Contaminação do açaí com cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> (C). Homogeneização do eluato de açaí contaminado com <i>T. cruzi</i> (cepa Y) (D). Distribuição do eluato contaminado com cepa Y de <i>T. cruzi</i> em microtubos estéreis e livres de DNase e RNase (E).	41
Figura 5: Gavagem em camundongo Balb/C. Inoculação de amostra de açaí para avaliação da infectividade de <i>T. cruzi</i>	42
Figura 6: Acondicionamento dos camundongos. Cada grupo de camundongo em uma caixa (A). Em cada caixa foram acondicionados três (03) camundongos, os quais receberam água e ração <i>ad libitum</i> (B).	43
Figura 7: Retirada de órgãos e sangue por punção cardíaca a partir de um grupo amostral de camundongo (A e B); Órgãos retirados dos camundongos: fígado, baço, coração e língua (C); Seringa contendo aproximadamente 1 mL de sangue (D).	44
Figura 8: Corte diagonal de órgão (A). <i>Imprint</i> de órgão em lâmina de microscopia (B). Procedimento realizado para todos os camundongos de todos os grupos, com órgãos e esfregaço sanguíneo (C).	45
Figura 9: Fixação das lâminas com Metanol (A). Coloração com Giemsa (B).	45
Figura 10: Aspectos microscópicos de eluato de amostras de açaí para pesquisa de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . Notar as diferenças entre os aspectos de visualização da amostra A (poucas sujidades) e B (muitas sujidades)	50
Figura 11: Visualização de forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> em amostra de açaí, pelo método direto de tamisação forçada – microscopia óptica (1000X).	51

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose a 2% para os iniciadores 121/122 (~350pb) para <i>Trypanosoma cruzi</i> . Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 2 e 3 – amostras amplificadas; 4 – controle positivo (<i>Trypanosoma cruzi</i>); 5 – controle negativo (água ultrapura).	53
Figura 13: Visualizações microscópicas de <i>imprints</i> de órgãos de camundongos previamente infectados com amostras de açaí. Figuras de A a E, referentes ao Grupo 1 , controle positivo, o qual recebeu açaí contaminado com cepa Y de <i>T.cruzi</i> . <i>Imprint</i> de fígado, apresentando células rompidas liberando formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> , bem como de células ainda não rompidas (A e B). Esfregaço de sangue, apresentando formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (C e D). <i>Imprint</i> de língua, com a presença de formas amastigotas, como indicada na seta (E).....	55
Figura 14: Visualização microscópica de esfregaço sanguíneo de camundongo previamente infectado com açaí. Figura referente ao Grupo 3 , correspondente a camundongo infectado com amostra de açaí positiva à tamisação forçada - amostra 19). Pode-se notar formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	56
Figura 15: Visualizações microscópicas de esfregaço sanguíneo e de <i>imprint</i> de língua de camundongo previamente infectado com açaí. Figuras A e B, referentes ao Grupo 4 , infectados com amostra 12 (positiva à PCR). Esfregaço sanguíneo, podendo-se verificar forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> , circulada (A). <i>Imprint</i> de língua, verificando-se forma amastigota de <i>T.cruzi</i> , circulada (B).....	56
Figura 16: Visualização microscópica de esfregaço sanguíneo de camundongo previamente infectado com açaí. Figura referente ao Grupo 5 , infectados com amostra de açaí positiva à PCR (amostra 13). Pode-se visualizar formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	57

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1: Mensuração em tonelada da produção do fruto de açaí no Brasil e nas regiões da Federação, nos anos de 2018 e 2019.	22
Quadro 2: Municípios de aquisição das amostras de açaí	36
Quadro 3: Iniciadores para <i>T.cruzi</i> a partir de amostras de açaí – Técnica de cPCR	39
Tabela 1: Comparação de médias entre grupos para os pesos de órgãos.	61
Tabela 2: Comparação de médias entre grupos para quantificação de DNA.	62

Sumário

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1.	Breve histórico. Dados epidemiológicos – infecção oral. Branqueamento e pasteurização do açaí - legislação	19
3	OBJETIVOS	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Comitê de Ética	33
4.2	Aquisição e caracterização das amostras de açaí para pesquisa de <i>Trypanosoma cruzi</i> e municípios de procedência	33
4.3	Pesquisa direta de <i>T. cruzi</i> nas amostras de açaí pela técnica de tamisação	36
4.3.1	Processo de tamisação forçada – método direto a partir de cada amostra de açaí	36
4.4	Pesquisa molecular – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
4.4.1	Extração de DNA para <i>T. cruzi</i>	37
4.4.2	Quantificação de DNA	38
4.4.3	Reação em Cadeia da Polimerase convencional- cPCR para <i>T. cruzi</i> a partir das amostras de açaí	38
4.4.3.1	Controles positivos para PCR	38
4.4.4	Procedimento cPCR	38
4.4.5	Eletroforese em gel de agarose	39
4.5	Inóculo, grupos experimentais e via de inoculação	40
4.5.1	Obtenção das amostras controle negativo e positivo para os testes experimentais – inoculação via oral de açaí	40
4.5.2	Grupos de camundongos (Anexo 7)	41
4.5.3	Eutanásia e retirada de órgãos	43
4.5.4	<i>Imprints</i>	44

4.5.5	Coloração de Giemsa e análise das lâminas	45
4.5.6	Preparo dos órgãos – Maceração de órgãos para extração de DNA	46
4.5.7	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – órgãos de camundongos	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Amostras de açaí – comercialização e legislação	48
5.2	Leitura direta – Microscopia óptica	49
5.3	PCR convencional – amostras de açaí	52
5.4	Grupos experimentais – Leitura em microscopia óptica dos esfregaços sanguíneos e <i>imprints</i> de órgãos de camundongos	54
5.5	PCR convencional - órgãos de camundongos	60
5.6	Análise estatística	60
6	CONCLUSÕES	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹	66
8	ANEXOS	77
8.1	Anexo 1: Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo (CEUA/FMB/Unesp).	77
8.2	Anexo 2: Protocolo de extração de DNA em tecidos - kit IllustraTissueTMgenomicPrep Mini Spin (GE Healthcare®)	78
8.3	Anexo 3: Quantificação de DNA a partir da extração das amostras de açaí comercializada.	79
8.4	Anexo 4: Meio de cultura- NNN-LIT	80
8.5	Anexo 5: Meio de cultura- LIT (LIVER INFUSION TRYPTOSE)	81
8.6	Anexo 6: Meio de cultura- 199	82
8.7	Anexo 7: Fluxograma dos grupos dos camundongos inoculados via gavagem com amostras de açaí	83
8.8	Anexo 8: Protocolo de extração do DNA em sangue - Kit comercial <i>Illustra Blood GenomicPrep</i> (GE Healthcare®).	84

8.1 Anexo: 9: Pesagem de órgãos (valores em gramas) de camundongos infectados experimentalmente com amostras de açaí positivas para *T.cruzi*. ____85

8.2 Anexo 10: Quantificação de DNA a partir de órgãos de camundongos infectados experimentalmente com amostras de açaí positivas para *T.cruzi*. ____86

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Na década de 90 a doença de Chagas (DC) ou Tripanosomíase Americana foi considerada a doença parasitária mais importante da América Latina, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015). De acordo com uma estimativa de 2006, cerca de 6 a 7 milhões de pessoas encontram-se infectadas no México e América Central, causando 12.500 mortes por ano e 41.200 novos casos anualmente (YASUDA, 2021).

A doença é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*), pertencente à família Trypanosomatidae e à classe Kinetoplastida, descrita em 1909 por Carlos Chagas, no interior de Minas Gerais.

A DC tem como vetor o triatomíneo hematófago, popularmente conhecido como “barbeiro”, pertencente à família Triatominae. Os principais vetores pertencem às espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*, bem como *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma sordida* (CARDOSO et al, 2006). Segundo a Diretoria de Combate a Vetores, durante os períodos de janeiro de 2014 e março de 2015, as espécies de triatomíneos mais comuns que foram encontradas no Estado de São Paulo foram *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus*, principais responsáveis pela transmissão vetorial (SUCEN, 2016).

A DC é endêmica em 21 países das Américas; estima-se oito milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, causando mais de 10.000 mortes por ano, principalmente na América Latina. No Brasil há de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi*. Segundo o último Boletim Epidemiológico de 2019, foram notificados, apenas em 2018, 4.685 indivíduos suspeitos com doença de Chagas em fase aguda, tendo sido confirmada em 380 pacientes. A região Norte registrou uma proporção de 92,1%, a maior do país (BRASIL, 2019a; Santos et al., 2020).

Os parasitas desenvolvem-se na porção posterior dos triatomíneos e são transmitidos pelas fezes e urina, recebendo o nome de tripomastigotas metacíclicos, que constituem a forma infectante. A infecção ocorre durante o repasto sanguíneo quando, ao coçar a picada do barbeiro, as formas tripomastigotas atingem as mucosas via corrente sanguínea, adentram as células do sistema fagocítico monocitário (SFM), principalmente os macrófagos, transformando-se em formas amastigotas, principalmente em fígado e baço. Estas multiplicam-se e diferenciam-se em tripomastigotas novamente, invadindo a circulação. Caso haja um novo repasto sanguíneo, de um vetor não infectado, inicia-se o ciclo de vida nos invertebrados. Após a absorção das formas tripomastigotas, estas transformam-se em epimastigotas,

formas não infectantes (encontradas no tubo digestivo do vetor, possuindo cinetoplasto junto ao núcleo, flagelo e membrana 12 ondulante), multiplicando-se e diferenciando-se novamente em tripomastigotas, as quais serão novamente eliminadas sob a forma de tripomastigotas metacíclicas em fezes e urina (NASCIMENTO, 2015).

As principais formas de transmissão da DC são a via vetorial e oral, podendo ser ocasionada também pela via congênita (vertical); via transfusional; transplante de órgãos; ou por acidentes laboratoriais. Nos últimos anos ocorreu uma mudança no perfil epidemiológico de transmissão da doença de Chagas, tendo-se verificado uma intensificação no combate dos vetores empreendidas a quatro décadas, logo a via de transmissão mais comum passou a ser a via oral ao invés da via vetorial (DIAS et al, 2016).

O vetor tem como habitat alimentos como o palmito, cana-de-açúcar, babaçu, jaci (coquinho), açaí e bacaba, os quais são comercializados e consumidos muitas vezes de forma inadequada (BRASIL, 2017a). Portanto, observa-se uma intensificação no número de casos de DC aguda pelo consumo destes alimentos, produzidos de maneira artesanal e sem a fiscalização sanitária para a sua comercialização.

Segundo um estudo realizado de 2000 a 2013, verificou-se um total de 1.570 casos de DC aguda registrados no Brasil, sendo 1.081 casos por transmissão oral, 100 por transmissão vetorial e apenas seis por transmissão vertical (BRASIL, 2015; DIAS et al., 2015).

Desta forma, considerando-se a popularização do consumo de açaí de forma *in natura* (não pasteurizada), bem como devido à falta de pesquisas sobre a contaminação deste alimento com *T. cruzi* e comercializado em diferentes municípios do Estado de São Paulo, propõe-se o presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Breve histórico. Dados epidemiológicos – infecção oral. Branqueamento e pasteurização do açaí - legislação

O primeiro caso de infecção via oral, humana, foi investigada na Argentina por Mazza et al (1936), pela ingestão de leite materno. Salvador Mazza era médico sanitarista argentino, o qual dedicou boa parte da sua vida profissional para estudar DC, e destacou-se na luta contra esta enfermidade, completando os estudos realizados por Carlos Chagas. Em 1926, a Faculdade de Medicina, a qual era vinculado na época, estabeleceu a Missão de Estudos da Patologia Regional

Argentina (MEPRA), conhecida também como missão Mazza, O instituto MEPRA foi responsável por estudar doenças desconhecidas no Norte da Argentina, incluindo DC.

O primeiro caso reportado de um surto de DC aguda por infecção via oral foi diagnosticado em 1965 na cidade de Teutônia, município de Estrela – Rio Grande do Sul (COURA, 1966; SILVA et al, 1968).

Até o ano de 2004, a via oral era pouco investigada, e ganhou importância após um surto registrado no município de Navegantes, estado de Santa Catarina, no ano de 2005 (BRASIL, 2005a). Neste episódio registrou-se 31 pessoas infectadas e cinco óbitos, fato que segundo Steindel (2008) e Dias (2015), aumentou significativamente a porcentagem do número de óbitos registrados em 20%.

Outros surtos de DC aguda foram registrados: no Maranhão, com 39 pacientes acometidos, devido à ingestão de suco de bacaba em um evento local, no qual a fruta era manipulada de forma artesanal, sem higienização (SIMÕES NETO et al., 2018). Mais recentemente, relatou-se um surto de contaminação oral pelo consumo de açaí na região Amazônica, envolvendo dez pacientes, tendo-se encontrado *T. cruzi* tanto no sangue dos pacientes quanto no suco de açaí (SANTANA et al., 2019).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2020a), foram registrados 132 surtos de DC aguda no estado do Pará, 12 no Amapá, três no Amazonas, três em Tocantins, dois no Maranhão, um no Acre e um no Rio Grande do Norte.

No Rio de Janeiro, verificou-se que, de 140 amostras de produtos de açaí comercializados em feiras e supermercados, 14 (10%) apresentavam DNA de *T. cruzi* (FERREIRA et al., 2018a).

Um dos poucos estudos relatado na literatura, de Barbosa et al (2019) analisando amostras *in natura* de açaí procedido de Belém (Pará), inoculadas em modelos murinos, verificaram que o consumo de tal produto foi capaz de ocasionar casos de DC aguda, inclusive com óbito entre 17 e 52 dias após a infecção experimental.

Outros dados de grande importância publicados pelo Ministério da Saúde, referente a um estudo de 2007 a 2016, descrevem que, das transmissões ocorridas no país, 69% foram por via oral, esta que prossegue atualmente sendo a principal via de infecção, sendo responsável por 87% dos casos no ano 2018 (BRASIL, 2015, 2019a).

Segundo dados publicados pelo Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (BRASIL, 2021) em 2020 foram registrados 146 casos de doença de Chagas no Brasil, tendo-se 75,34% dos casos pela via oral, 6,85% pela via vetorial, 15,07% ignoradas, e outras vias 2,74%.

Houve uma redução de 47% na notificação de casos suspeitos de fase aguda e 63% de casos confirmados por DCA em 2020 em relação a 2019. Entretanto, a maior distribuição, cerca de 84%, concentra-se na região Norte. Destes, o estado do Pará é responsável por 71% dos casos. Em relação às principais formas prováveis de transmissão ocorridas no país, 76% foram por transmissão oral, 8% por transmissão vetorial e em 15% não foi identificada a forma de transmissão (Brasil, 2021).

O açaí (*Euterpe oleracea*) é um fruto típico e popular da região do norte do Brasil, que nos últimos anos ganhou importância devido aos benefícios para a saúde, associados à sua composição fitoquímica e capacidade antioxidante.

O Brasil é um grande produtor do fruto do açaí, consumidor e o maior exportador da polpa de açaí congelada. O Pará é o maior produtor de açaí, responsável por mais de 90% da produção nacional, sendo que 60% permanecem no Estado. No âmbito nacional, os outros 35% destinam-se a outras regiões como São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro e, para exportação 5%; do total exportado, 70% foi destinado para os Estados Unidos, Alemanha, Bélgica e Holanda, respectivamente, nos anos de 2019 (CONAB, 2019).

Outros estados, como Amazonas e Maranhão, são o segundo e terceiro maiores produtores de açaí. Porém, tratando-se do volume de exportação, o Estado de São Paulo tem saído à frente, respectivamente, do Pará, Amapá, Minas Gerais e Pernambuco nos anos de 2018 e 2019. Esses são dados da colheita principal, porém existe a colheita da entressafra por exemplo, em que o estado do Amapá tem sua produção de dezembro a abril, Amazonas de março a julho e o estado do Maranhão, de janeiro a maio (HOMMA et al., 2006; CONAB 2019). Mais recentemente, dados fornecidos pelo IBGE mostram o crescimento de produção (por toneladas) do Brasil e das regiões Norte, Nordeste e Sudeste, além de detalhar a produção (por tonelada) dos Estados (Quadro 1):

Quadro 1: Mensuração em tonelada da produção do fruto de açaí no Brasil e nas regiões da Federação, nos anos de 2018 e 2019.

Variável – Quantidade produzida (Tonelada)			
Produto das lavouras temporárias e permanentes - Açaí			
Brasil e Grande Região		Ano	
		2018	2019
1	Brasil	1.301.472	1.398.928
2	Norte	1.296.435	1.395.141
3	Nordeste	2.859	2.997
4	Sudeste	178	190
5	Centro-Oeste	-	-
6	Sul	-	-
Unidade da Federação			
1	Pará	1.230.699	1.320.150
2	Amazonas	62.329	67.757
3	Maranhão	742	751

Fonte: IBGE- Produção Agrícola Municipal, modificado*

Centro-Oeste e Sul não consta dados.

Ainda, segundo análise realizada pelo Conab (2019), estima-se que o Pará consoma cerca de 300 mil toneladas de açaí anualmente. Para fora do estado paraense, cerca de 150 toneladas de açaí são consumidas anualmente no estado de São Paulo, 500 toneladas no Rio de Janeiro e 200 toneladas nos demais estados brasileiros; além disso, ocorre expansão da comercialização de açaí para outros 16 países, como EUA, Alemanha, Bélgica e Holanda.

Os EUA foi o país de maior consumo de açaí em 2018, liderando com 40% do consumo total, e em 2019 recebendo 70% do total da polpa de açaí exportada, para

assim produzir alimentos energéticos, sobremesas, medicamentos, suplemento alimentar e nutracêuticos; todos esses movimentos que o mercado do açaí gera, seja ele interno ou externo, faz parte no que chamamos de escoamento da produção e formando-se assim a rota do ouro roxo (TAVARES e HOMMA, 2015; CONAB, 2019).

Logo, verifica-se uma tendência para que a via oral seja de maior prevalência para a infecção, já que se observam notificações de casos agudos devido a ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, principalmente pelo caldo de cana de açúcar (CARDOSO et al, 2006; VARGAS et al., 2018) e açaí (BARBOSA et al., 2019).

Devido à popularização do consumo de açaí e ao número crescente dos casos de infecção via oral, o esperado seria a fiscalização rigorosa na produção, como é o caso da pasteurização ou branqueamento, para assegurar aos consumidores um alimento de boa qualidade.

O processo chamado branqueamento é aplicado logo após a colheita, seleção e lavagem dos frutos de açaí, que pode ser realizado através de vapor ou água quente, sendo esta última a mais utilizada, o qual consiste em mergulhar o fruto em água aquecida à 80°C durante 10 segundos e, logo após, imergido em banho de água e gelo, sendo resfriada a temperatura ambiente, garantindo a inativação do *T. cruzi*, mas também inativando enzimas e, conseqüentemente, conservando a textura e coloração natural; as desvantagens principais é o possível sabor de cozimento e perda de nutrientes ; outro processo chama-se pasteurização, cujo método consiste no aquecimento da polpa de açaí entre 80 e 90°C e congelada imediatamente a -20°C (congelamento), de modo que o parasita não resista à mudança brusca de temperatura tornando-se inviável; porém devido a pasteurização, a cor roxa-avermelhada natural do açaí pode ser perdida devido ao processo, além de exigir equipamentos de congelamento adequados. Importante salientar que, somente o resfriamento ou congelamento não previne a transmissão oral pelo *T. cruzi* (OPAS, 2009; FERREIRA et al, 2016a; PASSOS et al, 2012).

Porém, a falta de obrigatoriedade do processo de pasteurização do produto tem gerado danos, tanto para a saúde pública quanto para os consumidores, devido ao fato de existir apenas leis que incentivam a pasteurização do açaí, como o projeto de lei nº6672/2016, que institui a Política Nacional de incentivo à produção e pasteurização da polpa de Açaí-PNA, cujo projeto foi arquivado no fim de janeiro de 2019, e logo no mês de março de 2019 foi feito um requerimento para desarquivamento, e seu status encontra-se tramitando em conjunto (BRASIL, 2017b). Esta situação pendente perante a legislação justifica o aumento dos dados estatísticos em relação à contaminação via oral, sendo o Brasil responsável por 69%

dos casos por esta via de contaminação (BRASIL, 2017b). O único projeto de lei que apresentava a possibilidade da obrigatoriedade da pasteurização era o PL nº178/2010, divulgado no endereço eletrônico do Senado Federal, que dispõe da obrigatoriedade da pasteurização do açaí para se evitar a contaminação e punição a quem comercializar a polpa de açaí não pasteurizada com multa, podendo até incluir prestação de serviços comunitários ou interdição do estabelecimento; no entanto, em 10/08/2010 tal projeto foi rejeitado por Comissão, em decisão terminativa; logo, esta tramitação encontra-se atualmente encerrada (BRASIL, 2010a).

Por outro lado, há também uma instrução normativa nº 37, publicada em 08/10/2018, pelo Ministério da Agricultura, através do Diário Oficial da União, a qual tem como objetivo estabelecer os padrões de qualidade que devem obedecer não apenas relacionado ao açaí, mas entre outras polpas, determinando assim aspectos físicos/químicos e qualidade sanitária na produção, inclusive citando como medidas de higiene o branqueamento ou pasteurização (BRASIL, 2018a).

O processo de branqueamento é citado de acordo com as legislações estaduais que estabelecem requisitos higiênico-sanitários para a manipulação de açaí e bacaba por batedores artesanais, de forma a prevenir surtos com Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) e minimizando o risco sanitário, garantindo a segurança dos alimentos; entretanto, não há nenhuma lei que obrigue o processo de branqueamento (BRASIL, 2017a, 2018a). Apesar disso, os governos dos estados do Pará (2012) e Amapá (2015) estabeleceram legislações que estimulam a realização do branqueamento dos frutos.

No ano de 2020 um grande avanço foi conquistado, a inserção da fase crônica da doença de Chagas como notificação compulsória (Portaria nº 1.061 de 18 de maio de 2020 revoga a Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020), visto que, anteriormente, somente a fase aguda da doença estava incluída na Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e Imediata, segundo a Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017 (BRASIL, 2017c, 2020b, c)

Em 2017 foi consolidado o “Dia mundial de combate à DC”, durante a 72ª Assembleia Mundial da Saúde, sendo assim determinado, em 14 de abril de 2020, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2020d) cujas informações foram publicadas no Boletim Epidemiológico.

Do ponto de vista técnico, o consumo de açaí (e de outros alimentos) pasteurizado é seguro. Por outro lado, dada à realidade econômica das áreas da região amazônica e a falta de regulamentação em relação à aplicação dessa técnica para a prevenção da contaminação do alimento com *T. cruzi*, deve-se fortalecer o

consumo de açaí (e de outros alimentos) em locais com boas práticas implantadas e que submetam os frutos à higienização e ao branqueamento, uma vez que esses procedimentos minimizam o risco de contrair DCA (OPAS, 2009).

2.2. Manifestações clínicas – DC

A DC apresenta um quadro clínico composto por uma fase aguda (cl clinicamente aparente ou não), com alto nível de parasitemia; além de uma fase crônica, que pode se manifestar nas formas indeterminada (em que o paciente não apresenta sinais de comprometimento no aparelho circulatório e digestivo, podendo durar a vida toda; ou pode evoluir para a forma sintomática, com o nível de parasitemia baixo, porém constante); podendo apresentar a forma cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva.

Pacientes na fase crônica podem apresentar reativação da DC, ocasionada pela depressão do sistema imune; logo, poderão apresentar aumento da carga parasitária, como em pacientes transplantados recentemente. Um estudo realizado com pacientes chagásicos e co-infectados com HIV demonstrou que 73% dos indivíduos apresentavam dor de cabeça, déficit neurológico focal e febre, 47% apresentavam convulsões, e cerca de 30% apresentavam problemas cardíacos; um paciente portador do vírus com reativação, apresentou hemocultura positiva e, tão logo iniciado o tratamento específico para DC, os resultados foram negativos (FERREIRA et al., 2018b).

As manifestações clínicas se apresentam de forma variada; geralmente, após um período de incubação, este pode divergir de acordo com o modo de transmissão: na via congênita, pode ser transmitida em qualquer período da gestação; na via vetorial, de 4 a 15 dias; via oral: 3 a 22 dias; via transfusional: 8 a 120 dias e, por acidentes laboratoriais, até 20 dias após exposição (BISIO et al, 2011; DIAS et al, 2015), e então inicia-se a infecção, podendo ou não o indivíduo apresentar sinais e sintomas. Uma das justificativas para isto é o fato de existirem diversas cepas, que são diferenciadas devido à virulência e à patogenicidade. As cepas mais estudadas são as cepas parentais: Y (altamente virulenta) e CL e MR (DE ARAÚJO et al, 1988; MACHADO et al, 2012; SIMÕES et al, 2018). Um dos fatores que diferenciam a patogenicidade de cada cepa é o tropismo e, no caso da cepa Y, o tropismo é por tecidos cardíacos, com citocinas liberadas durante o processo inflamatório e o recrutamento das células do sistema imune (PONCE et al., 2005).

Segundo o estudo realizado por Lewis (2018), cujo objetivo era avaliar se as

diferentes vias de transmissão interferiam na gravidade da doença, em relação aos sintomas, identificou-se que, experimentalmente, a contaminação oral utilizando a cepa TcVI-CL Brener *T. cruzi* foi equivalente aos controles realizados com injeção através de agulha, revelando também que o tropismo de tecido cardíaco após contaminação oral é maior do que comparado a infecções por outras vias.

2.3. Diagnóstico

De acordo com o Guia de Vigilância em Saúde, publicado pelo Ministério da Saúde em 2017, na fase aguda (parasitemia alta) os exames indicados são: identificação dos sintomas clínicos, exame parasitológico direto (padrão ouro para doença de Chagas aguda - DCA) identificando-se assim o parasita circulante no sangue, e sorológico com objetivo de pesquisa de IgM no sangue (BRASIL, 2017a). Por outro lado, na fase crônica, é indicado o exame sorológico com alta especificidade e diagnóstico molecular (Figura 1).

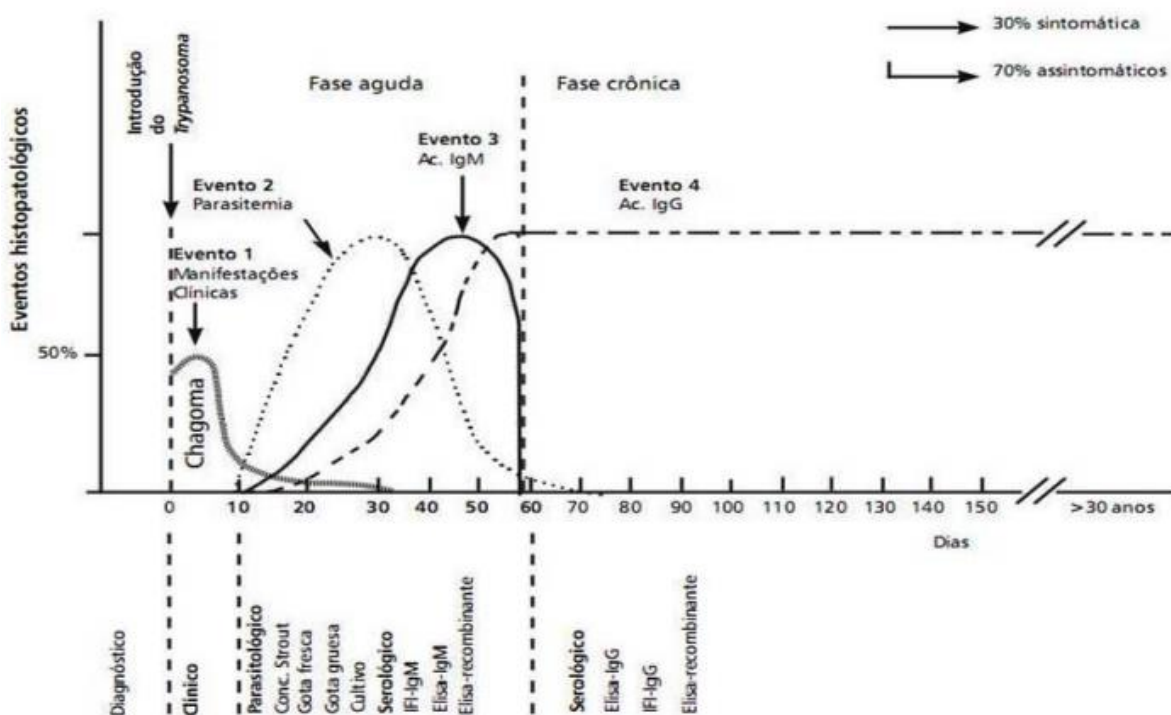


Figura 1: Testes diagnósticos para a doença de Chagas segundo períodos de infecção

Fonte: Rev Patol Trop Vol.42. out-dez. 2013 (BRASIL, 2013)

As diferentes fases da doença, o modo de transmissão e a alta variabilidade genética do parasita determinam que os métodos de detecção molecular apresentam diferentes graus de sucesso. Os testes de diagnóstico molecular podem ser

empregados durante levantamentos epidemiológicos de transmissão, para o diagnóstico precoce de transmissão congênita e infecções agudas por transmissão oral, vias de transfusão ou transplante, reativação por imunossupressão e monitoramento da resposta ao tratamento em pacientes cronicamente infectados recebendo quimioterapia tripanocida (SCHIJMAN, 2018)

A via oral é uma forma de transmissão importante, porém seu diagnóstico tem se tornado difícil devido aos amplos sintomas apresentados, sendo imprescindível um diagnóstico confirmatório para o manejo adequado do tratamento; para este, leva-se em conta os aspectos epidemiológicos, geográficos, tipos de alimentos consumidos pelo paciente e histórico de possíveis transplantes e/ou transfusões (YOSHIDA e CORTEZ, 2008).

Outro aspecto importante é a determinação da via de infecção, o que pode estar relacionada com o sistema imune, pois quando há infecção por *T. cruzi*, ativa-se a resposta imune adaptativa, além da inata, interferindo na agressividade da infecção, com envolvimento de células T citotóxicas tipo 1 e 2 (Tc1/Tc2), células Th (contra patógenos intracelulares) e macrófagos. Um estudo mostrou que camundongos deficientes de células B apresentavam sinais mais graves, o que indica que a resposta imune humoral é imprescindível contra *T. cruzi* (SILVA, 2017). A infecção via oral exige que o patógeno colonize a mucosa gástrica e, mesmo que exposto ao ácido clorídrico e outras barreiras gástricas, ele garanta sua viabilidade, devido a mecanismos, como a grande quantidade de mucinas na superfície do *T. cruzi* (tcMUC) que são resistentes à degradação por proteases, glicosidases e ácido clorídrico. Outro método de evasão é a presença de uma glicoproteína conhecida como gp35/50, gp82 e gp30 (YOSHIDA e CORTEZ, 2008; YOSHIDA 2009). Após ocorrer a invasão do epitélio gástrico as tripomastigotas transformam-se em amastigotas e se replicam. Ambas as respostas (humoral/celular) participam do controle do parasita, com algumas citotoxinas destacando-se na regulação da resposta imune (ALVES, 2017; SOUZA, 2018).

Os métodos moleculares têm contribuído para a capacidade de detectar e quantificar patógenos em alimentos e água (Palomino-Camargo e González-Muñoz, 2014; Ferreira et al., 2016b). Porém, a sensibilidade das provas moleculares varia de 50 a 90%, dependendo da metodologia empregada, dos genes alvo, da fase de infecção e da diversidade genética do *Trypanosoma cruzi* presente no material pesquisado (BRASIL et al., 2010b; SCHIJMAN et al., 2011).

Em recém-nascidos, se faz o exame parasitológico direto nos primeiros meses de vida em duas amostras. Se o resultado for negativo faz-se também o sorológico

para pesquisa de IgG (DIAS et al., 2015; SIMÕES et al., 2018). Este é recomendado a partir do nono mês de vida devido ao fato da maturação do sistema imunológico dos recém-nascidos, pois antes do tempo determinado não há uma resposta imune adequada e capaz de ser detectada nos exames antes do sexto mês de vida (SIMÕES et al, 2018). Para as gestantes, o diagnóstico de Chagas é fechado quando há dois ou três testes sorológicos diferentes em resultados positivos, e para um teste alternativo usa-se a imunocromatografia devido sua alta sensibilidade e especificidade (DE OLIVEIRA IZAR, 2016; PONCE et al, 2005; RODDY et al, 2008; CARLIE et al, 2011).

Recentemente foi publicado pela Fiocruz o novo kit de diagnóstico de DC crônica, com registro na Anvisa e produzido pela Unidade produtora de imunobiológicos da Fiocruz Bio-Manguinhos, com o intuito de contribuir para a melhoria do diagnóstico no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), tendo em vista que os testes moleculares e sorológicos levam horas para apresentar um resultado, além de demandarem estrutura do laboratório, equipamentos modernos e qualificação dos profissionais. O novo teste é realizado em 15 minutos, utilizando amostras apenas pela punção da ponta do dedo do paciente (Fiocruz, 2020).

2.4 Tratamento

A DC é uma doença negligenciada, com drogas aprovadas há mais de 40 anos de existência: benznidazol e nifurtimox (este último não disponível no Brasil), altamente tóxicas e pouco sensíveis, porém bastante eficazes na fase aguda. O fato de ser negligenciada implica falta de interesse das indústrias farmacêuticas em produzir medicamentos voltados para a doença; uma outra dificuldade encontrada é também a falta de padronização em relação a protocolos para os testes de drogas antichagásicas, além de que até 18 de maio de 2020 a Doença de Chagas não era considerada de notificação compulsória; logo, as informações não eram precisas. Atualmente, a DC crônica foi incluída na Lista Nacional de Notificações Compulsórias de doenças, agravos e eventos de saúde pública (DA SILVA et al, 2007; DIAS et al, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A cura é determinada com a negativação do exame sorológico, sendo que, para a doença aguda, deve-se fazer o acompanhamento por cinco anos, excluindo-se possibilidade de reagudização (DIAS et al, 2015).

Para a doença na fase crônica é recomendado o tratamento de sustentação

(minimização dos sintomas). Esta fase é caracterizada pelo nível de parasitemia baixo; porém, as manifestações clínicas (cardíacas, digestivas e cardiodigestivas) são graves, devido ao fato de haver a presença de formas amastigotas, infiltradas nos tecidos musculares, os quais dificilmente são atingidos pelas drogas (ZAIDAN, 2011; DIAS et al, 2015).

Segundo o Guia de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2017a) é importante ressaltar a obrigatoriedade do amparo aos doentes, feito pelo Sistema Único de Saúde (SUS), que atualmente disponibiliza como droga de tratamento o Benznidazol, mesmo que este cause variadas reações adversas como as expostas no artigo de Ferreira et al (2019), cujo trabalho demonstra que, quando adotado um esquema terapêutico, as reações adversas podem diminuir significativamente, e assim as taxas de adesão são maiores.

A solicitação de uso do Benznidazol, oferecido pelo SUS por mediações das Secretarias Municipais de Saúde, depende da realização dos testes confirmatórios de doença de Chagas. O diagnóstico rápido e tratamento eficaz, dependem dos sinais e sintomas, os quais se apresentam de formas diferentes de acordo com a via de infecção (SOUZA, 2018; SILVA, 2017).

Tendo em vista a negligência para notificação compulsória da doença de Chagas, à popularização do consumo de açaí e devido à falta de pesquisas sobre a contaminação deste alimento com *T. cruzi*, considerando a logística de produção do fruto, a famosa “rota do ouro roxo” até sua comercialização para diversas regiões do Brasil, propõe-se o presente estudo. Ainda, pretende-se avaliar a infectividade via oral em camundongos Balb-C a partir de amostras de açaí positivas à tamisação e à PCR para *T.cruzi*.

Objetivos

3 OBJETIVOS

- Verificar a presença e motilidade de *T. cruzi* em polpas de açaí adquiridas do comércio em diferentes municípios do Estado de São Paulo;
- Pesquisar o material genético de *T. cruzi* a partir das amostras de açaí;
- Avaliar a infectividade “*in vivo*” das amostras de açaí positivas à tamisação e à prova molecular de PCR para *T. cruzi*.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética- CEUA da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (nº de registro 1299/2019- anexo 1).

4.2 Aquisição e caracterização das amostras de açaí para pesquisa de *Trypanosoma cruzi* e municípios de procedência

Foram adquiridas 35 amostras de açaí a partir de diferentes pontos de venda, supermercados e sorveterias tipo *self- service*, localizadas em onze municípios do Estado de São Paulo: Avaré, Botucatu, São Manuel, Bauru, Barra Bonita, Agudos, Pardinho, Pederneiras, Lençóis Paulista, Itatinga e Bofete (Figura 2).

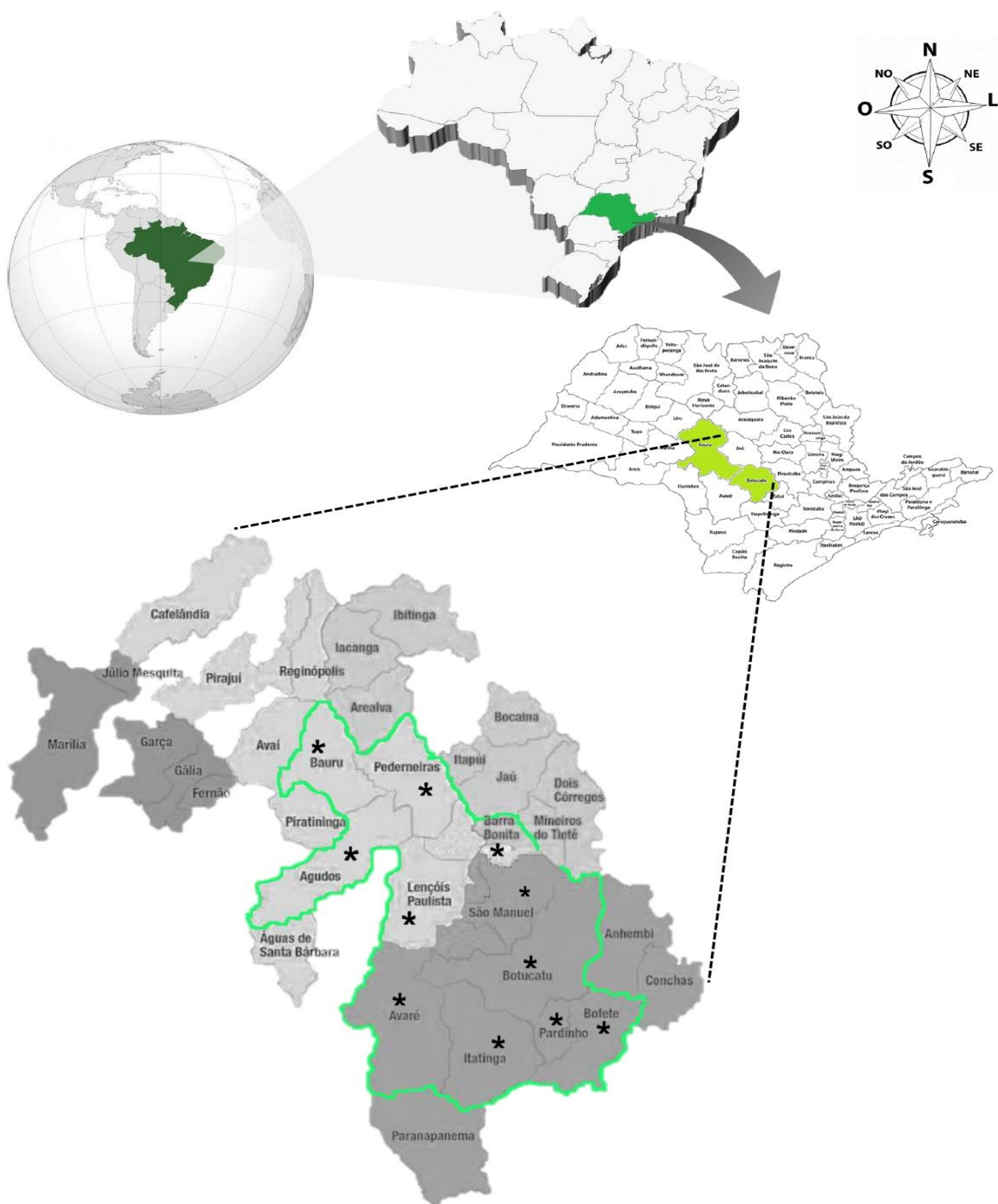


Figura 2: Municípios do Estado de São Paulo selecionados para compra de açaí e pesquisa de *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Google Maps – Com adaptações

As amostras de açaí foram adquiridas sob diferentes apresentações, dependendo do ponto de venda: em sorveterias self-service, era vendida uma porção de aproximadamente 100g de açaí (1bola/100mL), correspondendo a 33 amostras; e em supermercados o açaí era comercializado em potes de 180g, os quais não apresentavam o carimbo do Serviço de Inspeção Federal (S.I.F), correspondendo a duas amostras, uma do município de Botucatu e outra de Lençóis Paulista.

Tendo em vista a variabilidade das marcas de açaí comercializadas em cada município, não foi possível estabelecer um número determinado de amostras a serem adquiridas em cada local; além disso, o intervalo de tempo de coleta até o processamento das amostras foi variável, tendo em vista que os pontos de coleta eram geograficamente diferentes.

As coletas foram realizadas em dois dias diferentes: primeiramente foi organizado uma rota, cumprindo as coletas nas cidades de Lençóis Paulista, Agudos, Bauru, Pederneiras e Barra Bonita. No segundo dia, o mapeamento foi feito para que as coletas ocorressem nas cidades de São Manuel, Avaré, Itatinga, Pardinho, Bofete e Botucatu.

Assim que adquiridas, as amostras de açaí foram identificadas e acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo reciclável e transportadas em seguida ao laboratório, a fim de se iniciar o processo de filtração imediatamente. A identificação das amostras seguiu sua ordem de coleta, assim sendo numeradas de 1 a 35 (Quadro 2).

Quadro 2: Municípios de aquisição das amostras de açaí

Número da amostra	Cidade correspondente
1-3	Lençóis Paulista
4-7	Agudos
8-11	Bauru
12-14	Pederneiras
15-18	Barra Bonita
19-22	São Manuel
23-25	Avaré
26 e 27	Itatinga
28	Pardinho
29 e 30	Bofete
31-35	Botucatu
Total	35 amostras

4.3 Pesquisa direta de *T. cruzi* nas amostras de açaí pela técnica de tamisação

4.3.1 Processo de tamisação forçada – método direto a partir de cada amostra de açaí

Para a pesquisa das formas tripomastigotas de cada amostra de polpa de açaí coletada (100g), foi usado um método de filtração, o método de tamisação forçada, utilizando-se de 10mL, cuja metodologia foi descrita por Passos, Guaraldo, Barbosa (2012) e de Mattos et al. (2017), para posterior purificação de DNA e diagnóstico molecular para *T.cruzi*.

O processo de filtração ou tamisação consiste em um processo de separação de conteúdo por tamanho de partícula ou por densidade. Este foi realizado utilizando-se de colunas de filtração (sob condições estéreis em capela de fluxo laminar), empregando-se seringas plásticas de 5mL e microesferas de metal estéreis com 3mm de diâmetro, preparando-se cada seringa para uma amostra, separadamente.

Para a confecção das colunas na seringa, foi colocado uma primeira camada de algodão ortopédico, em sua base, para em seguida serem adicionadas as microesferas (de forma intercalada), até alcançar 1/3 da altura da seringa, e sua extremidade superior coberta por uma nova camada de algodão ortopédico ou lã

(Figura 3A), quando então foi adicionada a amostra de açaí, de forma fracionada (Figura 3B) e, após uma pequena pressão exercida, foi obtido o eluato (Figura 3C).

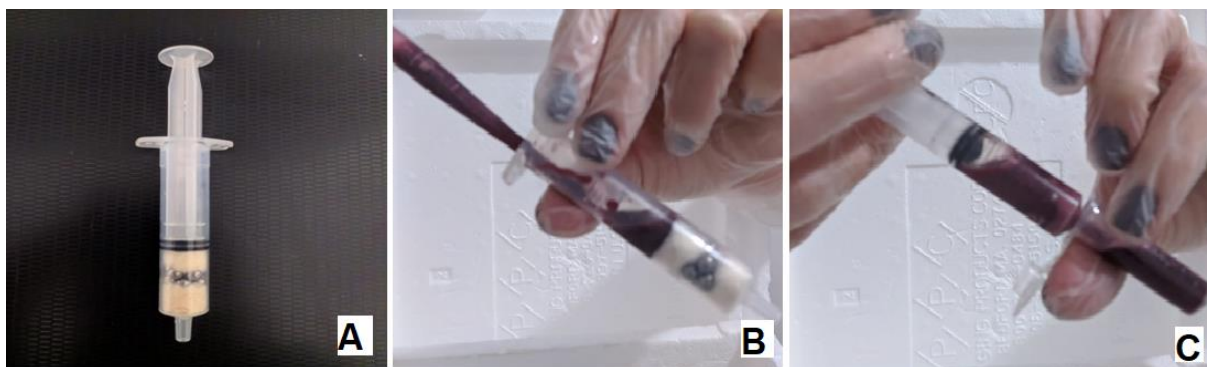


Figura 3: Processo de tamisação das amostras de açaí. Colunas de filtração prontas para tamisação, com algodão ortopédico e microesfera de aço (A). Adição da amostra de açaí à coluna de filtração (B). Obtenção de eluato de açaí pela técnica de tamisação forçada (C).

Fonte: Arquivo pessoal

O processo permitiu a separação da parte sólida e líquida do açaí, garantindo assim a livre passagem dos parasitas através das colunas, passando a ficarem concentrados no eluato e permitindo que eles fossem recuperados, se estiverem presentes na polpa do açaí.

Após a filtração, cada amostra de açaí foi fracionada em porções menores de aproximadamente 0,5mL de cada porção e mantidas sob temperaturas diferentes: a fresco, refrigeradas (4°C) e congeladas (-20°C). As amostras de açaí foram analisadas nos períodos de zero hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas, sendo o período de zero hora considerado o momento em que as amostras chegaram ao laboratório; o restante das amostras foram armazenados em freezer a -20°C para as provas moleculares de PCR, bem como para a inoculação via gavagem em camundongos Balb-C.

Para a contagem das formas tripomastigotas do eluato proveniente da filtração, foi realizada a leitura feita sob microscopia óptica, utilizando-se o aumento de 400X.

4.4 Pesquisa molecular – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi*

4.4.1 Extração de DNA para *T. cruzi*

Para as amostras de açaí foi utilizado o Kit comercial da GE Healthcare® (Illustra Tissue and Cells GenomicPrep. Mini Spin kit), de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante (Anexo 2).

4.4.2 Quantificação de DNA

Todas as amostras de DNA extraídas foram quantificadas utilizando o aparelho NanoVue Plus (GE Healthcare®), no Laboratório de Sanidade Animal de Bauru - LASAB/APTA.

O aparelho foi previamente calibrado utilizando-se 2µL de água ultrapura nas cavidades de leitura indicadas no aparelho. Após calibração, foram utilizados 2µL de cada amostra de DNA para leitura de quantificação. Os dados obtidos da quantificação, bem como a relação 260/280, encontram-se descritos no Anexo 3.

Ácidos nucleicos absorvem luz à 260nm (comprimento de onda eletromagnética), enquanto proteínas absorvem luz à 280nm. A estimativa de pureza de DNA na amostra é verificada pela relação de absorbância 260/280. Valores dessa relação entre 1,8 a 2,0 são considerados ótimos para DNA. Valores abaixo de 1,8 podem indicar excesso de proteínas na amostra.

4.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase convencional- cPCR para *T. cruzi* a partir das amostras de açaí

4.4.3.1 Controles positivos para PCR

Foram utilizados dois controles positivos da reação, material de cultura de cepa Y de *T. cruzi*, mantidas em meios NNN-LIT (Anexo 4 e 5) e em meio 199 (Anexo 6) sob temperatura de 25°C em estufa B.O.D.

4.4.4 Procedimento cPCR

O procedimento de cPCR foi realizado nos controles e em todas as amostras de açaí adquiridas do comércio dos onze municípios analisados, positivas ou negativas à tamisação. Para este processo foram escolhidos dois *primers* distintos: v7/v8 (561F e 561R), e o 121/122 (Quadro 3).

Quadro 3: Iniciadores para *T.cruzi* a partir de amostras de açaí – Técnica de cPCR

Amplificação de interesse e alvo gênico	Primers e tamanhos aproximados dos amplicons (em pares de bases - pb)	Perfl de ciclagem e referência
Família Trypanosomatidae (V7/V8) - Região V7/V8 do gene 16S SSU rRNA	SSU561F: 5'TGGGATAACAAAGGAGCA3' SSU561R: 5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3' ≈650pb	30x (94°C-30s; 54°C-1min; 72°C-2min.) (Noyes et al, 1996)
<i>Trypanosoma cruzi</i> (121/122) - Minicírculos de kDNA	121: 5'AAATAATGTACGGGTGAGAGATGCATGA3' 122: 5'GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT3' ≈350pb	1x94°C–3min; 35x (94°C-30s; 57°C-30s; 72°C-30s); 1x 72°C-7min (Fitzwater et al., 2008).

Em um tubo de 1,5mL foi adicionado 373,5µL água ultrapura, 58,5µL de Buffer, 18µL de MgCl, 11,25µL de dNTPs, 11,25µL do *primer* em teste (*primer1* e *primer2*), e 11,25 µL de Taq-polimerase. Após homogeneizado foi passado para cada microtubo (0,2mL) 11 µL de mix e acrescentado 1 µL da amostra testada. Desta forma, cada microtubo continha 12µL, e para a ciclagem utilizou-se o termociclador da marca EPPENDORF - Master Cycle PRO, modelo 6321.

Os produtos resultantes correspondem à amplificação do fragmento contendo uma região específica da região do microssatélite nDNA de *T.cruzi*, Todas as amostras foram submetidas à prova de cPCR em triplicata.

4.4.5 Eletroforese em gel de agarose

O gel para eletroforese foi preparado com 2g de agarose pura em 100mL de tampão Tris-EDTA-Borato (TBE) 0,5X. A agarose foi dissolvida em TBE previamente aquecido, para que se dissolvesse totalmente e, após leve resfriamento, foi adicionado 7 µL de corante Syber Safe®. O material foi distribuído uniformemente na cuba de eletroforese. Aliquotas de 8µL das amostras amplificadas foram

homogeneizadas com 2µL de solução de azul de bromofenol, as quais foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2,0% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1X e por último foi adicionado 4 µL de Ladder (100pb). A corrida foi realizada em 100 volts por 90 minutos. Ao final, as bandas eram visualizadas em transiluminador ultravioleta (fotodigitalização), com filtro de 300nm.

Foram utilizados como controles positivos produtos da cepa amplificada de *T. cruzi*, e como negativa água mili-Q estéril, sendo o tamanho dos fragmentos amplificados verificados a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com a cepa padrão utilizada como controle positivo.

4.5 Inóculo, grupos experimentais e via de inoculação

4.5.1 Obtenção das amostras controle negativo e positivo para os testes experimentais – inoculação via oral de açaí

A partir de uma amostra de açaí pasteurizada (adquirida em pote e com carimbo do S.I.F, não pertencente à amostragem da pesquisa) foi realizada leitura em microscopia óptica no aumento 400X para pesquisa de formas tripomastigotas, sendo a mesma negativa e, portanto, a amostra controle negativo.

Em seguida, procedeu-se o preparo de 50µL de *T. cruzi* (cepa Y) à uma alíquota da amostra de açaí pasteurizada, sabidamente negativa para *T. cruzi*, contaminando-o com a proporção de 2×10^6 parasitas/mL), adicionou-se 100µL açaí e 50µL de água ultra, obtendo-se assim o controle positivo para os experimentos a serem realizados com os animais (AMATO NETO et al, 1974; CARDOSO et al, 2006), conforme figuras 4.

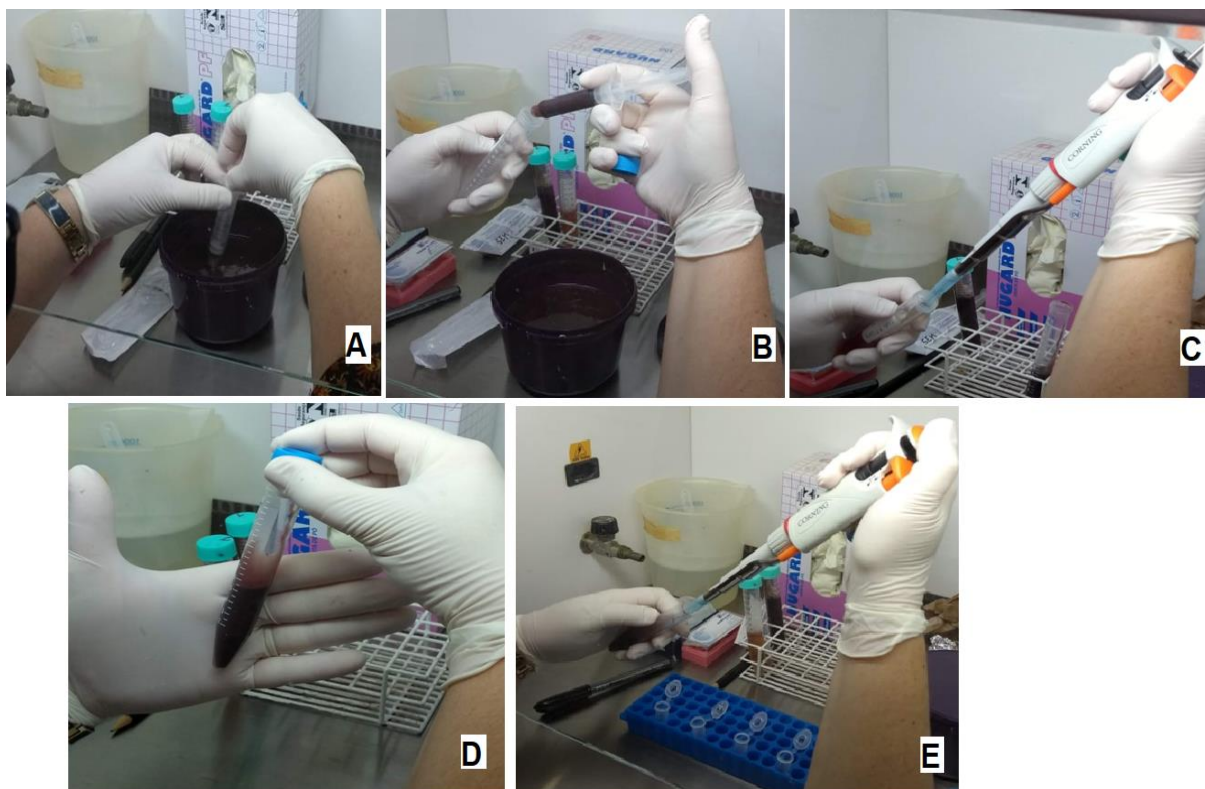


Figura 4: Obtenção do controle positivo. Aspiração de 5mL de açai pasteurizado para obtenção de eluato (A). Adição do eluato de açai ao tubo de centrifugação (B). Contaminação do açai com cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (C). Homogeneização do eluato de açai contaminado com *T. cruzi* (cepa Y) (D). Distribuição do eluato contaminado com cepa Y de *T. cruzi* em microtubos estéreis e livres de DNase e RNase (E).

Fonte: Arquivo pessoal

4.5.2 Grupos de camundongos (Anexo 7)

Com o objetivo de avaliar a infectividade das amostras de açai positivas à tamisação e/ou à prova molecular de PCR para *T. cruzi*, foi realizada a inoculação destas amostras via oral (gavagem) em camundongos Balb/C, fêmeas, de 45 dias. Desta forma, foram determinados cinco (05) grupos de camundongos para avaliação da infectividade das amostras positivas à leitura direta e à cPCR.

- **Grupo 1: Controle positivo para *T. cruzi***

Para este foram realizados a contaminação proposital de açai, com cepa Y, como descrito no Item 4.5.1.

- **Grupo 2: Controle negativo para *T. cruzi*.**

Para este foram inoculados açai sabidamente negativo para *T. cruzi*, como descrito no Item 4.5.1.

- **Grupo 3: Amostra positiva à leitura direta (método de tamisação forçada) – amostra 19**

- **Grupo 4: Amostra positiva à cPCR – amostra 12**
- **Grupo 5: Amostra positiva à cPCR- amostra 13**

Todos os grupos foram compostos de três camundongos (total de 15 camundongos) Balb-C, fêmeas, de 45 dias de idade: todos os camundongos foram inoculados via gavagem, com uma quantidade de 100µL de açaí com adição de 100µL de água ultrapura (infecção oral), utilizando-se de uma cânula específica para o procedimento, e assim sucessivamente com as amostras correspondentes aos grupos (Figura 5).



Figura 5: Gavagem em camundongo Balb/C. Inoculação de amostra de açaí para avaliação da infectividade de *T.cruzi*.

Fonte: Arquivo pessoal

Cada grupo de camundongos era acondicionado em uma caixa diferente, cada qual contendo os três (03) camundongos pertencentes a cada grupo (Figura 6). Os animais receberam água e alimento (ração) *ad libitum* durante toda a fase experimental. Toda a parte de experimentação animal foi realizada seguindo as recomendações da Comissão de ética de uso animal em experimentação (CEUA), através do Manual de Utilização Animal, publicado pela FIOCRUZ (2008).

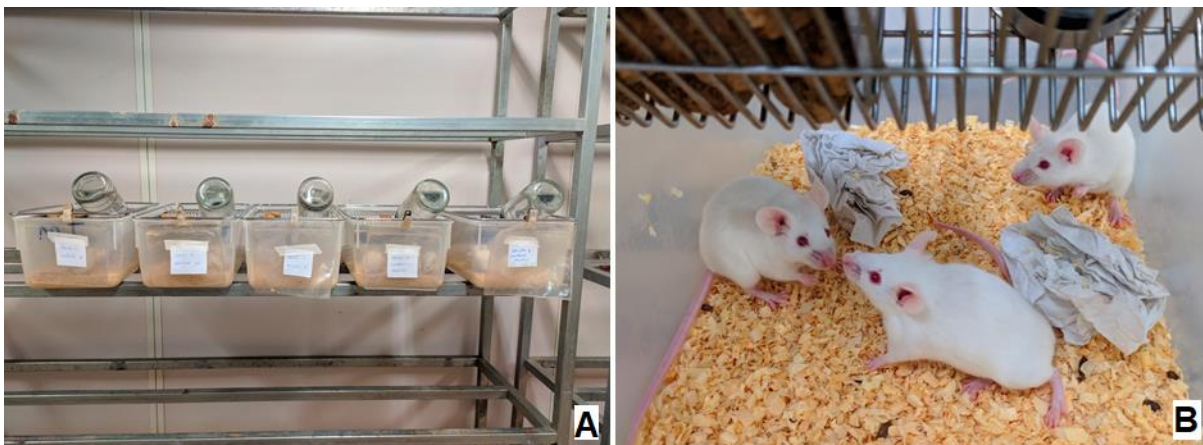


Figura 6: Acondicionamento dos camundongos. Cada grupo de camundongo em uma caixa (A). Em cada caixa foram acondicionados três (03) camundongos, os quais receberam água e ração *ad libitum* (B).

Fonte: Arquivo pessoal

Após o período de incubação de sete dias, e avaliação de sinais clínicos visíveis, tais como pelos arrepiados e possível alteração da mucosa ocular conjuntival (PASSOS et al., 2012), foi realizada eutanásia dos camundongos para os procedimentos de punção cardíaca e retirada dos órgãos (fígado, baço, coração e língua).

4.5.3 Eutanásia e retirada de órgãos

Decorrido o tempo de incubação, foi realizada a eutanásia, utilizando-se Thiopental® diluído a 5% (20mL em 1g), via intraperitoneal em camundongos. Em seguida, foi realizado o procedimento de exposição do coração e punção cardíaca, sendo possível a coleta de aproximadamente 1mL de sangue de cada camundongo (PASSOS et al., 2012; PAIVA et al, 2005; UNIFAL, 2016).

A partir das amostras de sangue foram realizados esfregaços, para visualização das formas tripomastigotas, corados com a técnica de Giemsa e leitura sob microscopia óptica com óleo de imersão (aumento 1000X).

Dos camundongos, foram retirados o coração, fígado, baço e língua, os quais foram pesados em balança analítica (BEL Engineering®) e realizados *imprints* com os fragmentos de cada órgão e posterior coloração de Giemsa, para pesquisa de formas amastigotas nos tecidos, pela leitura sob microscopia óptica com óleo de imersão (aumento 1000X).

Portanto, foi obtido de cada camundongo quatro órgãos, bem como a retirada

de aproximadamente 1mL de sangue, pela punção cardíaca, para cada grupo (Figura 7).

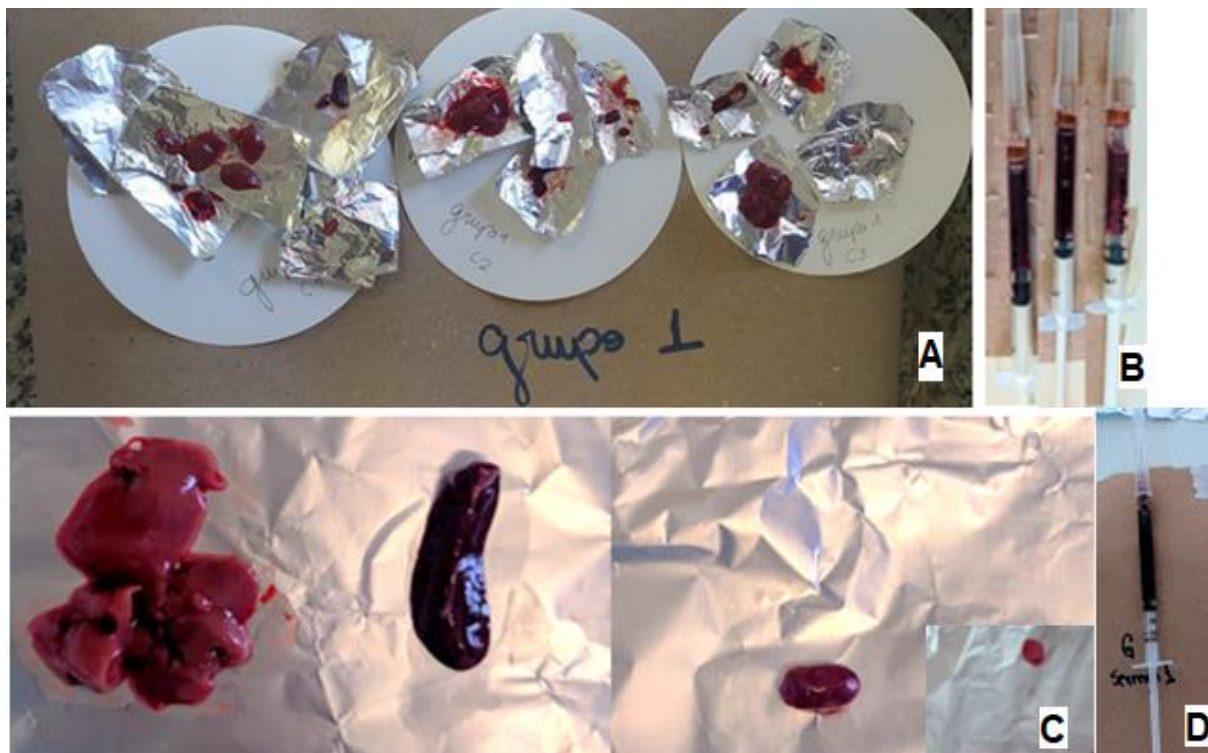


Figura 7: Retirada de órgãos e sangue por punção cardíaca a partir de um grupo amostral de camundongo (A e B); Órgãos retirados dos camundongos: fígado, baço, coração e língua (C); Seringa contendo aproximadamente 1 mL de sangue (D).

Fonte: Arquivo pessoal

Após todos esses procedimentos as carcaças dos roedores foram embaladas em papel alumínio, acondicionados em sacos plásticos (próprios para autoclave) e autoclavados a 120°C por 15 minutos, sendo os mesmos descartados em lixo infectante para posterior incineração.

4.5.4 *Imprints*

Após a coleta dos órgãos (fígado, baço, coração e língua), a impressão em lâmina foi realizada imediatamente após corte diagonal dos mesmos utilizando-se de tesoura cirúrgica, e então com o auxílio de uma pinça, foi realizada com a parte interna dos órgãos uma leve compressão (“carimbo”) do fragmento sobre a lâmina, com movimentos delicados e sem sobreposição (Figura 8). A fixação, coloração e exame das lâminas foram realizadas conforme descrito no item 4.5.5.

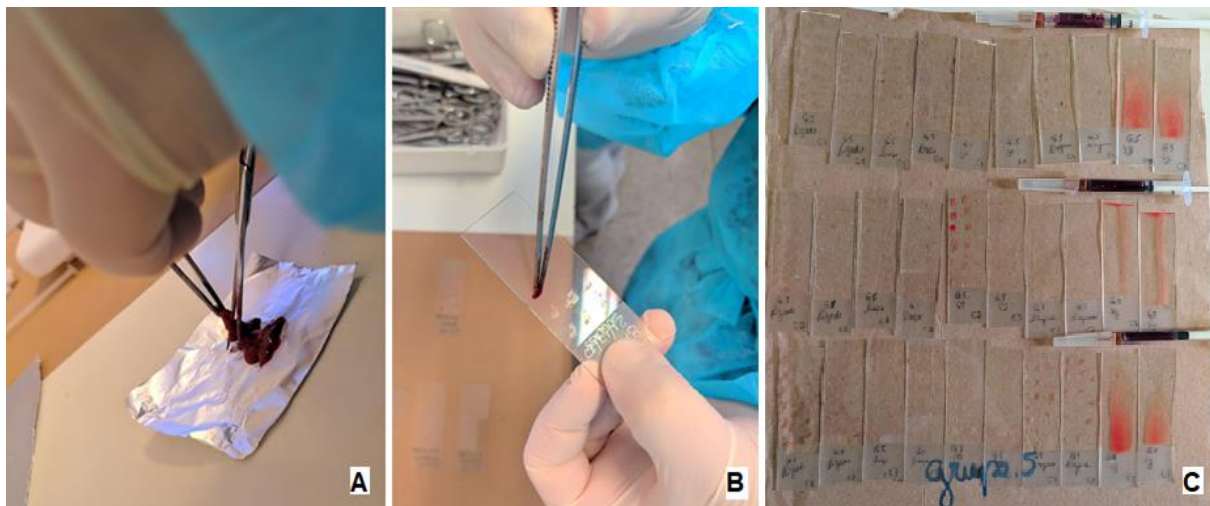


Figura 8: Corte diagonal de órgão (A). *Imprint* de órgão em lâmina de microscopia (B). Procedimento realizado para todos os camundongos de todos os grupos, com órgãos e esfregaço sanguíneo (C).

Fonte: Arquivo pessoal

4.5.5 Coloração de Giemsa e análise das lâminas

Após o *imprint* dos órgãos em lâminas, as mesmas foram fixadas em álcool metílico (metanol) por 5 minutos; após, as lâminas foram vertidas para retirada do excesso e então foram coradas com corante de Giemsa por 30 minutos (Figura 9). Após decorrido este tempo, foram enxaguadas em água corrente para serem analisadas em microscópio óptico com óleo de imersão, sob aumento de 1000X.

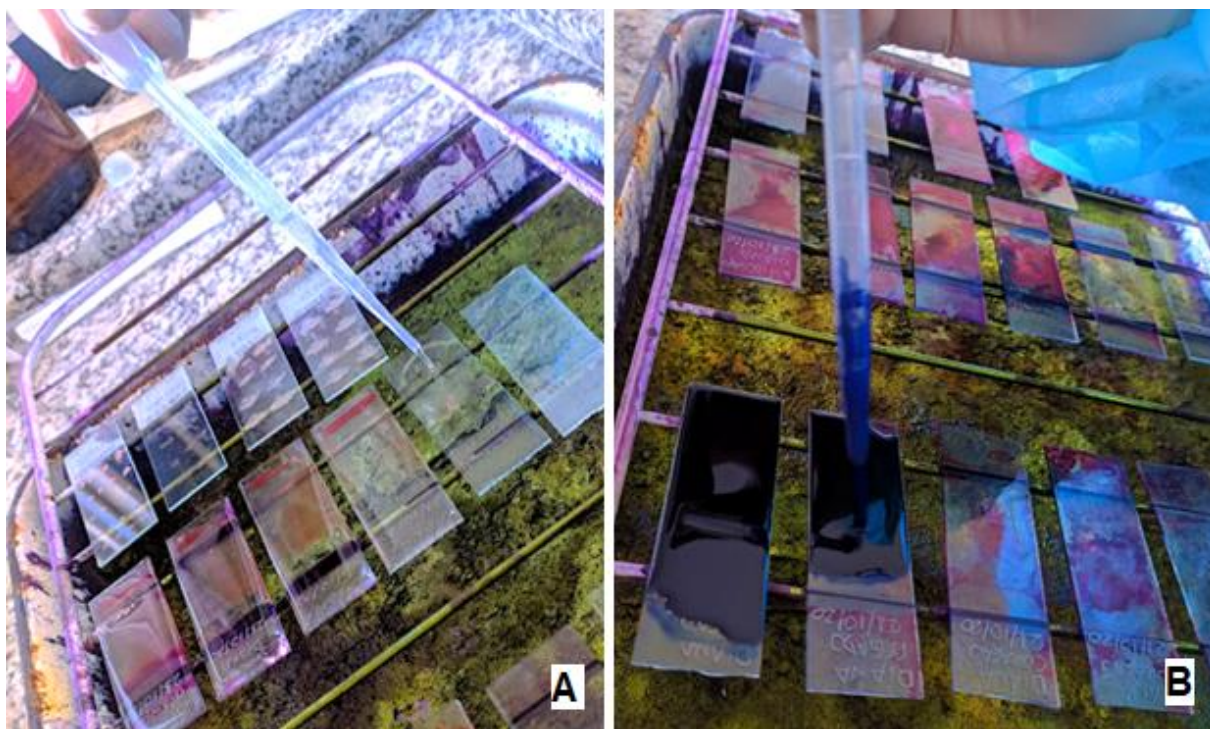


Figura 9: Fixação das lâminas com Metanol (A). Coloração com Giemsa (B).

Fonte: Arquivo pessoal

4.5.6 Preparo dos órgãos – Maceração de órgãos para extração de DNA

Em capela de fluxo laminar, a próxima etapa no processamento das amostras de tecidos (fígado, baço, coração e língua) foi a preparação dos inóculos para posterior extração do DNA. Desta forma, os fragmentos de tecidos foram retirados dos microtubos e macerados em cadinhos de porcelana estéreis. Após a maceração, adicionou-se 2 mL de Solução Salina Tamponada (SST) pH 7,2 pipetando-se 1.000 microlitros do sobrenadante para dois microtubos livres de DNase e RNase (1 mL para cada um), identificados e mantidos em freezer a -20 °C até a realização da extração de DNA.

4.5.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – órgãos de camundongos

A partir das amostras de tecidos macerados: fígado, baço, coração e língua, realizou-se o procedimento da extração de DNA, utilizando-se o Kit comercial da GE Healthcare® (Illustra Tissue and Cells GenomicPrep. Mini Spin kit), de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante (Anexo 2).

Para as amostras de sangue foi utilizado o Kit comercial *Illustra Blood GenomicPrep* (GE Healthcare®) (Anexo 8).

Em seguida foi realizado o processo de PCR e eletroforese, cuja metodologia está devidamente descrita anteriormente nos itens: 4.4.4 e 4.4.5.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amostras de açaí – comercialização e legislação

A maioria dos locais de coleta funcionavam com o sistema de *self-service*, nos quais as amostras de açaí eram dispostas em freezers e vendidas por quilo, sob diferentes apresentações de sabores, tais como açaí com guaraná, acerola, morango e banana. Segundo um estudo realizado por Ferreira et al. (2018a) o xarope de guaraná colocado no açaí pode interferir e funcionar como um conservante para *T. cruzi*, mantendo assim por maior tempo sua viabilidade, devido a quantidade de carboidrato que esse tipo de xarope possui.

A maioria dos açaís não apresentavam identificação das marcas comercializadas, exceto as grandes marcas, cujas franquias produzem seu próprio açaí, o que dificultou a garantia de que todos os açaís pertenciam a marcas distintas, impossibilitando assim sabermos se o açaí era pasteurizado ou não, além de ser impossível a identificação do selo do Serviço de Inspeção Federal (S.I.F).

O selo do Sistema de Inspeção Federal (SIF), que é um serviço de fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é aplicado à produtos que podem ser produzidos e comercializados em todo o país e até exportados, assim como existem outros sistemas de inspeção para os produtos comercializados entre Estados, municípios e para produtos que são produzidos e comercializados, mas não importados, respectivamente: SISP (Serviço de Inspeção Estadual), SIM (Serviço de Inspeção Municipal), SISBI-POA (Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal). Esses são serviços de inspeção de extrema importância para a saúde pública, pois visam as boas práticas de produção, assim garantindo a qualidade do produto final e segurança alimentar para o consumidor.

Para as empresas se registrarem é utilizado o Sistema Integrado de Produtos e Estabelecimentos Agropecuários (SIPEAGRO), o qual consiste em uma ferramenta eletrônica do MAPA, utilizada para solicitação de registro de estabelecimentos que trabalham com classificação de produtos vegetais e com a elaboração (produção, envase, padronização) de bebidas, o que inclui o açaí, as polpas de frutas, os fermentados acéticos, a cachaça, os licores e outros produtos, além dos vinhos e seus derivados.

Para estabelecimentos de pequeno porte, a Lei nº 13.648/2018 é regulamentada pelo Decreto Nº 10.026/2019, a qual enquadra as unidades de produção artesanal de polpa e suco de fruta, localizadas em áreas rurais que estejam sob a responsabilidade de agricultor familiar, ou empreendedor/empreendedora familiar rural que atenda ao

disposto na Lei nº 11.326/2006, cujo objetivo é atender aos requisitos tecnológicos, sanitários e de identidade e qualidade (BRASIL, 2006, 2018b, 2019b).

Há possibilidade de encontrarmos produtos sem o selo SIF, principalmente quando se trata de unidades de produção artesanal e familiar, porém o produto poderá ser comercializado com selo único indicativo de ARTE (Artesanal do Brasil) como descrito na Lei nº 13.680/2018, que se trata da comercialização de produtos com essa característica, de comercialização interestadual, porém que seguem as boas práticas agropecuárias e de fabricação, desde que submetidos à fiscalização (BRASIL, 2018c).

O projeto de lei nº178/2010, recusou a obrigatoriedade da pasteurização do açaí, mantendo apenas, a Lei 6672/2016 a qual incentiva a produção da polpa de açaí pasteurizado, mesmo havendo diversos estudos na literatura indicando a importância do consumo do açaí pasteurizado como sendo mais seguro para a saúde do consumidor. Estudos mostram que o armazenamento da polpa de açaí à temperatura ambiente, à 4°C ou à -20°C, não afeta a capacidade de sobrevivência e virulência do *T. cruzi*, concluindo que o resfriamento não é o método eficaz para evitar DCA, porém o aquecimento acima de 44 °C de 10 a 20 minutos pode inativar *T. cruzi* na polpa de açaí (NEVES et al, 2007; BARBOSA et al, 2012; PASSOS et al, 2012; BRASIL, 2017b).

Segundo o Ministério da Saúde, os produtores artesanais de açaí devem utilizar as técnicas de higienização e branqueamento (imersão em solução de hipoclorito) do fruto do açaí, além das boas práticas de coleta, transporte, armazenamento e manipulação, a fim de se evitar o risco de contaminação do fruto. É importante ressaltar que o processo de branqueamento é uma alternativa mais segura para o processamento artesanal do açaí, porém não é realizada de maneira frequente tendo em vista que, segundo os produtores, pode alterar o sabor e a coloração do açaí, o que prejudica a adesão dos mesmos.

5.2 Leitura direta – Microscopia óptica

Após o processo de tamisação forçada, as amostras de açaí testadas apresentaram bastante divergência em sua apresentação por microscopia óptica (400X). A figura 10 demonstra dois exemplos de alguns deles, com algumas polpas se mostrando em sua visualização óptica uma forma mais uniforme e outros com maiores sujidades, o que dificultou a visualização microscópica do parasita, além do aspecto de coloração, a qual era por vezes muito escura, devido a quantidade de

matéria orgânica, mais especificamente fibras vegetais, como descrito por De Mattos et al. (2019).

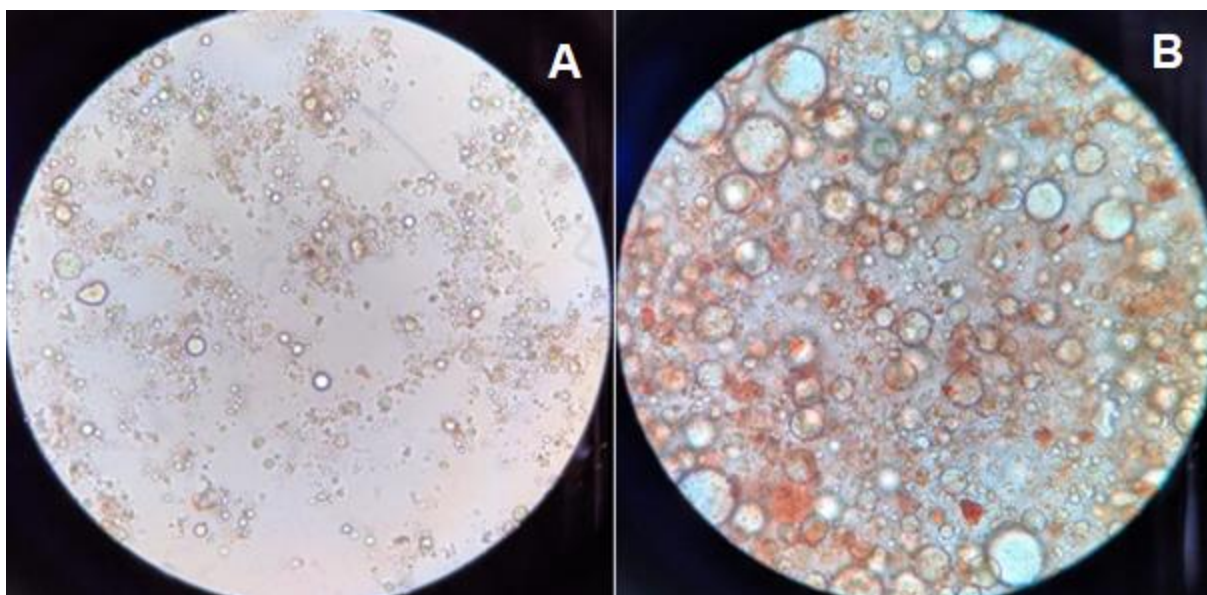


Figura 10: Aspectos microscópicos de eluato de amostras de açaí para pesquisa de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Notar as diferenças entre os aspectos de visualização da amostra **A** (poucas sujidades) e **B** (muitas sujidades)

Fonte: Arquivo pessoal

Em algumas amostras pode-se observar estruturas de fungos e fio de cabelo ou pelo, podendo ser considerado impróprio para consumo, segundo legislação brasileira RDC nº 175/2003 (BRASIL, 2003). Este fato confirma que as regras estabelecidas na RDC nº 218/2005 para a produção e processamento de açaí no Brasil não estão sendo cumpridas, pois ainda há falta do controle de qualidade dos produtos comercializados, o que demonstra a possibilidade de os produtos à base de açaí representarem uma ameaça à saúde da população, devido ao risco de transmissão oral (BRASIL, 2005b).

Durante as leituras realizadas em diferentes períodos, como descrito no Item 4.3.1 (Pesquisa direta de *T. cruzi* nas amostras de açaí pela técnica de tamisação), foi possível visualizar uma amostra com estrutura de *T. cruzi* dentre as 35 amostras analisadas (2,86%), a qual não apresentava motilidade, com morfologia semelhante a tripomastigota de *T. cruzi*, como pode ser visualizado na figura 11, na leitura de 6 horas e em temperatura ambiente (amostra 19).



Figura 11: Visualização de forma tripomastigota de *T. cruzi* em amostra de açai, pelo método direto de tamisação forçada – microscopia óptica (1000X).

Fonte: Arquivo pessoal

Esta amostra de açai era procedente da cidade de São Manuel-SP, em cujo estabelecimento havia a identificação da marca comercializada. Pesquisando-se pelo site da marca deste açai, não foi possível encontrar informações se a mesma apresentava o selo do SIF em seus produtos. O açai estava disposto em freezer, para *self-service*, e seu sabor era tradicional, sem adição de xarope ou outros ingredientes.

Pode-se justificar o fato de a estrutura não ter sido encontrada na leitura zero hora devido a quantidade de alíquota necessária ser pequena; além disso, deve-se considerar a quantidade de tripomastigotas que, nesse caso, devido ao processamento do açai, acaba sendo diluído com outros materiais, tais como xarope de guaraná (ou outros sabores), mel, leite condensado, água, entre outros ingredientes, que irá variar, dependendo do tipo de polpa que se pretende produzir: especial, média ou popular (Bezerra, 2017).

Segundo Sousa (2009) as condições de produção do fruto de açai podem alterar as polpas e, consequentemente, os parasitas, como por exemplo, pH, umidade, temperatura e fertilidade do solo. Em relação à imobilidade da estrutura encontrada pode ser justificado devido ao tempo de incubação.

Segundo um estudo realizado por De Mattos et al. (2019), com a contaminação experimental de amostras de açai, durante a análise da integridade das formas de tripomastigotas, notou-se que os parasitas incubados em açai por 4 horas a 26°C, apresentavam alteração de movimento, bem como apresentavam-se mais lentas e,

após 8h de incubação, as formas apresentavam total alteração da forma, tornando-se arredondadas, sendo que após 24h de incubação as formas tripomastigotas estavam totalmente lisadas, sendo impossível sua detecção. Os mesmos autores afirmam que o processo de refrigeração (4°C) possibilita às formas tripomastigotas manterem-se mais viáveis por 4 horas, formas esta que se tornaram imóveis à leitura de 8h, e apenas à leitura de 24 horas as mesmas apresentaram suas formas alteradas para arredondadas, concluindo-se, portanto, que a leitura de 24 horas, nas duas temperaturas não houve detecção de parasitas vivos.

Em estudo realizado por Santana et al (2019), os autores relatam que, após a contaminação do açaí e outros alimentos envolvidos na pesquisa, a sobrevivência dos parasitas varia de acordo com o tipo de alimento e presença ou ausência de refrigeração, levantando-se a hipótese de que a longa sobrevivência do parasita está associada ao congelamento da amostra na presença de crioprotetores, provavelmente presentes no teor gorduroso do suco de açaí.

A contaminação do açaí é um problema de relevância em saúde pública, enfatizando a importância do presente estudo cuja proposta é a investigação do *T. cruzi* e/ou seu material genético, nas amostras de açaí comercializadas, tendo em vista que até o momento não há legislação que obrigue a pasteurização do açaí a ser comercializado, assim não havendo segurança do produto consumido. Considerando o aumento e a popularização do consumo de açaí e à possível infecção via oral, esta vem sendo uma problemática que pode levar a um aumento do número de casos agudos de DC pela contaminação oral.

5.3 PCR convencional – amostras de açaí

Previamente à realização da PCR nas amostras extraídas de açaí, realizou-se a quantificação de DNA das mesmas, assim como nas amostras controle, apresentados no Anexo 3.

Após extração de DNA, todas as 35 amostras coletadas foram destinadas à PCR convencional e eletroforese, utilizando-se os *primers*: 121/122 e V7/V8, os quais amplificam minicírculos de kDNA de *T. cruzi*. Dos resultados da PCR com os *primers* V7/V8 para a família Trypanosomatidae, todas as 35 amostras foram negativas. Porém, com os *primers* 121/122, específicos para *T. cruzi*, duas amostras, procedentes do município de Pederneiras- SP, foram positivas (Figura 13), as quais correspondem às amostras 12 e 13. Todas as amostras foram submetidas em triplicata para ambos os *primers*.

AMOSTRA DE AÇAÍ

Primer: 121/122

Agarose 2%: 90V – 110min



1. Marcador 100pb
2. Amostra 12
3. Amostra 13
4. Controle positivo de *T. cruzi*
5. Controle negativo com água ultra pura

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose a 2% para os iniciadores 121/122 (~350pb) para *Trypanosoma cruzi*. Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 2 e 3 – amostras amplificadas; 4 – controle positivo (*Trypanosoma cruzi*); 5 – controle negativo (água ultrapura).

Fonte: Arquivo pessoal

As amostras 12 e 13 foram coletadas de sorveteria tipo self-service, procedentes do Município de Pederneiras-SP. No local não havia especificação da marca fornecida; o açaí estava acondicionado em freezer, com apresentação de diversos sabores, porém o coletado foi do sabor tradicional, prezando a não adição de qualquer tipo de xarope de frutas ou outros ingredientes.

A amostra 19, a qual foi positiva à técnica de tamisação, foi negativa ao teste de PCR, justificando-se tal resultado, tendo em vista a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR, a quantidade de DNA existente na amostra, além das sujidades inibitórias da reação de PCR.

5.4 Grupos experimentais – Leitura em microscopia óptica dos esfregaços sanguíneos e *imprints* de órgãos de camundongos

Após o processo de eutanásia dos animais previamente infectados com amostras positivas à tamisação e à PCR, procedeu-se à pesagem dos órgãos: fígado, baço, coração e língua em balança analítica, resultados estes descritos no Anexo 9 e leitura em microscopia óptica. Ressalta-se que não foi realizada análise estatística a partir dos resultados da pesagem da língua, tendo em vista que a mesma não foi retirada por inteiro, e sim apenas um fragmento.

Foi possível encontrar algumas formas evolutivas de *T. cruzi* em grupos específicos, como indicado nas Figuras 13, 14, 15 e 16, a seguir:

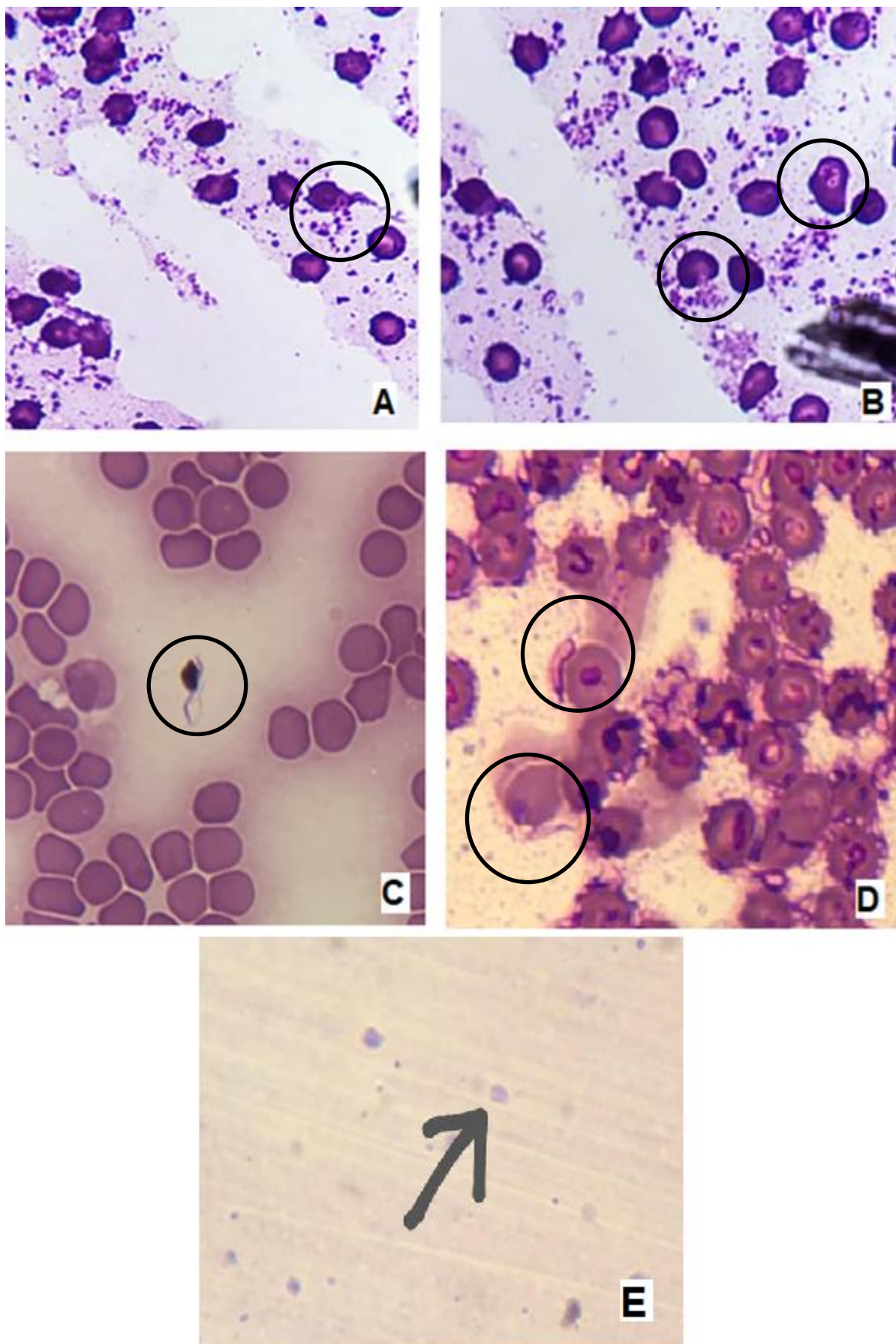


Figura 13: Visualizações microscópicas de *imprints* de órgãos de camundongos previamente infectados com amostras de açaí. Figuras de A a E, referentes ao **Grupo 1**, controle positivo, o qual recebeu açaí contaminado com cepa Y de *T.cruzi*. *Imprint* de fígado, apresentando células rompidas liberando formas amastigotas de *T. cruzi*, bem como de células ainda não rompidas (A e B). Esfregaço de sangue, apresentando

formas tripomastigotas de *T. cruzi* (C e D). *Imprint* de língua, com a presença de formas amastigotas, como indicada na seta (E).

Fonte: Arquivo pessoal

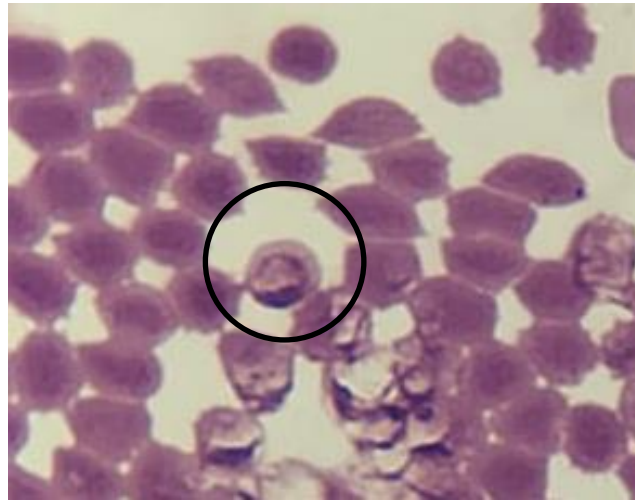


Figura 14: Visualização microscópica de esfregaço sanguíneo de camundongo previamente infectado com açai. Figura referente ao **Grupo 3**, correspondente a camundongo infectado com amostra de açai positiva à tamisação forçada - amostra 19). Pode-se notar formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

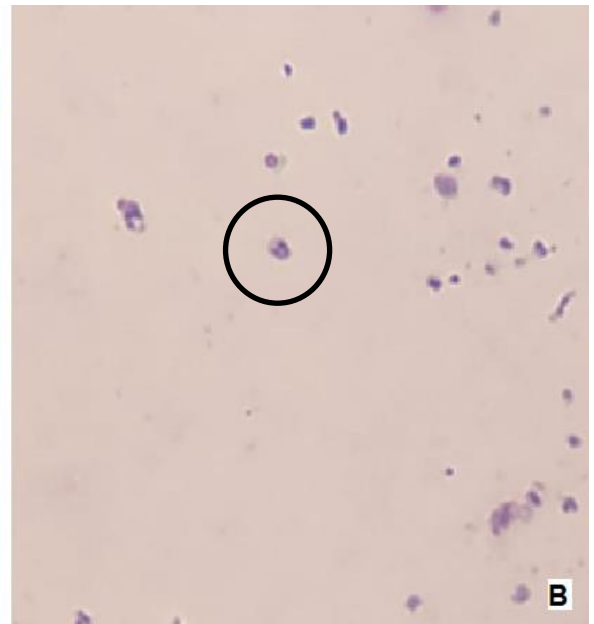
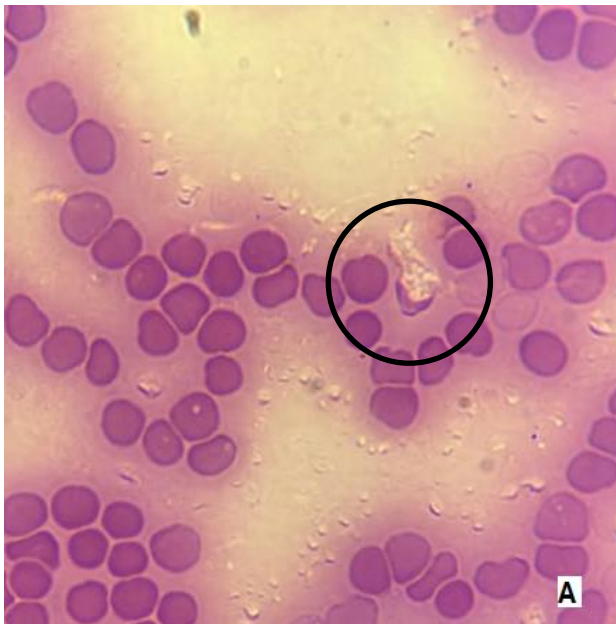


Figura 15: Visualizações microscópicas de esfregaço sanguíneo e de *imprint* de língua de camundongo previamente infectado com açai. Figuras A e B, referentes ao **Grupo 4**, infectados com amostra 12 (positiva à PCR). Esfregaço sanguíneo, podendo-se verificar forma tripomastigota de *T. cruzi*, circulada (A). *Imprint* de língua, verificando-se forma amastigota de *T. cruzi*, circulada (B).

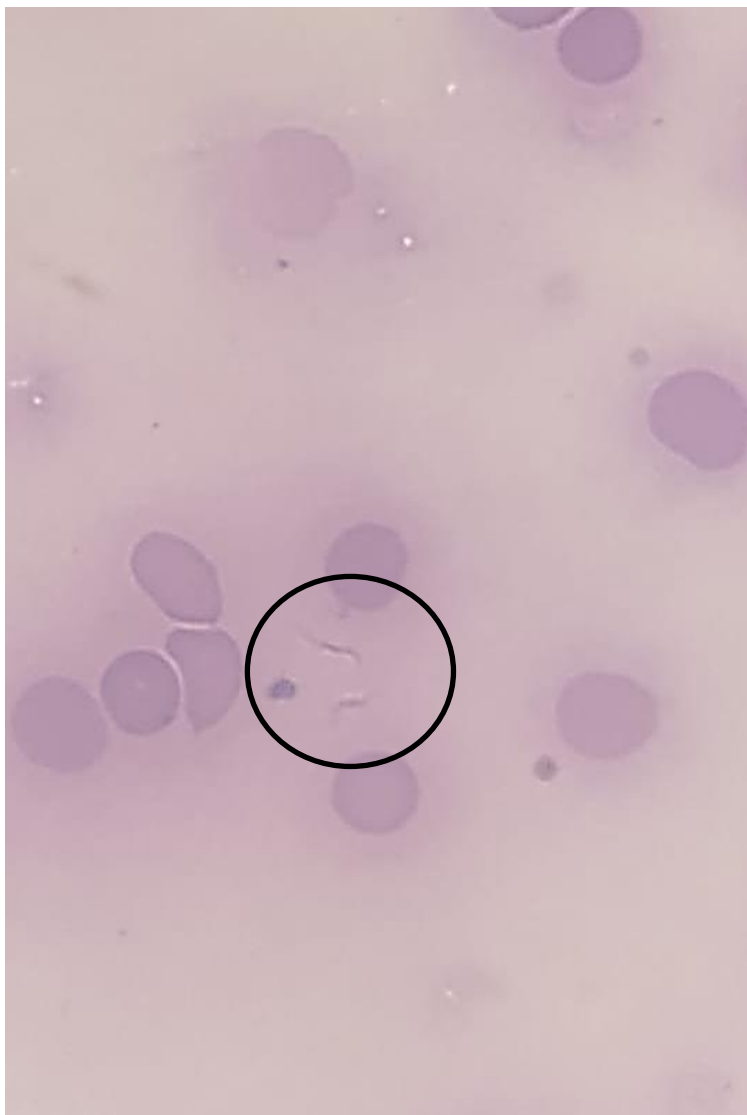


Figura 16: Visualização microscópica de esfregaço sanguíneo de camundongo previamente infectado com açaí. Figura referente ao **Grupo 5**, infectados com amostra de açaí positiva à PCR (amostra 13). Pode-se visualizar formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Fonte: Arquivo pessoal

A visualização de formas evolutivas de *T. cruzi* em todos os grupos experimentalmente infectados indicam que as amostras de açaí contaminadas foram passíveis de realizar a infecção *in vivo* em camundongos.

Apesar da baixa concentração de DNA nas amostras de açaí, o que foi possível de visualizar perante a leitura referente à quantificação de DNA (Anexo 3), pudemos inferir a baixa carga parasitária em sangue e tecidos.

No grupo controle positivo (Grupo 1), inoculado com açaí contendo cepa Y de *T. cruzi*, foi possível a visualização de formas tripomastigotas no sangue, bem como de formas amastigotas em tecido hepático, o que difere das observações relatadas por Borges (1982), o qual observou formas amastigotas apenas em tecido cardíaco,

pela inoculação de cepa Y de *T.cruzi* e observação a partir do oitavo dia, em que verificou-se ação inicialmente miotrópica. Nossas observações permitiram visualização de formas amastigotas em fígado, no sétimo dia de infecção, podendo-se inferir que, devido ao fígado fazer parte do sistema fagócito monocitário, o qual possui grande quantidade de macrófagos, logo ocorre multiplicação intensa do *T. cruzi*, o qual invade as células sob a forma tripomastigota e ocorrendo sua diferenciação para formas amastigotas, com intensa multiplicação e invasão de novas células.

Barreto de Albuquerque et al. (2018) verificaram que, em trabalho experimental em camundongos, o local de entrada do parasita, pela boca, pela infecção oral (IO), que é mais semelhante à infecção natural, comparado à infecção gastrointestinal (IG), promove diferentes respostas imunológicas e mortalidade do hospedeiro. Assim, em comparação com os camundongos inoculados via IG, os camundongos inoculados via IO apresentaram elevada taxa de infecção e parasitemia, tendo-se observado que cavidade oral era o sítio primário de infecção e que a cavidade nasal compreendeu a maior parte da replicação do parasita, verificado pela técnica de bioluminescência (SILVA-DOS-SANTOS et al., 2017). Em nossas observações, foi possível detectar-se formas amastigotas na língua, em camundongos pertencentes aos grupos 1 (controle positivo) e 4 (grupo de camundongos que receberam açaí positivo à PCR para *T.cruzi*), podendo-se inferir a maior carga parasitária nestes grupos.

Deve-se atentar ao fato da cepa presente nas amostras de açaí utilizadas para inoculação serem desconhecidas, e que cada cepa tem seu pico de parasitemia e seu tropismo para determinado tecido, o que possibilita o desenvolvimento de diferentes formas clínicas de apresentação da DC.

Segundo Nogueira-Paiva (2015) as cepas Be-62 são mais virulentas, apresentam pico de parasitemia no sétimo dia de infecção e suas formas são mais delgadas; já a Be-78 tem pico de parasitemia após 10 dias de infecção e visualmente suas formas são mais largas.

Outro estudo realizado por Silva (2006), testando-se quatro cepas diferentes: AMJM, BFS, NCS, NBR, foi possível observar que as cepas apresentaram dias diferentes de pico de parasitemia variando de 18 a 23 dias e com diferentes reações inflamatórias, as quais algumas atingiram musculo cardíaco e esquelético como a AMJM; a cepa NCS ocasionou inflamações nos músculos cardíacos, esqueléticos e gânglios nervosos; já a BFS apresentou alterações nos músculos cardíacos e intestino.

Schlemper Junior (1986), em um estudo com cepas do Sul do Brasil, estabeleceu

que a cepa SC-1 apresentava uma quantidade alta de parasitas circulantes logo no sexto dia de infecção e um nível de parasitemia crescente até a morte, e a SC-5 apresentou aumento de parasitemia após o décimo dia e um pico de parasitemia com 26 dias.

Um estudo realizado por Magalhães (1985) demonstrou-se que a cepa Y de *T. cruzi* apresentou um aumento de parasitas no sétimo dia de infecção, e um pico de parasitemia no décimo dia de infecção, tendo-se seu parasitismo atingido macrófagos do baço, fígado e tecido adiposo e baixo tropismo por células do miocárdio, o que corrobora com as observações do presente estudo, já que não foram encontradas formas amastigotas em tecido cardíaco, tanto no grupo controle positivo, infectado com açaí contendo formas da cepa Y de *T. cruzi*, quanto dos demais grupos avaliados.

Desta forma, nota-se que as cepas apresentam tropismo por diferentes locais, bem como pico de parasitemia divergentes. Verificamos de uma maneira geral, nos cinco grupos avaliados, uma baixa carga parasitária, a qual não possibilitou a detecção de DNA de *T. cruzi* a partir da PCR, sendo somente possível a pesquisa direta das formas de *T. cruzi* pela microscopia óptica.

Na fase aguda da doença de Chagas o período de incubação varia de 20 a 40 dias, porém períodos mais curtos (8 dias) e mais longos (120 dias) já foram descritos, sendo mais prolongado do que se observa na transmissão pela via vetorial (Santos 2016).

Estudo realizado por Añez (2021) pretendeu identificar se *T. cruzi* apresentava algum tropismo específico para tecidos ou para células generalizadas em mamíferos; desta forma, camundongos foram inoculados via intraperitoneal e intradérmica, e os resultados mostraram que *T. cruzi* de cepas DTU1 e DTU2 não apresentou tropismo específico de tecidos, sendo capaz de invadir tecidos ectodérmicas (cérebro e pele), mesodérmicas (coração e baço) e endodérmicas (fígado, musculo esquelético e intestino), independentemente da linhagem do parasita, forma infecciosa, rota de entrada ou tamanho do inóculo causando a infecção do hospedeiro.

Dias et al. (2013), apresentaram um estudo com a evolução da infecção em camundongos inoculados via intraperitoneal e via oral, tendo-se verificado que, camundongos infectados oralmente apresentaram níveis de parasitemia, bem como taxas de infectividade e mortalidade, menores do que os animais inoculados via intraperitoneal, independentemente do inóculo. Neste estudo, os camundongos foram avaliados após 7 dias de evolução, quando então foram eutanasiados, sendo que não sabemos a cepa de *T. cruzi* a qual estava presente no açaí contaminado.

Desta forma, a via oral da infecção por *Trypanosoma cruzi*, o período de

incubação, as cepas inoculadas e as consequências no hospedeiro são fatores importantes e condicionam à forma de como a doença irá manifestar-se dentro do modelo animal. Rotas distintas de entrada de parasitas podem afetar o sistema imunológico (BARRETO de ALBUQUERQUE et al, 2018).

5.5 PCR convencional - órgãos de camundongos

Previamente à realização da PCR nas amostras extraídas de órgãos de camundongos macerados, realizou-se a quantificação de DNA (Anexo 10).

Após extração de DNA, todas as 35 amostras coletadas foram destinadas à PCR convencional e eletroforese, utilizando-se os *primers*: 121/122, os quais amplificam minicírculos de kDNA de *T. cruzi*, com 330pb. Dos resultados da PCR com os *primers* 121/122, todas as 35 amostras foram negativas.

Como discutido acima, verificamos uma baixa carga parasitária em sangue e tecidos dos cinco grupos avaliados, incluindo-se o grupo controle positivo, o qual também não possibilitou a detecção de DNA de *T. cruzi* a partir da PCR, sendo somente possível a pesquisa direta de formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* pela microscopia óptica, nos grupos controle positivo e nos grupos de camundongos que receberam açaí positivo à técnica de tamisação forçada e açaí positivo à PCR para *T. cruzi*. Gomes (1998) relata que a PCR tem uma sensibilidade boa, porém ainda limitada em indivíduos com parasitemia baixa, o que pudemos observar frente ao teste de PCR a partir de sangue e órgãos de camundongos infectados com amostras de açaí positivas para *T. cruzi*. Além disso, trabalho de Pereira et al. (2016), afirmaram que a variabilidade na sensibilidade da PCR pode ser explicada devido a quantidade de parasitas existentes circulantes no momento da coleta.

5.6 Análise estatística

Foram obtidos dados descritivos para os resultados parasitológicos e PCR, e dados numéricos para dados relacionados à pesagem de órgãos e quantificação de DNA. Desta forma, as análises basearam-se em um modelo linear generalizado com distribuição gama (assimétrica), seguido do teste de comparação múltipla de Wald. Em todos os testes foi fixado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. Todas as análises foram feitas pelo programa SAS for windows, v9.4.

Com base nas análises sobre a pesagem de órgãos coletados nos diferentes

grupos de camundongos (Tabela 1), em uma análise geral, quando comparamos inicialmente o Grupo 1 (controle positivo), com os outros grupos, este difere-se estatisticamente: do grupo 2 no coração, do grupo 3 em fígado, do grupo 4 em relação a todos os órgãos, e do grupo 5 em coração e fígado. Verificou-se também diferença estatística entre o grupo 1 do grupo 2 (grupo controle negativo), em relação ao coração; porém o valor de p não mostra uma diferença estatística significativa.

O valor de p mostra uma diferença estatisticamente considerável nos órgãos fígado e baço (em destaque na Tabela 1). Em relação ao fígado, quando comparamos os grupos 1 e 2, os mesmos diferem-se dos grupos 3, 4 e 5, indicando uma hepatomegalia.

Em relação ao baço, a diferença estatística está nos grupos 1, 2, 3 e 5, quando comparado com o grupo 4, dados estes que não apresentaram relação com dados descritos anteriormente, indicando uma esplenomegalia.

Os testes foram aplicados a todos os órgãos, com exceção da língua, pois não houve padrão de coleta, tendo em vista que se coletou apenas uma porção do órgão, e não o órgão inteiro, como ocorreu com o fígado, baço e coração. Desta forma, não foi realizada a comparação deste órgão entre os grupos.

Tabela 1: Comparação de médias entre grupos para os pesos de órgãos.

	G1		G2		G3		G4		G5		
Órgãos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	p-valor
Coração	0.11a	0.08	0.20b	0.01	0.15a	0.03	0.20b	0.02	0.18b	0.00	0.1684
Fígado	0.53a	0.13	0.76a	0.47	1.08b	0.04	1.08b	0.21	1.10b	0.19	0.0179
Baço	0.12a	0.04	0.19a	0.12	0.17a	0.01	0.54b	0.58	0.18a	0.05	0.0182

Comparação entre grupos utilizando um modelo linear generalizado com distribuição gama.
Médias seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste de Wald

O teste também foi aplicado para a comparação entre os grupos em relação a quantificação de DNA (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação de médias entre grupos para quantificação de DNA.

		G1		G2		G3		G4		G5		
Órgãos	Variáveis	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	p-valor
Baço	DNA	1,71	0,04	1,52	0,43	1,72	0,07	1,78	0,03	1,84	0,03	0,3753
Coração	DNA	1,55	0,19	1,79	0,25	1,74	0,05	1,72	0,28	1,62	0,44	0,7463
Fígado	DNA	1,79a	0,05	1,87a	0,05	1,83a	0,04	1,32b	0,13	1,79a	0,02	<0,0001
Língua	DNA	1,81	0,08	1,89	0,03	1,88	0,09	1,52	0,41	1,77	0,08	0,1890
Sangue	DNA	1,7	0,26	1,86	0,06	1,78	0,34	1,73	0,17	1,82	0,09	0,8393

Comparação entre grupos utilizando um modelo linear generalizado com distribuição gama.

Médias seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste de Wald

Observa-se que o fígado apresentou diferença estatística significativa (em destaque na Tabela 2), entre os grupos. Isso pode ser justificado devido o fígado fazer parte do sistema fagócito monocitário, tendo-se assim grande quantidade de macrófagos, logo ocorrendo multiplicação intensa do *T. cruzi*, o qual invade as células sob a forma tripomastigota, adentrando em macrófagos, para sua diferenciação em amastigotas e intensa multiplicação.

Considerando o valor de p indicar uma diferença estatística significativa para fígado, comparou-se os grupos entre si; logo, notou-se que o grupo 4, quando comparado a outros grupos diferencia-se, porém, esta significância não tem relação com os dados obtidos anteriormente de leitura de lâminas e pesagem de órgãos.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- Este estudo permitiu a verificação de forma tripomastigota de *T.cruzi* em eluato de polpa de açaí, comercializada em sorveteria, sendo o primeiro relato na região;
- Houve a detecção do material genético de *T.cruzi* em duas amostras de açaí, adquiridas de um mesmo município, sinalizando a importância da fiscalização para a comercialização adequada do fruto seguindo as boas práticas sanitárias;
- A infectividade das amostras de açaí foi investigada, concluindo-se assim que as amostras de açaí positivas à tamisação e à PCR foram capazes de causar infecção *in vivo* em camundongos inoculados via gavagem.

Referências

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ALVES, I. C. B. **Caracterização da resposta imune humoral de indivíduos com Doença de Chagas**. 2017. Tese de Doutorado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 2017.

AMAPÁ (Estado). Lei nº 1914, de 03 de julho de 2015. Dispõe sobre a implementação do Programa Estadual de Qualidade do Açaí e cria o selo qualidade para estabelecimentos que produzam bebidas e alimentos de consumo humano de origem vegetal (açaí e bacaba) no Estado do Amapá e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado**, Macapá, 3 jul, 2015.

AMATO NETO V; CAMPOS R; HIGAKI Y. Análise clínica e baseada em exames subsidiários de paciente da qual foi isolada, há vinte e três anos, a cepa y do *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto Medicina Tropical**, São Paulo, VOL. 16, n. 4, p. 238-244, 1974.

AÑEZ, N., & CRISANTE, G. The tissue specific tropism in *Trypanosoma cruzi*. Is it true? **Acta Tropica**, v. 213, p. 105736, 2021.

BARRETO DE ALBUQUERQUE, Juliana et al. Inoculação oral versus intragástrica: Caminhos similares da infecção experimental de *Trypanosoma cruzi*? A partir de tecidos alvo, evasão de parasitas e resposta imune. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1734, 2018.

BARBOSA, Rodrigo Labello et al. Survival in vitro and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açaí pulp in experimental acute Chagas disease. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 3, p. 601-606, 2012.

BARBOSA, Rodrigo Labello et al. Virulence of *Trypanosoma cruzi* from vector and reservoir *in natura* açaí pulp resulting in food-borne acute Chagas disease at Pará State, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 197, p. 68-75, 2019.

BEZERRA, V. S. **Açaí congelado / Valéria Saldanha Bezerra**. – Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 40 p. – (Coleção Agroindústria Familiar). 2017.

BISIO, Margarita et al. Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: prospective polymerase chain reaction study in pregnancy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 543-549, 2011.

BORGES, M. M., Mello, D. A., & Teixeira, M. L. Results of the experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia) with human strains of *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, v. 16, n. 4, p. 233-242, 1982.

¹ ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

BORGES, C. R. B. **Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi***. 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2008.

BRASIL (SP). **RDC 175, 08 de julho de 2003**. Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2003/rdc/175_03rdc.htm.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina. **Nota técnica**. Brasília, 2005a.

BRASIL (SP). **RDC 218, 29 de julho 2005**. Regulamento Técnico de Procedimento higiênico sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2005b. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-218-de-29-de-julho-de-2005.pdf/view>

BRASIL (SP). LEI Nº 11.326, DE 24 de julho de 2006. Constituição da República Federativa. Brasília, DF: Presidência da República. 2006. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Lei/L11326.htm.

BRASIL (SP). **Projeto de lei nº178, de 10 de agosto de 2010a**. Senado federal. Senado Federal: Brasília, DF, 2010. Disponível em: <https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/97286>.

BRASIL, Pedro EAA et al. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. **Revista Patologia Tropical**, v. 42, n. 4. Brasília, 2013. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Nov/18/Informe_Diagnostico_DC_NUCOM_2.pdf. E publicada com autorização da Gerência Técnica de Raiva e Chagas, Ministério da Saúde, 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Doença de Chagas Aguda no Brasil: Série Histórica de 2000 a 2013. **Boletim Epidemiológico**, 46, p21. Brasília, 2015.

BRASIL (SP). **Guia de vigilância em saúde – volume 3. 1ªed**. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2017a. Disponível em:

¹ ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

http://www.hc.ufu.br/sites/default/files/tmp/volume_3_guia_de_vigilancia_em_saude_2017.pdf.

BRASIL (SP). **Projeto de lei nº 6672, de 13 de dezembro de 2016**. Câmara dos Deputados: Brasília, DF. 2017b. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=2120907>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Diário Oficial da União: Portaria de consolidação Nº4**. Brasília, 2017c. Disponível em http://portalsinan.saude.gov.br/images/documentos/Legislacoes/Portaria_Consolidacao_4_28_SETEMBRO_2017.pdf

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. **Instrução Normativa nº37**. Diário Oficial da União. Ed. 194, p. 28, sessão 1. Brasília, 2018a. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/44304988/do1-2018-10-08-instrucao-normativa-n-37

BRASIL (SP). **LEI Nº 13.648, de 11 de abril de 2018**. Constituição da República Federativa. Brasília, DF: Presidência da República. 2018b. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2018/lei/L13648.htm.

BRASIL (SP). **LEI Nº 13.680, de 14 de junho de 2018**. Constituição da República Federativa. Brasília, DF: Presidência da República. 2018c. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2018/Lei/L13680.htm.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: **Boletim epidemiológico – Panorama da Doença de Chagas no Brasil**. Vol. 50, Nº 36. Brasília, 2019a. Disponível em: <https://www.hmg.saude.gov.br/images/pdf/2019/novembro/29/Boletim-epidemiologico-SVS-36-interativo.pdf>.

BRASIL (SP). **Decreto Nº 10.026, de 25 de Setembro de 2006**. Constituição da República Federativa. Brasília, DF: Presidência da República. 2019b. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2019-2022/2019/Decreto/D10026.htm#:~:text=DECRETO%20N%C2%BA%2010.026%2C%20DE%2025,artesanais%20em%20estabelecimento%20familiar%20rural.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde de A a Z: Doença de Chagas. Brasília, 2020a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/d/doenca-de-chagas>.

BRASIL. **Portaria nº 1.061, de 18 de maio de 2020**. Brasília, DF: Ministério da Saúde (Diário Oficial da União). 2020b. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/06/PORTARIA-N%C2%BA->

¹ ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

[1.061-18-DE-MAIO-2020-DOU-Imprensa-Nacional.pdf](#).

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Diário Oficial da União. **Portaria Nº 264**, ed. 35, p. 97, sessão 1. Brasília, 2020c. Disponível em < <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-264-de-17-de-fevereiro-de-2020-244043656>>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. **Boletim Epidemiológico** [Internet]. 2020d. abr; 51:1-43. Disponível em: <https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/97286>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. **Boletim Epidemiológico** [Internet]. 2021. abr; número especial. Disponível em: [af boletim especial chagas 14abr21 b \(1\).pdf](#)

CARDOSO, Adriana VN et al. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 287-289, 2006.

CARLIER, Yves et al. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, p. e1250, 2011.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

COURA, J. R. Relatório apresentado ao Instituto Nacional de Endemias rurais. **Ministério da Saúde, sobre surto de doença de Chagas Aguda ocorrido em teutônia, Município de Estrela, rio grande do Sul**, 1966.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Análise Mensal: Açaí Fruto. Março de 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-acai/item/11112-acai-analise-mensal-marco-2019>.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Análise Mensal: Açaí Fruto. Março de 2019. Disponível em: [file:///C:/Users/Abner/Downloads/AcaiZ-ZAnaliseZMensalZ-ZMarcoZ-Z2020%20\(5\).pdf](file:///C:/Users/Abner/Downloads/AcaiZ-ZAnaliseZMensalZ-ZMarcoZ-Z2020%20(5).pdf)

DE ARAÚJO, S. Marques; CHIARI, E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3 H isogênicos. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 2, p. 175-181, 1988.

¹ ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

DE OLIVEIRA IZAR, M. C. Atualização em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. Cerqueira César, São Paulo, 26(4):222-271, 2016.

DE MATTOS, E. C. et al. Molecular detection of *Trypanosoma cruzi* in acai pulp and sugarcane juice. **Acta Tropica**, v. 176, p. 311-315, 2017.

DE MATTOS, E. C. et al. Determinação da viabilidade de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí e caldo de cana de açúcar experimentalmente contaminados. **BEPA (Boletim Epidemiológico Paulista)**, v. 16, n. 183, p. 15-23, 2019.

DIAS, L. C. et al. Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DIAS, G. B. M. et al. Evolução da infecção em camundongos inoculados pela rota oral com diferentes formas de desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* e II. **Parasitologia Experimental**, v. 135, n. 3, p. 511-517, 2013.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7-86, 2016.

FERREIRA, E. A. P. et al. O branqueamento do açaí em bateadeiras artesanais para controle do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas. In: **Embrapa Amapá-Resumo em Anais de Congresso (ALICE)**. In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAPÁ, 2., 2016, Macapá. Resumos... Macapá: Embrapa Amapá, 2016a.

FERREIRA, R. T. B. et al. Extraction of *Trypanosoma cruzi* DNA from food: a contribution to the elucidation of acute Chagas disease outbreaks. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 190-195, 2016b.

FERREIRA, R. T. B. et al. Detecção e genotipagem do *Trypanosoma cruzi* a partir de produtos de açaí comercializados no Rio de Janeiro e Pará, Brasil. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2018a.

FERREIRA, J. J. G. et al. Quantificação da carga parasitária do *Trypanosoma cruzi* pela PCR em tempo real em portadores da doença de Chagas submetidos ao transplante renal atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp. 2018. Dissertação digital (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2018b.

FERREIRA, A. M. et al. Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da

¹ ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 27, p. 354-362, 2019.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. Comissão de ética de uso animal em experimentação (CEUA). Manual de utilização de animais. Rio de Janeiro, 1ed, 2008.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Gonçalo Muniz. Teste rápido para Doenças de Chagas obtém registro ANVISA. Bahia, 2020. Disponível em < <https://www.bahia.fiocruz.br/teste-rapido-para-doenca-de-chagas-obtem-registro-da-anvisa/>>.

FITZWATER, S. et al. Polymerase chain reaction for chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 768-770, 2008.

GASPARIM, A. Z. et al. Epidemiological and clinical profile of patients with chagas disease in the central-north area of Paraná, Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 225–230, 2018.

GOMES, M. L. *Trypanosoma cruzi*: otimização da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da doença de Chagas crônica e caracterização molecular de cepas isoladas de pacientes chagásicos crônicos no noroeste do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 327-328, 1998.

HOMMA, A. K. O. et al. Açai: novos desafios e tendências. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em Periódico Indexado (ALICE)**, 2006.

IBGE. Banco de Tabelas Estatísticas (SIDRA): Produção Agrícola Municipal. 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>.

LEWIS, M. D. et al. Imagem do desenvolvimento da doença crônica de Chagas após transmissão oral. **Relatórios Científicos**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

MACHADO, F. S. et al. Chagas heart disease: report on recent developments. **Cardiology in Review**, v. 20, n. 2, p. 53, 2012.

MAZZA, S. et al. Transmission del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas. **Missão de Estudos da Patologia Regional Argentina (MEPRA)**.28:41-6, 1936.

MAGALHÃES, J. B., Pontes, A. L., & Andrade, S. G. Comportamento das cepas Y e Peruana do *Trypanosoma cruzi* no camundongo, após passagem em diferentes meios. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p. 41-50, 1985.

¹ ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

NEVES AL, et al. Estudo experimental da viabilidade do *Trypanosoma cruzi* no açaí e infecção em camundongos. In: **59th Anual Meeting of Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC)**. 2007.

NOYES, H. A.; CAMPS, A. P.; CHANCE, M. L. *Leishmania herreri* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 119-123, 1996.

NOGUEIRA-PAIVA, N. C. **Influência da infecção por uma cepa policlonal do *Trypanosoma cruzi* sobre a resposta imune no coração e cólon durante a fase aguda da infecção experimental de camundongos**. 2015. 133f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde. Doença de Chagas: Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da Doença de Chagas transmitida por alimentos. Rio de Janeiro: OPAS, cap. 1, 2009.

OPAS- Organização Pan Americana de Saúde. 70% das pessoas das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas. Dia mundial da DC, 2021.

PALOMINO-CAMARGO, C.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 31, p. 535-546, 2014.

PARÁ. Decreto n. 326, de 20 janeiro de 2012. Estabelece requisitos higiênico-sanitários para a manipulação de açaí e bacaba por batedores artesanais, de forma a prevenir surtos com Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) e minimizando o risco sanitário, garantindo a segurança dos alimentos. Diário Oficial do Estado, Belém, PA, 24 jan, 2012.

PASSOS, L. A. C. et al. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo in vitro e in vivo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 2, p. 223-232, 2012.

PAIVA, FP de; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. Curso de manipulação de animais de laboratório. **Salvador: Ministério da Saúde, FIOCRUZ**, 2005.

PEREIRA, M. B. et al. The detection of *Trypanosoma cruzi* by nested-PCR in elderly patients: relationship to the clinical and epidemiological profile. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 228-232, 2016.

PONCE, C. et al. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas' disease by detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p.

¹ ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

5065-5068, 2005.

RODDY, P. et al. Field evaluation of a rapid immunochromatographic assay for detection of *Trypanosoma cruzi* infection by use of whole blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2022-2027, 2008.

SILVA, M. A.; NAI, G. A.; DA ROSA, J. A. Caracterização Biológica e Molecular: Quatro cepas de *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 35, n. 3, p. 213-226, 2006.

SANTANA, R. A. G. et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Disease**. Jan;25(1):132-135, 2019

SANTOS, D. S. dos et al. **Órgãos alvo do *Trypanosoma cruzi* em modelo experimental de fase aguda da doença de Chagas por transmissão oral**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 2016.

SANTOS, V. R. C. dos et al. Human acute Chagas disease: changes in factor VII, activated protein C and hepatic enzymes from patients of oral outbreaks in Pará State (Brazilian Amazon). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020.

SCHIJMAN, A. G. Diagnóstico molecular de *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 184, p. 59-66, 2018.

SCHIJMAN AG, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Neglected Tropical Disease**. 5: e931, 2011.

SCHLEMPER JUNIOR, B. R. et al. Tripomastigota muito largo como padrão morfológico de cepas do *Trypanosoma cruzi* do extremo Sul do Brasil? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 191-198, 1986.

SILVA, A. L. M. da et al. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de Benznidazol para a Doença de Chagas. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1163, 2007.

SILVA, N. N. da et al. — Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. **Revista Instituto Medicina Tropical S. Paulo**, 10:265-276, set./out. 1968.

SILVA, A. C. O. **Avaliação da influência do tratamento com benzonidazol na**

¹ ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

resposta imunológica em camundongos infectados com clones isolados de cepas do *Trypanosoma Cruzi*, de diferentes biodemas, suscetíveis e resistentes à quimioterapia. 2017. Dissertação digital (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador 2017.

SILVA-DOS-SANTOS, D. et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005507, 2017.

SIMÕES, M. V. et al. Cardiomiopatia da Doença de Chagas. **Intituto Jornal Cardiovascular Sciences(Impr.)**, v. 31, n. 2, p. f: 173-l: 189, 2018.

SIMÕES NETO, E. A. et al. Surto epidêmico de Doença de Chagas aguda (DCA) por transmissão oral no Maranhão: relato de 39 casos. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 54., 2018, Olinda, Pernambuco: **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 1 p. pôster, 2018.

SOUZA, B. A. dos S. M. **Análise da resposta imune regional de órgãos linfoides durante a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos inoculados por via oral, subcutânea e intravenosa.** 2017. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) – Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

Sousa E.S.M. **Avaliação experimental e revisão sistemática da transmissão de *Trypanosoma cruzi* pela cana de açúcar contaminada.** [dissertação]. Goiás: Universidade Federal de Goiás; 2009.

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

SUCEN- Superintendência de Controle de Endemias. Diretoria de Combate a Vetores. 2016. Disponível em: <http://saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/doenca-de-chagas/situacao-atual>.

TAVARES, G. D. S., e HOMMA, A. K. O. Comercialização do açaí no estado do Pará: alguns comentários. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2015.

TEIXEIRA, A. A. R. **Reconhecimento molecular na doença de chagas do ponto de vista do parasita e do hospedeiro.** 2017. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Bioquímica). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

UNIFAL – Univesidade Federal de Alfenas. **Tabela de doses.** Centro de Bioterismo. Minas Gerais, 2016.

¹ ABNT. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

VARGAS, A. et al. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, p. e00006517, 2018.

VIEIRA, A. R. A. **Desenvolvimento e padronização de métodos para detecção de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*)**. 2015. xiii, 54 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record= Relevé Épidémiologique Hebdomadaire**, v. 90, n. 06, p. 33-44, 2015.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 101-107, 2009.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 101-107, 2009.

YOSHIDA, N.; CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. In: Molecular Mechanisms of Parasite Invasion. **Springer**, New York, NY, p. 82-91, 2008.

ZAIDAN, R. A química e as doenças negligenciadas: busca por remédios mais eficazes e seguros. **ComCiência**, n. 130, p. 0-0, 2011.

¹ ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

Anexos

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1: Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo (CEUA/FMB/Unesp).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		
unesp		Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012
CERTIFICADO Nº 1299/2019-CEUA		
Certificamos que o projeto intitulado: "Pesquisa da contaminação e avaliação da infectividade por Trypanosoma cruzi em polpas de açaí comercializadas em municípios do Estado de São Paulo.", conduzido pela Pesquisadora: Diana Zapparoli – Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis – Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Mattos dos Santos, registrada com o nº 1299/2019, 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 n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, 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 Medicina de Botucatu, em reunião de 19 de junho de 2019.		
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	09 de janeiro de 2022	
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos Isogênico	
Nº de animais	50	
Idade/Peso	60 dias – 25 gr	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central	
 Sara Rosa Stanley Sampaio Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP		 Profa. Associada Bertha Furlan Polegato Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP
Distrito Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP, CEP: 13.618-970 Fones: (14) 3880.18.80 – E-mail Secretária: ceua@fmb.unesp.br		

8.2 Anexo 2: Protocolo de extração de DNA em tecidos - kit IllustraTissue™genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare®)

1. O tecido já preparado em microtubo deverá ser centrifugado a 16000rcf por 2 min.
2. Descartar o sobrenadante e adicionar 50 uL de PBS 7,2.
3. Agitar por 10 seg. no agitador (vortex).
4. Adicionar 50 uL da solução Lise 1.
5. Adicionar 10 uL da solução proteinase K e agitar por 15 seg.
6. Incubar em banho-maria por 60 min. a 56 °C.
7. Após esse período centrifugar a 2000rcf por 10 seg.
8. Adicionar 500 uL de Lysis Buffer Type 4 e agitar por 15 seg.
9. Incubar o microtubo na temperatura ambiente por 10 min.
10. Paralelamente, montar uma minicoluna dentro de um tubo coletor.
11. Transfira o conteúdo do microtubo dentro da minicoluna.
12. Centrifugar por 1 minuto a 11 000 rcf.
13. Remover o tubo coletor para descartar o conteúdo e montar a minicoluna no mesmo tubo coletor.
14. Adicionar 500 uL de Lysis Buffer Type 4 à coluna.
15. Centrifugar por 1 minuto a 11 000 rcf.
16. Descartar o conteúdo do tubo coletor e montar a minicoluna novamente nele.
17. Adicionar 500 uL de Wash Buffer Type 6.
18. Centrifugar por três minutos a 11000rcf e descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo livre de DNase.
19. Adicionar 50 uL do buffer de eluição, preaquecido a 70 °C.
20. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
21. Centrifugar por 1 minuto a 11000 rcf.
22. Descartar a coluna e armazenar o microtubo em freezer a -20 °C.

8.3 Anexo 3: Quantificação de DNA a partir da extração das amostras de açaí comercializada.

Amostra	Concentração de DNA (mg/mL)	Relação $\frac{Abs\ 260nm}{Abs\ 280nm}$
1	46,5	1,329
2	30,5	1,326
3	25,0	1,064
4	7,8	1,431
5	14,2	1,466
6	46,0	1,150
7	28,0	1,120
8	30,0	1,224
9	22,5	1,216
10	22,7	1,679
11	24,5	1,670
12	62,0	1,653
13	0,8	1,778
14	45,5	1,685
15	115,5	1,582
16	15,9	1,105
17	24,0	1,200
18	73,5	0,925
19	21,2	1,134
20	5,8	1,589
21	34,2	1,276
22	23,7	1,145
23	21,9	1,846
24	13,6	1,083
25	24,0	1,659
26	32,3	1,378
27	46,0	1,046
28	24,0	1,322
29	36,2	1,342
30	5,0	1,259
31	47,0	1,768
32	8,7	1,600
33	21,5	0,902
34	23,0	1,005
35	37,8	1,645

8.4 Anexo 4: Meio de cultura- NNN-LIT

Mc Neal, Novy & Nicolle + Liver Infusion Tryptose

REAGENTES:

Agar1,4g

NaCl.....0,6g

H₂O bidestilada.....completar para 100 mL

PREPARO:

1. Adicionar o agar na água previamente aquecida e aquecer até a fusão.
2. Autoclavar a 120°C durante 20 minutos.
3. Resfriar até 48-52°C e em capela adicionar 15% de sangue desfibrinado e inativado a 56°C por 30 minutos.
4. Distribuir 5 mL por tubo e manter inclinado até a polimerização (mais ou menos 20 a 30 minutos)
5. Adicionar o LIT até a metade da altura do agar-sangue.

ÁGAR UTILIZADOS:

Bacto Agar (DIFCO) ou AGAR AGAR (SIGMA-A-7002) ou Blood Agar Base (MERCK-10886).

8.5 Anexo 5: Meio de cultura- LIT (LIVER INFUSION TRYPTOSE)

Preparo para 500mL:

Na_2HPO_4 s/ H_2O = 4g

NaCl = 2g

Dextrose = 1g

Triptose = 2,5g

Infusão de fígado = 1,5 g

KCl = 0,2 g

Hemoglobina bovina (2,2%) = 11 mL

Soro fetal bovino (11%) = 55 mL

Gentamicina (20 mg) = 1 mL

Modo de preparo:

Diluir os sais em proveta com 200 mL de H_2O Mili-Q e transferir para um kitassato. Lavar a proveta com 89 mL de H_2O Mili-Q e adicionar à mesma.

Montar o filtro no kitassato e autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Diluir a infusão de fígado em 200 mL de H_2O Mili-Q aquecida, acrescentar a dextrose e a triptose e filtrá-los. A hemoglobina bovina deve ser filtrada por último.

Ligar a luz UV durante 30 minutos em capela de fluxo laminar. Após este período, adicionar o soro fetal bovino (previamente filtrado) e a gentamicina no meio de cultura. Homogeneizar bem, cuidadosamente.

Distribuir o meio LIT para tubos grandes rosqueados estéreis, com capacidade de 30 mL.

Manter os tubos em estufa a 37°C durante 48 horas para controle de esterilidade e, após este período, mantê-los em estufa a $28-30^\circ\text{C}$.

8.6 Anexo 6: Meio de cultura- 199

PARA 30 AMOSTRAS:

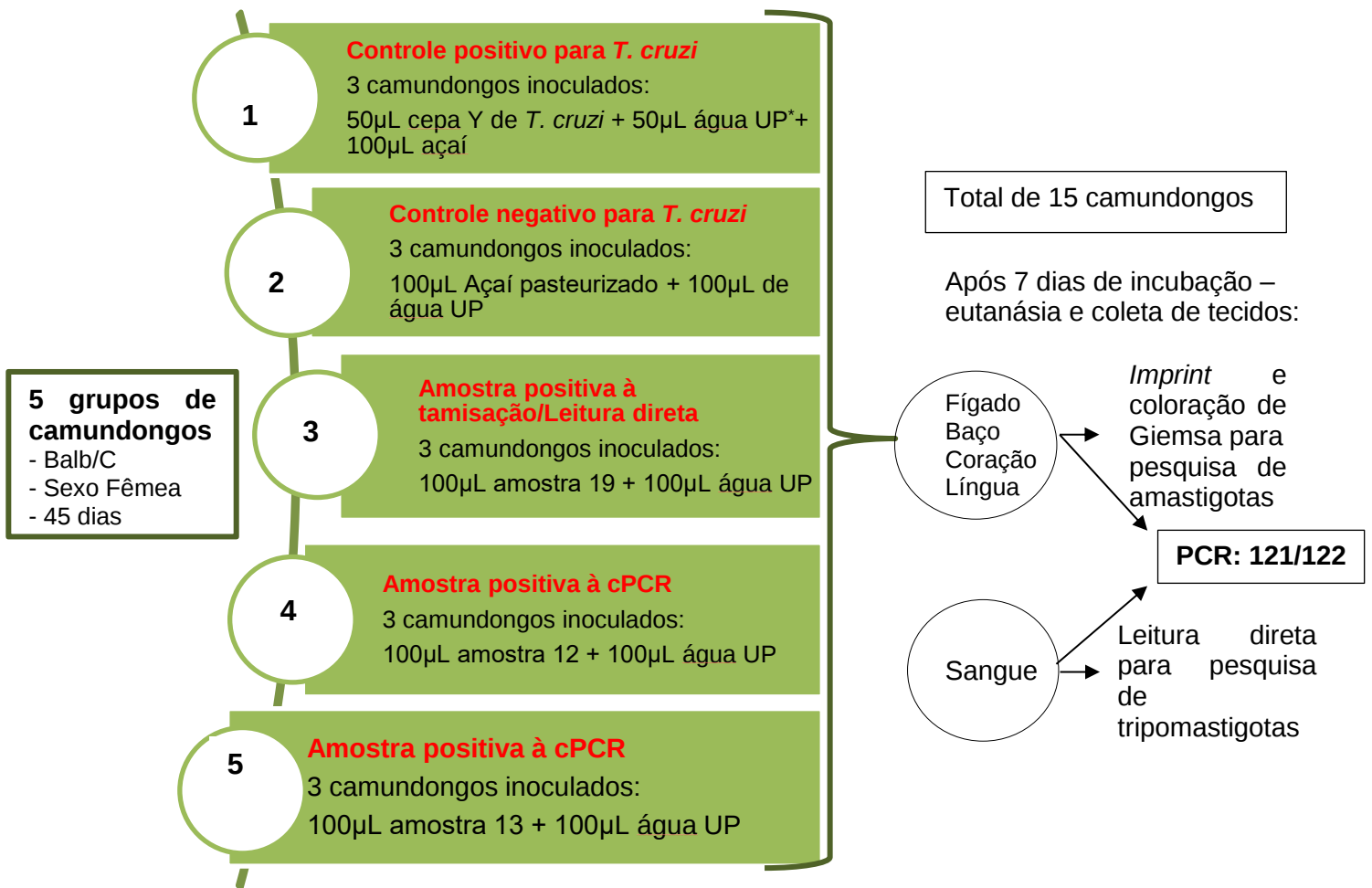
- 240 mL de meio 199
- 14 mL de SORO FETAL BOVINO ESTÉRIL
- 480 microlitros de urina masculina estéril

PARA 10 AMOSTRAS:

- 80 mL meio 199
- 4,7 mL soro fetal bovino estéril
- 160 microlitros de urina masculina estéril

OBS.: A urina deve ser esterilizada sob filtração em seringa 10 mL acoplada a membrana Millipore, acrescido com gentamicina a 200 microgramas/mL = 20 mL gentamicina para 100 mL de urina

8.7 Anexo 7: Fluxograma dos grupos dos camundongos inoculados via gavagem com amostras de açaí



*UP: Ultrapura

8.8 Anexo 8: Protocolo de extração do DNA em sangue - Kit comercial *Illustra Blood GenomicPrep* (GE Healthcare®).

1. Descongelar as amostras de sangue
2. Acrescentar em microtubos livres de DNAses e RNAses:
 - 20µL de proteinase K juntamente
 - 300µL da amostra de sangue
3. Homogeneizar em vórtex durante 10 segundos
4. Adicionar 400µL de tampão de extração (*Lysis buffer-“extraction solution”*) afim de suspender todas as células brancas.
5. Homogeneizar no vórtex por mais 15 segundos
6. Deixar os tubos em temperatura ambiente por um período de 10 minutos
7. Transferir o conteúdo para um tubo coletor junto à uma coluna (fornecida pelo kit)
8. Centrifugar à 11000 RCF por um minute
9. Descartar o sobrenadante
10. Acrescentar 500µL de solução de *Lise* à coluna. Novamente
11. Centrifugar à 11000 RCF por três minutos.
12. Desprezar o tubo coletor e o sobrenadante
13. Colocar a coluna em um microtubo de 1,5mL estéril
14. Adicionar 100µL de solução de eluição (*Elution Buffer*) que estava previamente aquecido à 70°C
15. Incubar por um minute
16. Centrifugar os microtubos à 11000 RCF por um minuto
17. Armazenar o DNA extraída sob refrigeração à -20°C até o momento de uso.

8.1 Anexo: 9: Pesagem de órgãos (valores em gramas) de camundongos infectados experimentalmente com amostras de açaí positivas para *T.cruzi*.

		Coração	Fígado	Baço	Língua
Grupo 1: Controle positivo	Camundongo 1	0.2036	0.5017	0.1636	0.0842
	Camundongo 2	0.0956	0.4114	0.0827	0.0621
	Camundongo 3	0.0440	0.6751	0.1203	0.0343
Grupo 2: controle negativo	Camundongo 1	0.1936	1.3082	0.2314	1.0386
	Camundongo 2	0.2143	0.4888	0.0558	0.570
	Camundongo 3	0.2000	0.4884	0.2888	0.663
Grupo 3: amostras 19	Camundongo 1	0.1831	1.0372	0.1611	0.0697
	Camundongo 2	0.1323	1.1053	0.1867	0.0620
	Camundongo 3	0.1425	1.1066	0.1713	0.0475
Grupo 4: amostra 12	Camundongo 1	0.1698	1.0279	1.2061	0.0786
	Camundongo 2	0.2060	0.9024	0.1836	0.0693
	Camundongo 3	0.2173	1.3086	0.2239	0.0837
Grupo 5: amostra 13	Camundongo 1	0.1879	1.2240	0.2020	0.0930
	Camundongo 2	0.1796	1.1968	0.2026	0.0984
	Camundongo 3	0.1870	0.8863	0.1242	0.01124

8.2 Anexo 10: Quantificação de DNA a partir de órgãos de camundongos infectados experimentalmente com amostras de açaí positivas para *T.cruzi*.

		Grupo 1		
		Camundongo 1	Camundongo 2	Camundongo 3
Sangue	DNA	65,5	35,0	57,0
	260/280*	1,845	1,400	1,869
Coração	DNA	15,6	33,0	30,5
	260/280*	1,737	1,571	1,356
Fígado	DNA	128,0	83,5	71,0
	260/280*	1,753	1,769	1,844
Baço	DNA	54,5	64,0	69,5
	260/280*	1,677	1,707	1,759
Língua	DNA	38,0	32,0	33,5
	260/280*	1,900	1,778	1,763

		Grupo 2		
		Camundongo 1	Camundongo 2	Camundongo 3
Sangue	DNA	107,0	46,5	40,5
	260/280*	1,829	1,824	1,929
Coração	DNA	26,5	26,0	24,0
	260/280*	1,514	1,985	1,882
Fígado	DNA	28,5	126,5	60,5
	260/280*	1,919	1,847	1,833
Baço	DNA	66,5	66	66,5
	260/280*	1,031	1,823	1,705
Língua	DNA	32,0	33,5	36,5
	260/280*	1,922	1,872	1,872

		Grupo 3		
		Camundongo 1	Camundongo 2	Camundongo 3
Sangue	DNA	40,5	21,5	46,0
	260/280*	1,929	2,028	1,394
Coração	DNA	38,5	26,3	26,5
	260/280*	1,791	1,721	1,699
Fígado	DNA	79,0	87,5	51,5
	260/280*	1,816	1,804	1,873
Baço	DNA	103,0	66,0	111,0
	260/280*	1,635	1,737	1,776
Língua	DNA	36,0	52,5	21,0
	260/280*	1,846	1,810	1,972

		Grupo 4		
		Camundongo 1	Camundongo 2	Camundongo 3
Sangue	DNA	35,0	36,0	45,0
	260/280*	1,556	1,895	1,731
Coração	DNA	17,0	69,5	28,5
	260/280*	1,818	1,404	1,932
Fígado	DNA	25,0	67,0	212,0
	260/280*	1,190	1,457	1,317
Baço	DNA	45,5	69,0	90,5
	260/280*	1,750	1,769	1,810
Língua	DNA	35,5	22,5	39,0
	260/280*	1,722	1,055	1,795

		Grupo 5		
		Camundongo 1	Camundongo 2	Camundongo 3
Sangue	DNA	155,0	72,5	46,5
	260/280*	1,728	1,908	1,824
Coração	DNA	18,0	22,0	37,5
	260/280*	1,989	1,725	1,136
Fígado	DNA	15,9	94,0	57,0
	260/280*	1,787	1,774	1,810
Baço	DNA	52,0	37,5	54,7
	260/280*	1,825	1,878	1,817
Língua	DNA	35,0	58,0	52,5
	260/280*	1,795	1,681	1,842

Legenda: *: resultado do cálculo da relação 260/280 registrada pelo quantificador

****Concentração de DNA (mg/mL)**