

***Trypanossoma cruzi* EM POLPAS DE AÇAÍ (*Euterpe spp.*) COMERCIALIZADOS NA REGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM DO PARÁ**

Amanda Gabryelle Nunes Cardoso MELLO

MELLO, Amanda Gabryelle Nunes Cardoso Mello. ***Trypanossoma cruzi* em polpas de açaí (*euterpe spp.*) comercializados na região metropolitana de Belém do Pará.** Projeto de investigação científica, do Curso de Farmácia – Centro Universitário Fibra, Belém, 2021.

Esta pesquisa teve como objetivo verificar a presença do DNA de *T. cruzi* em amostras de polpa de açaí (*Euterpe spp.*) comercializadas em cinco grandes bairros do município de Belém, averiguando se as recomendações de processamento do fruto, após o Decreto nº. 326 de 20/01/2012, estão sendo obedecidas. Considera-se ser de grande importância, tendo em vista que a polpa de açaí, além de ser identidade na região norte bastante relevante, devido ao seu alto potencial como produto funcional e nutricional, sua comercialização tornou-se uma atividade socioeconômica, não só em nível local, mas também abrangendo, nos últimos anos, o mercado externo. Esse fato deixa um alerta para os seus consumidores (IBGE, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS),

a Doença de Chagas (DC) está entre as dezessete doenças tropicais negligenciadas no mundo, atingindo cerca de 10 milhões de indivíduos infectados nas Américas, com 2 milhões de chagásicos no Brasil (BRASIL, 2019). Além disso, está entre as mais importantes infecções parasitárias e, no final do século passado, foi considerada como a mais importante pelo Banco Mundial, por apresentar um impacto socioeconômico significativamente maior que o obtido pelo efeito combinado de todas as outras infecções causadas por parasitos (PEREZ-MOLINA *et al.*, 2009). A DC é uma doença infecciosa e tem como vetor os insetos triatomíneos conhecidos como barbeiros e outros nomes. Além da transmissão vetorial ao homem, pode ser transmitida por via oral, transfusional e outras formas, e apresenta comprometimentos cardíacos e digestivos em quadros graves (FERREIRA *et al.*, 2016). No Brasil, a maioria dos casos diagnosticados é da forma crônica, embora, nos últimos anos, a DC aguda (DCA) tenha ocorrido de forma expressiva, geralmente relacionada ao consumo de alimentos contaminados pelo agente etiológico, como caldo de cana, açaí, palmito de babaçu, jaci (coquinho), bacaba e buriti (VIEIRA, 2015). Esse último

tipo de contaminação tem elevado a incidência de casos nos últimos anos em regiões da Venezuela, Colômbia, Guiana Francesa, Bolívia, Argentina e Equador, além do Brasil (SANTOS *et al.*, 2018). Sabe-se que a região Amazônica é considerada historicamente endêmica para DC, sendo frequente a ocorrência de surtos, em forma de microepidemia familiar, em áreas urbanas e rurais. Entretanto, o desenvolvimento de atividades antrópicas de desmatamentos e ocupações de áreas ambientalmente frágeis reduziram as fontes naturais de alimentação e abrigo dos triatomíneos, que passaram a se alimentar de animais domésticos e, eventualmente, do próprio homem (BRASIL, 2019). Um dos habitats natural do vetor, nesta região, é a palmeira de açaí (*Euterpe spp.*), um importante ecótopo do barbeiro. Esse inseto contamina a superfície do fruto por meio do depósito de excremento parasitado com o *Trypanosoma cruzi* (PASSOS *et al.*, 2012), demonstrando que não existe uma relação direta entre a presença do protozoário e o açaí (PEREIRA *et al.*, 2009). Essa relação faz do açaí o alimento com o maior número de casos de DC ocorridos na região Norte nos últimos anos, seja pela contaminação dos frutos ou da própria polpa por meio de dejetos de animais reservatórios seja

por insetos vetores infectados das áreas endêmicas (BEZERRA *et al.*, 2017). A polpa do açaí é comercializada no mundo, na forma processada, pasteurizada e congelada. É importante ter um forte controle higiênico-sanitário durante a coleta e o processamento do fruto para extração da polpa, visto que há uma facilidade para sua contaminação pelo parasita da DC (BRASIL, 2019). O mercado consumidor regional amazônico, bastante tradicional e peculiar, tem preferência pelo produto processado sem tratamento térmico para consumo imediato, de forma semiartesanal, em pequenas processadoras denominadas “amassadeiras” ou “batedeiras” (CARVALHO, 2010). No elo de processamento do fruto, encontram-se agentes que desempenham a função de suprir o consumo local, conhecidos culturalmente como batedores de açaí e a indústria de processamento, que produz polpa em larga escala para suprir o mercado nacional e internacional. Os batedores de açaí normalmente compram o fruto nas feiras de açaí e o processam, em pequena escala, com objetivo de vender a polpa ao consumidor final. Alguns batedores possuem firmas registradas e outros desempenham suas atividades informalmente. Muitos seguem as

recomendações de higiene das secretarias de saúde dos municípios e outros, não (SEBRAE, 2013). Para tentar evitar o processamento inadequado do fruto, tomando cuidados específicos adotados pelos estabelecimentos, foi criado o Decreto n°. 326 de 20/01/2012, o qual determina que o espaço destinado à manipulação do açaí deve ser isolado do meio externo com a finalidade de evitar contaminações, dificultando principalmente a entrada do “barbeiro”, que, apesar de ser fotossensível, é atraído por iluminação artificial do estabelecimento. O local, em geral, deve ser totalmente impermeável e sem fissuras, desde o piso ao teto para evitar sujidades e abrigos de insetos, devido ao ambiente de alvenaria favorecer estabilidade climática, local adequado para o abrigo de triatomíneos (JUBERG, 2014). Na área de produção, o açaí deve ser acondicionado em caixas plásticas vasadas e então peneirado e inspecionado visualmente para descartar frutos inapropriados, lixo e insetos. Possivelmente, o triatomíneo pode passar despercebido durante a examinação, sendo processado na despoldadeira junto aos frutos, contaminando o produto e o maquinário. Para evitar isso, após a seleção, é realizada a higienização com solução de hipoclorito de sódio e água potável, seguido do

branqueamento, método que consiste em permanecer o fruto 10 segundos em água na temperatura de 80°C e, imediatamente, resfriar para inativar qualquer protozoário do *T. cruzi*, se este estiver aderido à superfície do açaí (PARÁ, 2012; FERREIRA *et al.* 2016). Os estabelecimentos que se enquadram nos requisitos exigidos pelo decreto acima citado recebem o selo de “Açaí Bom”. O selo, além de agregar valor à oferta local do açaí, também incentiva a regularização fundiária, garante o manejo florestal sustentável e promove boas práticas trabalhistas, como o uso de equipamentos de proteção individual. A partir disso, a polpa é obtida com total segurança para consumo (PARÁ, 2012). Atualmente, a transmissão oral de *Trypanosoma cruzi* é a principal via de infecção na Amazônia brasileira. Outros países da América do Sul também relataram surtos de DC aguda associados ao consumo de alimentos/sucos contaminados, como é o caso do açaí. As taxas de mortalidade nesses pacientes infectados por via oral são mais altas (de 8 a 35%) quando comparadas à transmissão vetorial clássica (<5 a 10%) (ANTUNES *et al.*, 2019). Todos os anos há aumento nas notificações de casos suspeitos de DC, principalmente por transmissão oral tendo como veículo a polpa do açaí,

quando esta não passa pelo devido processo de manipulação no momento da sua produção. Frequentemente pequenos surtos sazonais vêm sendo constatados, principalmente, na região norte do Brasil (LIMA, 2015). Trata-se de um estudo transversal e descritivo, entre os meses de agosto de 2021 a junho de 2022. Pretendeu-se observar os aspectos visuais de higiene tanto os estabelecimentos que detêm o selo de “Açaí Bom” quanto os que não o possuem. A identificação destes locais foi realizada por números (1, 2, 3, 4, 5...), preservando o sigilo da identidade do estabelecimento. As amostras coletadas foram analisadas no laboratório de parasitologia do Centro Universitário Fibra. Os locais de coleta foram selecionados aleatoriamente, tendo como critério possuírem ou não, o selo de “Açaí Bom” e estarem localizados no município de Belém. A coleta e as análises foram realizadas em triplicata, em um total de 10 amostras. Para verificar e identificar o DNA do *T. cruzi*, foi utilizado o Método de Faust e realizadas análises por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguindo o protocolo de Vieira *et al.* (2015). Foram dissolvidos 330g de Sulfato de Zinco (ZnSO₄) em 1.000 mL de água deionizada. Após o preparo a solução, foi mantida à temperatura ambiente. O

preparo da solução foi realizado com 8g de Brometo de cetiltrimetilamônio e 4g de NaCl dissolvidos em 80 mL de água deionizada pré-aquecida a 65°C. Após a dissolução completa dos reagentes, o volume da solução foi completado para 100 mL com água deionizada pré-aquecida a 65°C. A solução se manteve armazenada à temperatura ambiente. Para o preparo de tampão PBS 1X, 82g de NaCl, 10,5g de NaHPO₄ e 3,55g de NaH₂PO₄ + H₂O (q.s.p) 1 L, diluídos 100 mL de PBS para cada 900 mL de água. Para o preparo de gel de eletroforese, 2g de agarose foi fundida em 200 mL de tampão SB 1X, em forno micro-ondas a 65 °C, e colocada em cuba de eletroforese horizontal. Para o preparo do tampão, foram dissolvidos 16g de Hidróxido de sódio (NaOH) e 90g de Ácido bórico (H₂BO₃) em 2.000 mL de água deionizada. Para a realização de gel de agarose e eletroforese, o tampão SB foi utilizado na concentração de 1X. As soluções tanto de estoque quanto a de uso foram armazenadas à temperatura ambiente. Foram utilizadas a solução estoque: 10 mg/mL em H₂O MilliQ e a solução estoque: TBE 10X; Glicerol 50%; Azul de Bromofenol 0,01%; Xileno Cianol 0,01%. Para o isolamento do *T. cruzi*, foi utilizado o método descrito por Faust *et al.* (1938), com algumas

adaptações. Em um tubo de 15 mL, foram colocados 10 mL de açaí, em seguida filtrados em gaze, em um tubo de fundo cônico de 50 mL, adicionado 20 mL de PBS 1X para lavagem. Após essa primeira lavagem, o material filtrado foi centrifugado a 2.545 g por 20 min, e, posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido. O procedimento de lavagem foi repetido por 4 vezes utilizando-se 20mL de PBS 1X. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 20 mL da solução de sulfato de zinco 33% e centrifugado a 1.200 g por 5 min. Depois de centrifugado, o tubo foi deixado em repouso por 10 min. Logo após esse intervalo, formaram-se duas fases, foi coletado 1 mL do sobrenadante. Posteriormente, a alíquota de 1 mL coletada da fase superior do gradiente em sulfato de zinco foi diluída (1:30) em PBS 1X e centrifugada a 2.545 g por 20 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de PBS 1X e transferido para um tubo de 1,5 mL, no qual se iniciou o protocolo de isolamento de DNA genômico. Foi utilizado, na extração de DNA genômico, o método que se baseia na utilização de Iorofórmio/Álcool isoamílico. Um mililitro de amostra purificada pelo método de flutuação em sulfato de

zinco foi centrifugado a 4.000 g por 10 min. O precipitado foi ressuspensionado em 400µL de PBS 1X, em seguida adicionados 100µL de NaCl 5M e 100µL de CTAB/NaCl (pré-aquecido a 65°C). Essa mistura foi homogeneizada em vórtex por 20 segundos e, logo em seguida, incubada a 65°C por 30 min. Após a incubação, foram adicionados 750 µL de Clorofórmio/álcool Isoamílico (24:1) e homogeneizado por 10 segundos em vórtex. O tubo foi novamente centrifugado a 14.000 g por 10 min e, posteriormente, a fase aquosa superior transferida para outro tubo, na qual foram adicionados 0,6 volumes (60%) de Isopropanol (-20°C) e incubado a -20°C por 30 min. Após esse período de incubação, o tubo foi centrifugado a 12.000 g por 30 min a 4°C. Posteriormente, descarta-se o sobrenadante e o pellet foi lavado duas vezes, cuidadosamente sem ressuspensioná-lo, com etanol 70% e centrifugações a 12.000g por 3 min. Após lavagem do pellet de DNA, o tubo foi deixado para secar à temperatura ambiente e o DNA tornou-se ressuspensionado em 200 µL de água ultrapura (H2O Milli Q) e estocado a 4°C. Para as reações de PCR, foram utilizados 10 µL das amostras de DNA. Para as análises de PCRs qualitativas, foram utilizados os iniciadores TCZ1 (CGA GCT CTT GCC CAC

ACG GGT GCT), TCZ2 (CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG) (MOSER *et al.*, 1989), 528 e 529 que delimitam um fragmento de 188 pb. O sistema de reação de PCR foi realizado em um volume final de 30 μ L constituído de Tampão 1X; 0,4 μ M de cada primer, 1,9 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1 unidade de Platinum® Taq DNA Polimerase. As amostras foram amplificadas em um termociclador e os parâmetros de amplificação dos genes foram anotados os valores da Pré-desnaturação, Desnaturação, Anelamento e Extensão, repetindo as etapas de 2 a 4 por 40 vezes, até a obtenção da Extensão final. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% tratados com brometo de etídeo 0,3 μ g/ml e visualizados em sistema de foto documentação BioRad Universal Hood II (BioRad). Os dados obtidos por meio das amostras coletadas passaram por um processo de agrupamento e foram tabelados em ordem alfabética no programa Excel 2010 e apresentados como média e porcentagem. Nas amostras sem o selo, o DNA foi extraído conforme o método CTAB, o que garante a confiabilidade do método e a sua reprodutibilidade, conforme o protocolo de Vieira *et al.* (2015). Para verificar a presença do DNA do parasita, os iniciadores TCZ (para

o *T. cruzi*) e PR (para o açai), foram utilizados. Foram observadas, para as amostras “sem selo”, 100% de positividade para o iniciador TCZ e também para o iniciador PR, o que confirma a presença de DNA do parasita nas amostras. Contudo, isso não implica necessariamente a viabilidade da doença, uma que vez a presença de DNA confirma a contaminação, mas a viabilidade seria a capacidade de infectividade do parasita. Do total de amostras “com selo”, 66,6% foram positivas com o iniciador TCZ, comprovando a presença do DNA parasitário do *T. cruzi*. Para confirmar o processo de extração do DNA, o iniciador PR foi utilizado, o qual é executado para amplificar o DNA do açai. Em 66,6% das amostras, foi confirmada a eficácia da extração, mostrando a amplificação. Observou-se a presença de DNA do *T. cruzi* a partir da extração pela técnica de flutuação em Zinco/PCR, em que o método foi sensível para detectar o DNA, demonstrando eficácia e reprodutibilidade, sendo uma ferramenta de fácil aplicabilidade e aplicável para a detecção dos parasitas, podendo ser usada em casos de surtos de transmissão de DC por via oral. O método ainda tem limitações, devido à quantidade de DNA presente nas amostras. Para evitar isso, foi utilizado outro iniciador com

o objetivo de confirmar a eficácia da extração. Faz-se necessário mais estudos para aprimorar a técnica de detecção de DNA do *T. cruzi*, especialmente para o diagnóstico laboratorial, já que a técnica ainda é utilizada para fins acadêmicos. Mais pesquisas sobre a DC são necessárias, por se tratar de uma doença negligenciada e de baixo retorno lucrativo para as indústrias farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, D.; MARINS-DOS-SANTOS, A.; RAMOS, MT.; MASCARENHAS, BAS.; MOREIRA, CJC.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, DA.; SAVINO, W.; MONTEIRO, RQ.; de MEIS, J. Oral Route Driven Acute Trypanosoma cruzi Infection Unravels an IL-6 Dependent Hemostatic Derangement. *Front Immunol.* v. 14, n. 10, p.1073, 2019.

BEZERRA, V. S.; DAMASCENO, L. F.; FREITAS-SILVA, O.; CABRAL, L. M. C. Tratamento térmico do Açaí. Comunicado Técnico da EMBRAPA. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. *Boletim Epidemiológico*, v. 50, n. 02, 2019.

CARVALHO, A. C. A. de. Economia dos produtos florestais não-madeireiros no Estado do Amapá: sustentabilidade e desenvolvimento endógeno. 2010. 174 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Sustentável do Trópico Úmido) – Universidade Federal do Pará.

FAUST, E.C. et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. American Journal of Tropical Medicine, v.18, p.169-183, 1938.

FERREIRA, E. A. P; BEZERRA, E. S.; DAMASCENO, L. S.; FREITAS-SILVA, O. O Branqueamento do açaí em bateadeiras artesanais para controle do Trypanossoma cruzi, agente etiológico da Doença de Chagas. II Jornada Científica da EMBRAPA.

JUBERG, J.; RODRIGUES, J. M. S.; MOREIRA, F. F. F.; DALE, C.; CORDEIRO, I. R. S.; LAMAS Jr, VALDIR, D.; GALVÃO, C.; ROCHA, S. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da Doença de Chagas). Disponível em:
<http://www.fiocruz.br/ioc/media/Atlas_triatominio_juberg.pdf Acesso em: 14 de março de 2019.

LIMA, R.S. NA SAFRA ENA ENTRESAFRA DO AÇAÍ: USOS DO TERRITÓRIO E MODO DE VIDA DA POPULAÇÃO RIBEIRINHA DO BAIXO MERUÚ (Igarapé-Miri/PA). Disponível em:

<http://www.ppgeo.propesp.ufpa.br/ARQUIVOS/dissertações/2013/DISSERTAÇÃO%20ROSEMILDO%20SANTOS.pdf> Acesso em: 14 de mar 2019.

PARÁ. Decreto nº 326. Estabelece requisitos higiênicosanitários 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 do Pará. 20 jan. 2012

PASSOS, L.A.C.; GUARALDO, A. M. A.; BARBOSA, R. L.; DIAS, V. D.; PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; FRANCO, R. M. B.; ALVES, D. P. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo in vitro e in vivo. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v.21 n.2, p. 223-232, 2012.

PEREIRA, K.S; SCHMIDT, F.L.; GUARALDO, A.M.A.; FRANCO, R.M.B.; DIAS, V.L.; PASSOS, L.A.C. Chagas Disease as a Foodborne Illness. *Journal of Food Protection*, v. 72, p. 441-446, 2009.

PÉREZ-MOLINA, J.A.; PÉREZ-AYALA, A.; MORENO, S.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.C.; ZAMORA, J.; LÓPEZ-VELEZ, R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.*, v. 64, n. 6, p. 1139-1147, 2009.

SANTOS, V. R. C.; MEIS, J.; SAVINO, W.; ANDRADE, J. A. A.; VIEIRA, J. R. dos S.; COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V. Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing? Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.113, n. 5, 2018.

SEBRAE. Manual de segurança e qualidade para a cadeia do açaí. Brasília, DF: PAS-Açaí. Programa Alimentos Seguros, 2013. 86 p. (Série qualidade e segurança dos alimentos).

SILVA, F. S.; Silva, A. F. M.; Sousa, C. L.; Souza, J. N. Avaliação VALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DOS ESTABELECIMENTOS COM O SELO “AÇAÍ BOM” DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Brazilian Journal of Food Research (REBRAPA), v. 8 n. 4, p. 157-169, 2017.

VIEIRA, A. R. A. Desenvolvimento e Padronização de métodos para detecção de Trypanosoma cruzi em polpa de açaí (Euterpe oleracea). Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília Faculdade de Ceilândia, Brasília, 2015.