



RODRIGO LABELLO BARBOSA

**TRATAMENTOS DE AQUECIMENTO, INATIVAÇÃO TÉRMICA E VIRULÊNCIA
DO *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) DE VETORES E RESERVATÓRIO EM
POLPA *in natura* DE AÇAÍ (*Euterpe oleraceae* Martius) NA DOENÇA DE
CHAGAS AGUDA DE TRANSMISSÃO ALIMENTAR NO ESTADO DO PARÁ,
BRASIL**

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



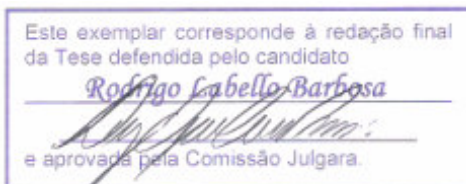
RODRIGO LABELLO BARBOSA

**TRATAMENTOS DE AQUECIMENTO, INATIVAÇÃO TÉRMICA E VIRULÊNCIA
DO *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) DE VETORES E RESERVATÓRIO EM
POLPA *in natura* DE AÇAÍ (*Euterpe oleraceae* Martius) NA DOENÇA DE
CHAGAS AGUDA DE TRANSMISSÃO ALIMENTAR NO ESTADO DO PARÁ,
BRASIL**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutor em
Parasitologia.

Orientador: PROF. DR. LUIZ AUGUSTO CORRÊA PASSOS

Co-orientadora: PROFA. DRA. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO



CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L112t Labello Barbosa, Rodrigo, 1983-
Tratamentos de aquecimento, inativação térmica e virulência do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) de vetores e reservatório em polpa *in natura* de açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) na doença de Chagas aguda de transmissão alimentar no Estado do Pará, Brasil / Rodrigo Labello Barbosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Luiz Augusto Corrêa Passos.

Coorientador: Ana Maria Aparecida Guaraldo.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Chagas, Doença de. 2. Doenças transmitidas por alimentos. 3. Açaí. 4. Calor. 5. Biologia experimental. I. Passos, Luiz Augusto Corrêa. II. Guaraldo, Ana Maria Aparecida, 1951-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Heat treatment, thermal inactivation and virulence of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) from vectors and reservoir in *in natura* açai pulp (*Euterpe oleraceae* Martius) about foodborne acute Chagas' disease at Pará State, Brazil

Palavras-chave em inglês:

Chagas' disease

Foodborne diseases

Açaí

Heat

Biology, Experimental

Área de concentração: Parasitologia

Titulação: Doutor em Parasitologia

Banca examinadora:

Luiz Augusto Corrêa Passos [Orientador]

Eros Antônio de Almeida

Nanci do Nascimento

Patrick Jack Spencer

Soraya Oliveira dos Santos

Data de defesa: 30-10-2014

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia

LOCAL E DATA DA DEFESA: Campinas, 30 de Outubro de 2014.

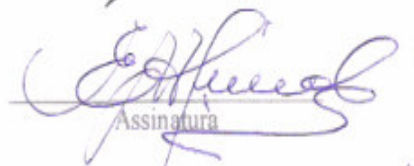
BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos
(Orientador)



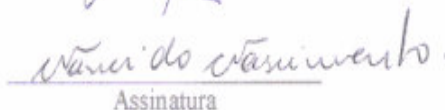
Assinatura

Prof. Dr. Eros Antônio de Almeida



Assinatura

Profa. Dra. Nanci do Nascimento



Assinatura

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer



Assinatura

Profa. Dra. Soraya Oliveira dos Santos



Assinatura

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol

Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho

ABSTRACT

HEAT TREATMENT, THERMAL INACTIVATION AND VIRULENCE OF *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) FROM VECTORS AND RESERVOIR IN *in natura* AÇAÍ PULP (*Euterpe oleraceae* Martius) ABOUT FOODBORNE ACUTE CHAGAS' DISEASE AT PARÁ STATE, BRAZIL

In the Brazilian Amazon, outbreaks of acute Chagas' disease (ACD) in humans are reported by clinical and epidemiological characterization after association with the ingestion of *in natura* fruit's açai of pulp contaminated with *T. cruzi*. Due the economic and cultural relevance and considering that the cooling and freezing are not efficient to prevent the ACD foodborne, the aims of this study were determine a minimum binomial "temperature x time" and necessary to inactivation or death of *T. cruzi* in fruit's açai of pulp and evaluate the possibility of experimental transmission of this parasitosis, from vectors and reservoir at different locations at Pará State, in an accidental contamination in food. In the first stage, 10^5 trypomastigotes of *T. cruzi* Y strain were mixed with *in natura* fruit's açai of pulp and heat-treated between 37°C and 49°C in a high-precision water bath, by up to an hour, under constant homogenization. In the second stage, 10^5 trypomastigotes of *T. cruzi* (Tcl) from different sources and locations at Pará, comparing with *T. cruzi* Y strain (TclI), were mixed with *in natura* fruit's açai of pulp, at room temperature. In both stages, when necessary, contaminated mixtures were subjected to forced sieving process. The inoculum (negative control, positive control or test group), up to 200 µL, was administered intraperitoneal, gavage or oral in inbred immunodeficient hosts CB-17-Prkdc^{scid}/Pas Unib or B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib, under previous antibiotic therapy (1,75 mg/day). Parasitemia was scored as recommended by Brener and mortality registered. *T. cruzi* retained its virulence in fruit's açai of pulp at 43±0,1°C for 20 minutes, caused ACD and death in mice up to 24 days after experimental infections, intraperitoneally. *T. cruzi* from *Rhodnius pictipes*, Val-de-Cans' forest, Belém, presented ACD and death, respectively, on days 32,0±3,0 and 40,0±3,0. *T. cruzi* from *R. pictipes*, Ajuai River, Abaetetuba, presented ACD and death, respectively, on days 35,0±1,0 and 49,0±1,0. *T. cruzi* from *Philander opossum*, Combu's Island, Belém, presented ACD and

death, respectively, on days $45,0 \pm 2,0$ and $51,0 \pm 1,0$, orally. There was not significant difference for the ACD from vectors of different locations, however, there was significant difference for the ACD between *T. cruzi* from vectors and reservoir, as well as for the *T. cruzi* Y strain (Duncan test, $\alpha 0,01$). Therefore, cooking *in natura* fruit's açai of pulp above 44°C can prevent ACD foodborne. *T. cruzi* from different sources and locations at Pará, after contact with *in natura* fruit's açai of pulp, at room temperature, can retain its virulence *in vivo*, cause ACD and death in up to 52 days after experimental infections. A quality basic education will facilitate good hygiene practices occur throughout the productive chain of açai and will prevent ACD foodborne in the northern region of Brazil in next decades.

Keywords: Chagas' disease; foodborne diseases; açai; heat; experimental Biology

RESUMO

TRATAMENTOS DE AQUECIMENTO, INATIVAÇÃO TÉRMICA E VIRULÊNCIA DO *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) DE VETORES E RESERVATÓRIO EM POLPA *in natura* DE AÇAÍ (*Euterpe oleraceae* Martius) NA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA DE TRANSMISSÃO ALIMENTAR NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL

Na amazônia brasileira, microepidemias de doença de Chagas aguda (DCA) humana são notificadas por meio de caracterização clínica e epidemiológica após associação ao consumo de polpa *in natura* de açaí contaminada com *Trypanosoma cruzi*. Dada a sua relevância econômica, cultural e considerando que a refrigeração e o congelamento não são métodos eficientes à prevenção da DCA de transmissão alimentar, os objetivos desse estudo foram determinar um binômio “temperatura x tempo” mínimo necessário à inativação ou morte do *T. cruzi* em polpa de açaí e avaliar a possibilidade experimental da transmissão dessa parasitose, proveniente de vetores e reservatório de diferentes localizações do Estado do Pará, por contaminação acidental no alimento. Na primeira etapa, 10^5 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram misturadas à polpa *in natura* de açaí e submetidas a tratamentos térmicos entre 37°C e 49°C em um banho ultratermostático de alta precisão, por até uma hora, sob homogeneização constante. Na segunda etapa, 10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* (TcI) de diferentes fontes e localizações do Pará, comparando-se à cepa Y de *T. cruzi* (TcII), foram misturadas, à temperatura ambiente, à polpa *in natura* de açaí. Em ambas etapas, quando necessário, as misturas contaminadas foram submetidas à tamisação forçada. O inóculo (controle negativo, controle positivo ou grupo teste), de até 200µL, foi administrado via intraperitoneal, gavagem ou oral em hospedeiros isogênicos imunodeficientes C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib ou B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib, sob antibioticoterapia prévia (1,75mg/dia). A parasitemia foi realizada de acordo com o método de Brener e a mortalidade foi registrada. *T. cruzi* preservou sua virulência em polpa de açaí à 43±0,1°C durante 20 minutos, causou DCA e morte em até 24 dias após as infecções experimentais, via intraperitoneal. *T. cruzi* de *R. pictipes* da Mata do Val-De-Cans, de Belém, apresentou DCA, com início de parasitemia e morte,

respectivamente, nos dias $32,0 \pm 3,0$ e $40,0 \pm 3,0$. *T. cruzi* de *R. pictipes* do Rio Ajuáí, de Abaetetuba, apresentou DCA, com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $35,0 \pm 1,0$ e $49,0 \pm 1,0$. *T. cruzi* de *P. opossum* da Ilha do Combu, de Belém, apresentou DCA, com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $45,0 \pm 2,0$ e $51,0 \pm 1,0$, via oral. Não houve diferença significativa para a DCA de vetores de diferentes localizações, contudo, houve diferença significativa para a DCA entre *T. cruzi* de vetores e reservatório, bem como em relação à cepa Y de *T. cruzi* (teste de *Duncan*, 99% de confiança). Portanto, a cocção da polpa *in natura* de açaí acima de 44°C poderá prevenir a DCA de transmissão alimentar. *T. cruzi* obtidos de diferentes fontes e localizações do Pará, após o contato com a polpa *in natura* de açaí, à temperatura ambiente, foram capazes de preservar sua virulência *in vivo*, causar DCA e morte em até 52 dias após as infecções experimentais. Uma educação básica de qualidade facilitará que boas práticas de higiene ocorram durante toda a cadeia produtiva do açaí e evitará a ocorrência de DCA de transmissão alimentar na região Norte do país nas próximas décadas.

Palavras-chave: doença de Chagas; doenças transmitidas por alimentos; açaí; calor; Biologia experimental

SUMÁRIO

| | pág. |
|--|---------|
| Dedicatória ----- | xvii |
| Agradecimentos ----- | xix |
| Lista de Ilustrações ----- | xxv |
| Lista de Tabelas ----- | xxvii |
| Lista de Abreviaturas e Siglas ----- | xxxv |
| Lista de Símbolos ----- | xxxix |
| Epígrafe ----- | xli |
| INTRODUÇÃO GERAL ----- | 1 |
| Referências Bibliográficas ----- | 9 |
| Epígrafe ----- | 19 |
| CAPÍTULO I: Tratamentos de aquecimento, inativação térmica e virulência do <i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas, 1909) em polpa <i>in natura</i> de açaí (<i>Euterpe oleraceae</i> Martius) na doença de Chagas aguda ----- | 21 |
| Abstract ----- | 23 |
| Resumo ----- | 25 |
| 1. Revisão da Literatura ----- | 27 |
| 1.1. Principais processos de conservação da polpa de açaí ----- | 29 |
| 1.1.1. Pasteurização ----- | 29 |
| 1.1.2. Branqueamento ----- | 30 |
| 1.1.3. Conservação a frio: Refrigeração e congelamento ----- | 32 |
| 1.1.4. Desidratação ----- | 33 |
| 1.1.5. Tecnologia de obstáculos ----- | 35 |
| 1.1.6. Ácido bórico ----- | 35 |
| 1.1.7. Radiação gama ----- | 36 |
| 1.1.8. Inibição da atividade enzimática ----- | 36 |
| 2. Objetivos ----- | 39 |
| 2.1. Objetivo Geral ----- | 41 |

| | |
|---|-----|
| 2.2. Objetivos Específicos ----- | 41 |
| 3. Material e Método ----- | 43 |
| 3.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> ----- | 45 |
| 3.2. O modelo animal ----- | 45 |
| 3.3. A polpa de açaí ----- | 45 |
| 3.4. O inóculo ----- | 45 |
| 3.4.1. Controle negativo ----- | 46 |
| 3.4.2. Controle positivo ----- | 46 |
| 3.4.3. Grupos teste ----- | 46 |
| 3.5. Procedimentos experimentais ----- | 46 |
| 3.5.1. Antibioticoterapia ----- | 46 |
| 3.5.2. Sistema <i>in vitro</i> para contaminação experimental da polpa de açaí e inativação térmica do <i>T. cruzi</i> (metodologia A) ----- | 47 |
| 3.5.3. Sistema <i>in vitro</i> para contaminação experimental da polpa de açaí e inativação térmica do <i>T. cruzi</i> (metodologia B) ----- | 49 |
| 3.5.4. Separação do <i>Trypanosoma cruzi</i> da polpa <i>in natura</i> de açaí ----- | 50 |
| 3.5.5. Manutenção dos animais ----- | 51 |
| 3.5.6. Parasitemia e mortalidade ----- | 51 |
| 3.6. Análise estatística ----- | 52 |
| 4. Resultados ----- | 53 |
| 4.1. Análises da virulência do <i>T. cruzi</i> em solução de NaCl 0,15M e em polpa <i>in natura</i> de açaí de acordo com o método A ----- | 55 |
| 4.2. Análises da virulência do <i>T. cruzi</i> em solução de NaCl 0,15M e em polpa <i>in natura</i> de açaí de acordo com o método B ----- | 66 |
| 4.3. Comparação da virulência do <i>T. cruzi</i> em solução de NaCl 0,15M e em polpa <i>in natura</i> de açaí entre ambas metodologias ----- | 69 |
| 5. Discussão ----- | 71 |
| 6. Conclusões ----- | 85 |
| 7. Referências Bibliográficas ----- | 89 |
| 8. Apêndice ----- | 103 |
| 8.1. Dados estatísticos ----- | 105 |
| 9. Anexo ----- | 119 |

| | |
|---|------------|
| 9.1. Certificação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa/Unicamp) ----- | 121 |
| Epígrafe ----- | 123 |
| CAPÍTULO II: Virulência do <i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas, 1909) de vetores e reservatório em polpa <i>in natura</i> de açaí (<i>Euterpe oleraceae</i> Martius) na doença de Chagas aguda de transmissão alimentar no Estado do Pará, Brasil ----- | 125 |
| Abstract ----- | 127 |
| Resumo ----- | 129 |
| 1. Revisão da Literatura ----- | 131 |
| 1.1. Classificação atual do <i>Trypanosoma cruzi</i> ----- | 133 |
| 1.2. O panorama da doença de Chagas na Amazônia brasileira ----- | 133 |
| 1.3. Os vetores da doença de Chagas na Amazônia brasileira ----- | 140 |
| 1.3.1. <i>Rhodnius pictipes</i> ----- | 143 |
| 1.4. Os reservatórios da doença de Chagas na Amazônia brasileira ----- | 144 |
| 1.4.1. <i>Philander opossum</i> ----- | 146 |
| 1.5. Municípios de estudo ----- | 147 |
| 1.5.1. A capital Belém ----- | 147 |
| 1.5.1.1. Val-De-Cans ----- | 151 |
| 1.5.1.2. A Ilha do Combu ----- | 153 |
| 1.5.2. O município de Abaetetuba ----- | 155 |
| 1.5.2.1. Ajuai ----- | 158 |
| 2. Objetivos ----- | 161 |
| 2.1. Objetivo Geral ----- | 163 |
| 2.2. Objetivos Específicos ----- | 163 |
| 3. Material e Método ----- | 165 |
| 3.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> ----- | 167 |
| 3.2. O modelo animal ----- | 169 |
| 3.3. A polpa de açaí ----- | 169 |
| 3.4. O inóculo ----- | 169 |
| 3.4.1. Controle negativo ----- | 169 |
| 3.4.2. Controle positivo ----- | 170 |

| | |
|---|-----|
| 3.4.3. Grupos teste ----- | 170 |
| 3.5. Procedimentos experimentais ----- | 170 |
| 3.5.1. Antibioticoterapia ----- | 170 |
| 3.5.2. Separação do <i>Trypanosoma cruzi</i> da polpa <i>in natura</i> de açai ----- | 171 |
| 3.5.3. Manutenção dos animais ----- | 171 |
| 3.5.4. Parasitemia e mortalidade ----- | 171 |
| 3.6. Análise estatística ----- | 172 |
| 4. Resultados ----- | 173 |
| 4.1. Viabilidade do uso do modelo animal B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib para o estudo da doença de Chagas aguda e curva-padrão da infectividade da cepa Y de <i>T. cruzi</i> em hospedeiro imunodeficiente- --- | 175 |
| 4.2. Análise <i>in vitro</i> de <i>T. cruzi</i> isolados de vetores e reservatório provenientes de diversas localizações do Estado do Pará, Brasil --- | 176 |
| 4.3. Análise <i>in vivo</i> de <i>T. cruzi</i> isolados de vetores e reservatório provenientes de diversas localizações do Estado do Pará, Brasil --- | 177 |
| 4.4. Amplificação clonal <i>in vivo</i> de <i>T. cruzi</i> isolados de vetores e reservatório provenientes de diversas localizações do Estado do Pará, Brasil ----- | 181 |
| 4.5. Curvas-padrão da infectividade de <i>T. cruzi</i> isolados de vetores e reservatório de diversas localizações do Estado do Pará, Brasil -- | 184 |
| 4.6. Virulência da cepa Y de <i>T. cruzi</i> em polpa <i>in natura</i> de açai na doença de Chagas aguda em B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib ----- | 187 |
| 4.7. Virulência de <i>T. cruzi</i> isolados de vetores e reservatório de diversas localizações do Estado do Pará, Brasil, em polpa <i>in natura</i> de açai na doença de Chagas aguda ----- | 188 |
| 5. Discussão ----- | 191 |
| 6. Conclusões ----- | 205 |
| 7. Referências Bibliográficas ----- | 209 |
| 8. Apêndice ----- | 227 |
| 8.1. Gráficos comparativos ----- | 229 |
| 8.2. Dados estatísticos ----- | 232 |
| 9. Anexos ----- | 261 |

| | |
|---|-----|
| 9.1. Certificação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa/Unicamp) ----- | 263 |
| 9.2. Certificação da obtenção de <i>Trypanosoma cruzi</i> da Coleção de <i>Trypanosoma</i> de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores da Fundação Oswaldo Cruz (ColTryp - Fiocruz) ----- | 265 |
| CONCLUSÃO GERAL ----- | 267 |

**Aos profissionais que se dedicam às doenças negligenciadas em campo,
especialmente à doença de Chagas em áreas longínquas,
meu sincero agradecimento e incentivo a novos estudos**

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Ministério da Saúde (MS), instituições responsáveis pelo suporte financeiro desses estudos.

Ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia e ao Departamento de Biologia Animal, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas (IB/Unicamp), pela minha formação acadêmica.

À Divisão de Pesquisa e ao Laboratório de Controle Sanitário (LCS) do Centro Multidisciplinar para a Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório, da Universidade Estadual de Campinas (Cemib/Unicamp), cujos serviços são essenciais à realização de estudos experimentais dentro da Universidade.

À Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará (SESPA), pela viabilização das atividades de campo com relação à doença de Chagas.

À Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores da Fundação Oswaldo Cruz (ColTryp/Fiocruz), pelo isolamento, identificação e caracterização genética de tripanosomatídeos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos, pelo direcionamento da pesquisa, pela compreensão, pela amizade, pela confiança pessoal e profissional depositada em mim durante a caminhada desde o ingresso no curso de Mestrado e para que possamos dividir mais essa conquista, que é nossa!

À co-orientadora Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo, a minha mais sincera gratidão pelos ensinamentos, oportunidades e momentos compartilhados, mas particularmente por incentivar-me a voar pelo Brasil, divulgar o nosso trabalho e mostrar-me o quanto essa experiência poderia contribuir para o meu crescimento pessoal e intelectual.

À Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, atual coordenadora do Programa de Pós Graduação em Parasitologia, pelo meu reconhecimento profissional, pelo sólido conhecimento proporcionado durante a supervisão do meu estágio de docência, pelas críticas e sugestões durante o Exame de Qualificação de Doutorado e pelas demais oportunidades durante a minha formação acadêmica.

Ao Dr. Rovilson Gilioli, à Profa. Dra. Delma Pegolo Alves, à MSc. Daniele Masselli Rodrigues Demolin e à equipe do Laboratório de Controle Sanitário do Cemib/Unicamp, pela infra-estrutura disponibilizada ao desenvolvimento de parte dessa pesquisa.

À Profa. Dra. Soraya Oliveira dos Santos (MS), à MSc. Elenild de Góes Costa (SESPA), à Dorilea de Sena Pantoja Sales (SESPA) e a toda a equipe da SESPA, fundamentalmente pelo empenho e dedicação dos últimos anos à doença de Chagas, cujas iniciativas certamente serviram de inspiração para que eu pudesse dar continuidade e contribuição à pesquisa sobre essa complexa questão de saúde pública brasileira.

Ao MSc. Elias Seixas Lorosa, à Profa. Dra. Cristiane Varella Lisboa e à Profa. Dra. Ana Maria Jansen Franken dos Laboratórios de Biologia de Tripanosomatídeos e de Referência Nacional e Internacional para Taxonomia de Triatominae, da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (Fiocruz/RJ), pela precisão e excelência na prestação de serviços.

À MSc. Viviane Liotti Dias, pela amizade, paciência, ajuda e por dividir com tranquilidade toda a sua experiência com o *Trypanosoma cruzi* e com os modelos experimentais ao longo desses anos. Obrigado!

Ao Prof. Dr. Ângelo Pires do Prado (*in memoriam*) (IB/Unicamp) e ao Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat (Cemib/Unicamp), pela transparência e apoio por acreditarem desde o início, que eu estava, de fato, preparado para iniciar o curso de Doutorado.

À Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta (IB/Unicamp) e à Profa. Dra. Mara Cristina Pinto (FCFar/Unesp Araraquara), pela convivência durante o estágio de docência, por breves mas valiosos momentos e pelas críticas e sugestões durante o Exame de Qualificação de Doutorado.

À Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha (IB/Unicamp), ao Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez (DEQ/UFGA) e à Profa. Dra. Nanci do Nascimento (IPEN-CNEN/USP), pelas observações enriquecedoras durante o Exame Prévio da Tese.

À Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco (IB/Unicamp), pela seriedade, pelas parcerias estabelecidas e por incentivar-me na temática da Parasitologia em alimentos.

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares (IB/Unicamp), pela ajuda e atenção na análise estatística dos dados obtidos.

Ao Prof. Dr. Flávio Luis Schmidt (FEA/Unicamp), pelo profissionalismo, ética, sensatez e pela contribuição com importantes considerações a respeito do delineamento experimental no tratamento térmico da polpa de açaí.

À Profa. Dra. Karen Signori Pereira (EQ/UFRJ) e ao Prof. Dr. Sérgio Bernardo (INPI/RJ), mais que profissionais, grandes amigos. Agradeço por me proporcionarem tantas alegrias, mas principalmente por me fazerem enxergar a vida de uma maneira mais leve e ainda mais otimista.

Às recém-doutoras Rebeka Tomasin, Laura Jane Gislotti e Carina Mara de Souza, sinônimos de competência, justiça e lealdade em seis anos de pós-graduação, à MSc. Mariana Prado Nassu, pela excelente parceria durante o estágio de docência e aos demais colegas do Laboratório de Entomologia L2B da Unicamp, pela simpatia e generoso acolhimento em diversas situações.

Aos funcionários do Cemib/Unicamp, mas especialmente à MSc. Ana Paula Gimenes, MSc. Andréia Ruis Salgado, Jéssica Maria Inácio Madoenho,

MSc. Joel Alberto Prezzi, MSc. Marcos Zanfolin e MSc. Sônia Cano Montebelo Rachel, pela amizade, convivência, colaboração e compreensão na realização de parte dessa pesquisa em seus ambientes de trabalho.

À minha família, que me apresenta desafios diários nos últimos anos, mas que me forneceu a base necessária para que eu pudesse atingir o meu objetivo com firmeza e segurança, em especial aos meus avós Vicente Labello, Neuza Dalbo Labello e à minha mãe Rita de Cássia Labello.

Ao meu tio Vicente Labello Júnior e família, pelos momentos de apoio e compreensão.

À minha irmã Aline de Cássia Labello Monti, que é um presente na minha vida, pelo crescimento e maturidade compartilhados durante os últimos anos, sempre com muito diálogo e confiança. Admirável!

Aos amigos e colegas da saudosa Unesp Rio Claro, pela convivência diária e incentivo, quando esse sonho começou a ser projetado, ainda durante a graduação. Lembranças de um tempo inesquecível!

Agradeço de maneira especial à Carolina De Marchi Santiago, Joyce Pellisson Pereira e Thais Demarchi Mendes, pela alegria, estímulo e cumplicidade durante esses anos de estudo e pesquisa. Mesmo após concluída a faculdade, a distância física não tem se mostrado impedimento para a nossa harmoniosa convivência e amizade.

Aos amigos, colegas de longa data e às pessoas que passaram pelo meu caminho nos últimos quatro anos, difícil citar todos sem cometer injustiças, mas que se sentem parte dessa vitória e aqui certamente se reconhecerão. Agradeço os bons exemplos, em gestos ou palavras, e entendo que em cada vivência há a tentativa de nos tornarmos seres mais humanos, mais completos e mais felizes.

A todos que encontraram motivação e curiosidade para consultar essa tese e a estudar mais sobre essa temática, que é genuinamente brasileira.

Aos leitores que compartilham da ideia, assim como eu, do poder transformador que há em uma educação de qualidade dada a um ser humano com força de vontade.

À vida, que, além de um mistério, por si só já é um grande milagre e nos convida a aprender mais a cada instante. Muito obrigado!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

pág.

CAPÍTULO I: Tratamentos de aquecimento, inativação térmica e virulência do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) em polpa *in natura* de açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) na doença de Chagas aguda

Figura 1. Balão de vidro artesanal com três aberturas superiores adaptado dentro de um banho ultratermostático de alta precisão. 47

Figura 2. Sistema *in vitro* adaptado para o estudo da inativação térmica de *T. cruzi*. 48

Figura 3. Sistema *in vitro* adaptado para comparações de metodologias no estudo da inativação térmica de *T. cruzi*. 49

Figura 4. Detalhe do tubo de polisulfona com única abertura superior adaptado dentro de um banho ultratermostático de alta precisão. 50

CAPÍTULO II: Virulência de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) de vetores e reservatório em polpa *in natura* de açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) na doença de Chagas aguda de transmissão alimentar no Estado do Pará, Brasil

Figura 1. Visualização aérea e limite geográfico do município de Belém, no Estado do Pará, Brasil. 148

Figura 2. Visualização aérea do município de Belém, no Estado do Pará, Brasil. 149

Figura 3. Visualização aérea da mata do bairro de Val-De-Cans, no município de Belém, no Estado do Pará, Brasil. 152

| | |
|---|------|
| | pág. |
| Figura 4. Visualização aérea da Ilha do Combu, pertencente ao município de Belém, no Estado do Pará, Brasil. | 154 |
| Figura 5. Visualização aérea e limite geográfico do município de Abaetetuba, no Estado do Pará, Brasil. | 156 |
| Figura 6. Visualização aérea dos principais rios do município de Abaetetuba, no Estado do Pará, Brasil. | 159 |
| Figura 7. Comparação da evolução da parasitemia entre diferentes modelos animais isogênicos imunodeficientes infectados com 10^5 formas tripomastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> . | 229 |
| Figura 8. Comparação da constatação da DCA entre diferentes doses de <i>T. cruzi</i> (Tcl e TcII) de diversas fontes e localizações. Letras distintas são significativamente diferentes (teste de <i>Duncan</i> , 99% de confiança). | 230 |
| Figura 9. Comparação da mortalidade de hospedeiros isogênicos imunodeficientes entre diferentes doses de <i>T. cruzi</i> (Tcl e TcII) de diversas fontes e localizações. | 231 |

LISTA DE TABELAS

pág.

CAPÍTULO I: Tratamentos de aquecimento, inativação térmica e virulência do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) em polpa *in natura* de açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) na doença de Chagas aguda

Análises da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M e em polpa *in natura* de açaí de acordo com o método A

Tabela 1. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com solução de NaCl 0,15M mantida a 37°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 45°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 49°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

55

Tabela 2. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 37°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 39°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 41°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

56

Tabela 3. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

57

Tabela 4. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 43,3°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 43,5°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

58

Tabela 5. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

59

Tabela 6. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 44,5°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

60

Tabela 7. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 45°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 47°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 49°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

61

Tabela 8. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* recuperadas da mistura com polpa de açaí mantida a 37°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 39°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 41°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

62

Tabela 9. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* recuperadas da mistura com polpa de açaí mantida a 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

63

Tabela 10. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* recuperadas da mistura com polpa de açaí mantida a 43,3°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 43,5°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 44,5°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

64

Tabela 11. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* recuperadas da mistura com polpa de açaí mantida a 45°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

65

Análises da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M e em polpa *in natura* de açaí de acordo com o método B

Tabela 12. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com solução de NaCl 0,15M mantida a 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

66

Tabela 13. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

67

Tabela 14. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* recuperadas da mistura com polpa de açaí mantida a 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

68

Comparação da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M e em polpa *in natura* de açaí entre ambas metodologias

Tabela 15. Quadro comparativo em relação à constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M ou recuperadas da mistura com polpa de açaí mantidas a 43°C e 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 e 20 minutos, utilizando-se duas metodologias diferentes. Dados seguidos de letras minúsculas distintas entre parênteses apresentam diferença significativa (teste de Duncan, 95% de confiança).

69

CAPÍTULO II: Virulência de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) de vetores e reservatório em polpa *in natura* de açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) na doença de Chagas aguda de transmissão alimentar no Estado do Pará, Brasil

Tabela 1. Identificação das amostras de *T. cruzi* utilizadas durante o estudo, incluindo código internacional, dados do hospedeiro, classificação e procedência.

168

Tabela 2. Constatação da DCA e mortalidade, em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, com diferentes doses de tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (TcII).

175

Tabela 3. Avaliação *in vitro* da sobrevivência de *T. cruzi* (Tcl) de diferentes fontes, por meio da contagem de formas epimastigotas ou tripomastigotas em meio bifásico LIT e NNN, à microscopia óptica comum (1000x), sem coloração, segundo a metodologia de Brener (1962).

176

Tabela 4. Virulência de 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans (PA), obtidos de meio bifásico LIT e NNN e utilizados para infecção experimental, por diferentes vias de administração, por meio da constatação da DCA e mortalidade em camundongos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib.

177

Tabela 5. Virulência de 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (PA), obtidos de meio bifásico LIT e NNN e utilizados para infecção experimental, por diferentes vias de administração, por meio da constatação da DCA e mortalidade em camundongos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib.

178

Tabela 6. Virulência de 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Rhodnius* sp. da Ilha do Combu (PA), obtidos de meio bifásico LIT e NNN e utilizados para infecção experimental, por diferentes vias de administração, por meio da constatação da DCA e mortalidade em camundongos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib.

179

Tabela 7. Virulência de 2.10^4 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Philander opossum* da Ilha do Combu (PA), obtidos de meio bifásico LIT e NNN e utilizados para infecção experimental, por diferentes vias de administração, por meio da constatação da DCA e mortalidade em camundongos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib.

180

Tabela 8. Constatação da DCA para amplificação clonal de formas tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans (PA) em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, a partir de meio bifásico LIT e NNN.

181

Tabela 9. Constatação da DCA para amplificação clonal de formas tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (PA), em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, a partir de meio bifásico LIT e NNN.

182

Tabela 10. Constatação da DCA para amplificação clonal de formas tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes de *Philander opossum* da Ilha do Combu (PA) em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, a partir de meio bifásico LIT e NNN.

183

Tabela 11. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, com diferentes doses de tripomastigotas (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans, Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

184

Tabela 12. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, com diferentes doses de tripomastigotas (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (área de surto), Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança). 185

Tabela 13. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, com diferentes doses de tripomastigotas (Tcl) provenientes de *Philander opossum* da Ilha do Combu, Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança). 186

Tabela 14. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, com a mistura de 10⁵ tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (TcII) em polpa *in natura* de açaí. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança). 187

Tabela 15. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, por diferentes vias de administração, com polpa *in natura* de açaí contaminada com 10⁵ tripomastigotas de *T. cruzi* I, à temperatura ambiente, provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans, Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança). 188

Tabela 16. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, por diferentes vias de administração, com polpa *in natura* de açaí contaminada com 10⁵ tripomastigotas de *T. cruzi* I, à temperatura ambiente, provenientes de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (área de surto), Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

189

Tabela 17. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, por diferentes vias de administração, com polpa *in natura* de açaí contaminada com 10⁵ tripomastigotas de *T. cruzi* I, à temperatura ambiente, provenientes de *Philander opossum* da Ilha do Combu, Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

190

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|--|
| ANOVA | Análise de Variância |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| APA | Área de Proteção Ambiental |
| APH | Alta Pressão Hidrostática |
| B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib | Linhagem de camundongo isogênico imunodeficiente |
| C.B-17-Prkdc^{scid}/Pas Unib | Linhagem de camundongo isogênico imunodeficiente |
| Capes | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CEEA | Comissão de Ética na Experimentação Animal |
| Cemib | Centro Multidisciplinar para a Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório |
| cm | Centímetro |
| cm² | Centímetro quadrado |
| cM | Centimorgan |
| ColTryp | Coleção de <i>Trypanosoma</i> de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores |
| d.a.i | Dias após infecção |
| DAOut | Distrito Administrativo do Outeiro |
| DCA | Doença de Chagas Aguda |
| DEQ | Departamento de Engenharia Química |
| DTA | Doenças de Transmissão Alimentar |
| DTU | <i>Discrete Typing Unit</i> |
| EQ | Escola de Química |
| F | Distribuição F |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| FCFar | Faculdade de Ciências Farmacêuticas |
| FEA | Faculdade de Engenharia de Alimentos |
| Fiocruz | Fundação Oswaldo Cruz |
| g | Grama |
| GLM | <i>Global Linear Model</i> |
| gp | Glicoproteína |

| | |
|----------------|--|
| HTST | <i>High Temperature and Short Time</i> |
| i.p | Intraperitoneal |
| IB | Instituto de Biologia |
| INCRA | Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária |
| Inmetro | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia |
| INPI | Instituto Nacional de Propriedade Industrial |
| INPE | Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais |
| IPEN | Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares |
| kDNA | Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto |
| kg | Kilograma |
| kGy | <i>KiloGray</i> |
| L | Litro |
| LCS | Laboratório de Controle Sanitário |
| LIT | <i>Liver Infusion Tryptose</i> |
| LTLT | <i>Low Temperature and Long Time</i> |
| M | Molar |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| mg | Miligrama |
| MHz | <i>Megahertz</i> |
| min. | Minuto |
| mL | Mililitro |
| MS | Ministério da Saúde |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NNN | <i>Neal, Novy e Nicolle</i> |
| OPAS | Organização Pan Americana de Saúde |
| p | Probabilidade |
| PA | Pará |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| POD | Peroxidase |
| PPO | Polifenoloxidase |
| RAG | <i>Recombination Activity Gene</i> |
| rpm | Rotações por minuto |
| SAS | <i>Statistical Analysis System</i> |

| | |
|----------------|---|
| SCID | <i>Severe Combined Immunodeficiency</i> |
| SESPA | Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará |
| TcI | <i>Trypanosoma cruzi</i> I |
| TcII | <i>Trypanosoma cruzi</i> II |
| TcIII | <i>Trypanosoma cruzi</i> III |
| TcIV | <i>Trypanosoma cruzi</i> IV |
| TcV | <i>Trypanosoma cruzi</i> V |
| TcVI | <i>Trypanosoma cruzi</i> VI |
| UFPA | Universidade Federal do Pará |
| UFRJ | Universidade Federal do Rio de Janeiro |
| Unesp | Universidade Estadual Paulista |
| Unicamp | Universidade Estadual de Campinas |
| UR | Umidade Relativa |
| USP | Universidade de São Paulo |
| W | <i>Watt</i> |
| ZIII | Zimodema III |
| μL | Microlitro |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------------------------|-------------------------------|
| % | Por cento |
| ± | Variação superior ou inferior |
| Nº | Número |
| °C | Grau centígrado |
| α | Taxa global de erro |

“Suba o primeiro degrau com fé,
não é preciso que veja a escada inteira,
dá somente o seu primeiro passo com fé”

Martin Luther King

INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, em virtude de diversos fatores como o crescimento populacional, modificações nos sistemas de produção dos alimentos e de mudanças nos hábitos alimentares, tem aumentado a preocupação com a contaminação biológica da água e dos alimentos por diversos patógenos (BROGLIA & KAPEL, 2011).

A contaminação biológica alimentar ocorre principalmente por bactérias, fungos, vírus, protozoários, helmintos ou toxinas (BALBANI & BUTUGAN, 2001; DAWSON, 2005; DORNY et al., 2009) e as doenças de transmissão alimentar (DTA) se constituem em um importante e crescente problema de saúde pública no Brasil e em todo o mundo (WHO, 2014).

O *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) é um protozoário hemoflagelado, pertencente ao Filo Euglenozoa, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae, que apresenta um ciclo biológico complexo, incluindo como hospedeiro intermediário um inseto hemíptero hematófago, como hospedeiro definitivo o homem e diversas classes de mamíferos como reservatórios, no ciclo silvestre (COURA & DIAS, 2009; COURA & BORGES-PEREIRA, 2010; WHO, 2014).

A doença de Chagas originou-se há milhares de anos como enzootia, porém sabe-se que ela passou a ser denominada antroponose apenas quando o homem invadiu ecótopos silvestres. Embora existam registros da presença de *T. cruzi* em múmias de nove mil anos de idade, a doença de Chagas estabeleceu-se como zoonose somente entre os últimos 200 e 300 anos, quando triatomíneos adaptaram-se a ambientes domésticos (COURA & DIAS, 2009; COURA & BORGES-PEREIRA, 2012; COURA, 2013).

Por muitas décadas, a doença de Chagas esteve restrita ao ambiente rural e a áreas de países latino-americanos marcados pela pobreza e exclusão social (COURA, 2013; PINTO DIAS, 2013).

Contudo, a acentuada migração de chagásicos para os centros urbanos, especialmente a partir de 1970, aliada ao processo de combate sistemático ao inseto vetor da doença, fez com que a transmissão transfusional se tornasse, entre 1980 e 1990, o principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas,

inclusive em áreas não endêmicas, levando os doadores de sangue a submeter-se à triagem sorológica para essa parasitose (DIAS et al., 2011; PINTO DIAS, 2013).

Nos últimos anos, as transfusões de sangue ainda não inspecionadas em áreas não endêmicas e as altas taxas de migração de latino-americanos transformaram a doença de Chagas em um problema de saúde global (COURA & VIÑAS, 2010; SCHMUNIS & YADON, 2010; PINTO DIAS, 2012; AGÊNCIA FAPESP, 2013; PINTO DIAS, 2013).

Entretanto, diversos outros fatores como o aumento da expectativa de vida de pacientes chagásicos crônicos, as mudanças climáticas e os novos mercados internacionais consumidores de açaí não higienizado corretamente ou sem certificação de qualidade parasitológica (OPAS, 2006) devem ser apontados porque poderão contribuir à intensificação da doença de Chagas como importante questão social nas próximas décadas.

Atualmente, a doença de Chagas é classificada como uma doença negligenciada e, de acordo com a Portaria nº 1.271, de 6 de Junho de 2014, do Ministério da Saúde, sua fase aguda é de notificação compulsória (DOU, 2014).

Ela está presente em 21 países, incluindo a América do Norte, a Europa, além do Japão e da Austrália. Apresenta prevalência mundial de aproximadamente oito milhões de infectados e estima-se que ocorram 12 mil mortes por ano. Os números são variáveis, mas, somente no Brasil, acredita-se que cerca de cinco milhões de indivíduos encontram-se infectados (AGÊNCIA FAPESP, 2013; DNDi, 2014; WHO, 2014).

As possibilidades de transmissão da doença de Chagas humana compreendem a via vetorial, o contato com secreções da glândula anal de marsupiais reservatórios, a transfusão sanguínea, a via congênita ou vertical, o transplante de órgãos não inspecionados, a via sexual, por acidente de laboratório ou ainda, a transmissão oral via leite materno ou outro alimento contaminado (DIAS et al., 2011).

Além disso, dada a sua relevância atual em saúde pública e seus impactos econômicos, recentemente, o *T. cruzi* encontra-se entre os 10 mais importantes parasitos de transmissão alimentar (FAO, 2014).

Microepidemias familiares ou comunitárias de doença de Chagas aguda (DCA), via transmissão oral, são responsáveis por centenas de casos humanos com presença de sintomatologia grave seguida de óbito (PINTO et al., 2008).

Esses relatos estão associados ao consumo de água, vegetais ou polpa de açaí com *T. cruzi* em diversos Estados brasileiros, bem como sucos de frutas contaminados como goiaba, tangerina, além de sangue de mamíferos, carne de caça e leite crus em outros países da América do Sul nas últimas décadas (PEREIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; TOSO et al., 2011; ROGEZ & AGUIAR, 2012; SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012).

Em virtude de sua grande utilização, de suas excelentes propriedades nutricionais e propriedades sensoriais características (MENAA, 2014), o açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) constitui-se a base da culinária paraense, sendo o mais importante suplemento alimentar da dieta da população da Bacia amazônica (SAGRI, 2011).

De acordo com um censo inédito recente, o açaizeiro (*Euterpe precatoria*) é a espécie mais comum encontrada na Amazônia (STEEGE et al., 2013) e trata-se de uma ótima alternativa para a melhoria de vida do meio rural, pois representa 70% da fonte geradora de renda da população ribeirinha na região Norte do Brasil (SAGRI, 2011).

Segundo Santos (2013), o Instituto Evandro Chagas (IEC) contabilizou na Amazônia, no período de 1968 a 2005, a ocorrência de 442 casos de doença de Chagas autóctones. Dentre eles, 437 casos agudos com 11 óbitos, sendo 71% relacionados a surtos.

Porém, apenas a partir de 2005, por meio da formalização do serviço de vigilância em doença de Chagas no Estado do Pará, foi possível estabelecer uma rede de notificação (SANTOS, 2013).

Essa investigação, até 2012, havia demonstrado distribuição de 937 casos agudos em 56 municípios paraenses, cuja maioria ocorrida em área urbana sem condições para manter o ciclo biológico do parasito (SANTOS, 2013).

Essa avaliação apontou uma situação endêmica e, até 2013, a Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará já havia registrado mais de 950 casos da

doença de Chagas, sendo que cerca de 70% das notificações apresentaram associação epidemiológica direta ao consumo de polpa de açaí contaminada com o parasito (SAMPAIO et al., 2013).

Esse aumento do número de casos de DCA ocorreu concomitantemente a uma iniciativa governamental de fomento ao agronegócio e que incentivou pequenos e médios agricultores no plantio de novos açaizais em municípios do Estado do Pará (VALENTE, 2011; SANTOS, 2013).

A região metropolitana de Belém é a maior produtora de polpa de açaí do Estado do Pará. Esse fato é de grande relevância porque causa impacto a outras regiões, uma vez que fornecem os frutos para a região metropolitana, responsável pelo abastecimento local, distribuição a outros Estados, bem como para a exportação (ROGEZ, 2000; VALENTE, 2011; SANTOS, 2013).

Além disso, as áreas urbanas de Belém e Abaetetuba foram as que registraram o maior número de notificações da DCA do Pará, entre 2005 e 2012, destacando-se como importantes regiões de risco para transmissão da doença e responsáveis, respectivamente, por cerca de 20% e 19% dos casos notificados no Estado, embora as áreas urbanas não reúnam um ciclo enzoótico capaz de gerar todos os casos (VALENTE, 2011; SANTOS, 2013; XAVIER et al., 2014).

Na região amazônica, especialmente no Estado do Pará, o consumo da polpa de açaí se restringe à compra imediata do produto processado e, portanto, passível de contaminação *in natura* (SAGRI, 2011).

Os surtos causam elevado impacto sócio econômico (CONAB, 2010; CONAB, 2011; SAGRI, 2011) e estão associados à veiculação de formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* com a virulência preservada na polpa *in natura* de açaí (LABELLO BARBOSA et al., 2012; PASSOS et al., 2012), seja por meio da contaminação durante a colheita e armazenamento dos frutos ou pela contaminação com dejetos de animais reservatórios ou fezes de triatomíneos infectados em equipamentos e/ou utensílios utilizados na produção da polpa de açaí (OPAS, 2006).

No entanto, excetuando-se a Amazônia, em outras regiões do país e do exterior, onde o açaí é também bastante apreciado (MENAA, 2014), embora não

existam relatos de microepidemias, devido às longas distâncias, o seu consumo só é viável se passar por processo de conservação (ROGEZ, 2000).

Considerando os diferentes processos disponíveis, verificou-se que cada método apresenta vantagens e desvantagens para a conservação do açaí, tanto do ponto de vista econômico quanto para a manutenção da qualidade final do alimento (MELO et al., 1988; ALEXANDRE et al., 2004; EMBRAPA, 2005; SOUZA et al., 2006; MENEZES et al., 2008; COSTA et al., 2009; TONON, 2009; SOUTO et al., 2011; EMBRAPA, 2013).

Dada a dificuldade da escolha de um único método, capaz de conservar a polpa de açaí de maneira completa e sabendo que o resfriamento e o congelamento não são métodos capazes de prevenir a transmissão alimentar da DCA (LABELLO BARBOSA et al., 2012; PASSOS et al., 2012), a tentativa de obter alimentos seguros do ponto de vista microbiológico, nutricional e sensorial constitui-se ainda um grande desafio.

Por outro lado, o uso da conservação pelo calor é muito utilizado para o estudo da inativação de enzimas, bactérias e fungos patogênicos deterioradores de diversos alimentos e embalagens (AZEREDO, 2004).

Na prática, o termobacteriologista define a morte do micro-organismo quando não mais há habilidade para se multiplicar ou causar infecção e alterações em um substrato. Sob calor úmido, a morte microbiana é relativamente organizada e é comum expressar sua velocidade de forma exponencial, ou seja, através de uma reação de primeira ordem (STUMBO, 1973).

Contudo, no caso de protozoários como o *T. cruzi*, que apresenta ciclo biológico complexo, os estudos do seu comportamento sob aquecimentos brandos e tratamentos alternativos à temperatura e tempo estabelecidos à pasteurização para sua eliminação na polpa de açaí são ferramentas importantes, uma vez que a cocção de alimentos acima de 45°C impede a transmissão da DCA (DIAS, 2006; DIAS & AMATO NETO, 2011).

Dessa maneira e considerando-se também que (a) TcI é o genótipo de *T. cruzi* mais predominante na região amazônica (COURA & DIAS, 2009; VALENTE, 2011); (b) entre 1995 e 2005, *Rhodnius pictipes* foi o vetor mais capturado em

diferentes ecótopos no Amapá e no Pará (VALENTE, 2008; VALENTE et al., 2009); (c) *Philander opossum* tem sido frequentemente capturado na região Norte nos últimos anos (VALENTE, 2008; ROQUE et al., 2013); (d) os marsupiais são, ao mesmo tempo, reservatórios e vetores e, dada a sua relevância dentro do ciclo biológico do parasito (DEANE et al., 1984), ainda são pouco estudados; e que (e) dados do mercado do agronegócio de açaí reforçam a possibilidade do seu envolvimento na transmissão oral de DCA (CONAB 2011; SAGRI, 2011; SANTOS, 2013), a necessidade da investigação da dinâmica epidemiológica da DCA por meio da ingestão de polpa *in natura* de açaí, sob o ponto de vista experimental, utilizando-se parasitos provenientes da Amazônia, tornou-se além de necessário, um elemento estimulante e desafiador.

Desde 2007, por iniciativa do Ministério da Saúde do Brasil, foi reunido um grupo pluridisciplinar de especialistas dentre os quais das áreas de Parasitologia, Ciência de Animais de Laboratório e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, com o objetivo de investigar mecanismos relacionados à transmissão oral da DCA pelo consumo de polpa *in natura* de açaí.

A tese aqui retratada é, portanto, um dos produtos do desdobramento dessa iniciativa conjunta, que obteve também suporte da Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará, da Fundação Oswaldo Cruz e da Universidade Federal do Rio de Janeiro e mostrou-se necessária para uma melhor elucidação da complexidade das interações e compreensão do panorama atual da cadeia de transmissão oral da doença de Chagas na região amazônica.

Dada a sua abrangência e para uma abordagem mais clara de seu conteúdo, a apresentação desse estudo está dividida em dois capítulos: o primeiro trata sobre a inativação térmica do *T. cruzi* e o segundo, sobre a virulência de parasitos obtidos de vetores e reservatório no Pará, ambos em relação à transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo da polpa de açaí.

Assim, os resultados obtidos contribuirão não apenas ao entendimento da magnitude da doença, particularmente no Pará, como principalmente para ações e programas governamentais voltados à prevenção e controle contínuos da DCA transmitida por alimentos na região Norte do país (ANVISA, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGÊNCIA FAPESP. FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Doença de Chagas atinge países desenvolvidos**. Especiais, Agência Fapesp. 2013. Disponível em: <agenciafapesp.br/17002>. Acesso em: 27 mar. 2013.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. Informe Técnico - nº 35 de 19 de junho de 2008**. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35_190608.pdf>. Acesso em: 17 set. 2010.

AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004, 195p.

BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. **Contaminação biológica de alimentos**. Pediatría (São Paulo), v. 23(4), p. 320-328, 2001.

BROGLIA, A.; KAPEL, C. ***Changing dietary habits in a changing world: Emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses***. *Veterinary Parasitology*, v. 182, p. 2-13, 2011.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conjuntura mensal. Açaí (fruto). Período: 01 a 30/06/2010**. 2010. Disponível em: <<http://portal.mda.gov.br/o/7446519>>. Acesso em: 9 mai. 2012.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conjuntura mensal. Açaí (fruto). Período: 01 a 30/06/2011.** 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_06_22_17_13_53_conjunturaacaijunho2011.pdf>. Acesso em: 9 mai. 2012.

COSTA, W. S.; ABREU, C. R.; NETO A. L. C.; MAGNO, A. P.; VILAR, D. A. N. **O uso de água boricada para a conservação do açaí.** Anais do 49º Congresso Brasileiro de Química. Química dos Alimentos. Porto Alegre. Associação Brasileira de Química, 2009. Disponível em: <www.abq.org.br/cbq/2009/trabalhos/10/10-106-6032.htm>. Acesso em: 9 abr. 2013.

COURA, J. R. ***Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible?*** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 108(8), p. 962-967, 2013.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA J. ***Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review.*** *Acta Tropica*, v. 115, p. 5-13, 2010.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. ***Chagas disease. What is know and what should be improved: A systemic review.*** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45(3), p. 286-296, *may-jun*, 2012.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. ***Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery.*** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104(I), p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. ***Chagas disease: A new worldwide challenge.*** *Nature (London)*, v. *suplem.*, p. S6-S7, 2010.

DAWSON, D. ***Foodborne protozoan parasites.*** *International Journal of Food Microbiology*, v. 103(2), p. 207-227, 2005.

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

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

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V. **Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil**. História sobre a doença de Chagas no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44(II), p. 68-72, 2011.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. A. **Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 44(3), p. 375-379, mai-jun, 2011.

DNDi. **DRUGS FOR NEGLECTED DISEASE INITIATIVE. Doenças negligenciadas. Doença de Chagas**. 2014. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>>. Acesso em: 23 abr. 2014.

DORNY, P.; PRAET, N.; DECKERS, N.; GABRIEL, S. ***Emerging food-borne parasites***. *Veterinary Parasitology*, v. 163(3), p. 196-206, 2009.

DOU. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. **Lista Nacional de Notificação Compulsória**. Diário Oficial da União, n. 108, segunda-feira, 9 de junho de 2014, seção 1, p. 68-69, 2014.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Conservação a frio.** 2013. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgie02wyiv80z4s473caciza4.html>. Acesso em: 1 nov. 2013.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema de produção do açaí.** 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/>. Acesso em: 9 abr. 2013.

FAO. *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS*. 2014. **“Top Ten” list of food-borne parasites released.** Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/en/item/237323/icode/>>. Acesso em: 3 jul. 2014.

LABELLO BARBOSA, R.; DIAS, V. L.; PEREIRA, K.S.; SCHMIDT, F. L.; FRANCO, R. M. B.; GUARALDO, A. M. A.; ALVES, D. P.; PASSOS, L. A. C. ***Survival in vitro and virulence of Trypanosoma cruzi in açaí pulp in experimental acute Chagas disease.*** *Journal of Food Protection*, v. 75, p. 601-606, 2012.

MELO, C. F. M.; BARBOSA, W. C.; ALVES, S. M. **Obtenção de açaí desidratado.** Belém, PA: Embrapa-CPATU, 1988, 13p.

MENAA, F. ***The berry fruit açaí (Euterpe oleracea Mart): Bringing health benefits and exotism to the modern table.*** *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences*, v. 1(1), 2014.

MENEZES, E. M. S.; ROSENTHAL, A.; SABAA-SRUR, A.; CAMARGO, L.; CALADO, V.; SANTOS, A. **Efeito da alta pressão hidrostática na atividade de enzimas da polpa de açaí.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 14-19, 2008.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39(5), p. 512-514, 2006.

PASSOS, L. A. C.; GUARALDO, A. M. A.; LABELLO BARBOSA, R.; DIAS, V. L.; PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; FRANCO, R. M. B.; ALVES, D. P. **Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*.** Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 21(2), p. 213-222, abr-jun, 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(2), p. 441-446, 2009.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; LABELLO BARBOSA, R.; GUARALDO, A. M. A.; FRANCO, R. M. B.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. C. ***Transmission of Chagas' disease (American trypanosomiasis) by foods.*** *Foods and American trypanosomiasis*, v. 59, p. 63-85, 2010.

PINTO, A. Y. N.; VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; FERREIRA JUNIOR, A. G.; COURA, J. R. **Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41(6), p. 602-614, nov-dez, 2008.

PINTO DIAS, J. C. ***Human Chagas disease and migration in the context of globalization: Some Particular Aspects.*** *Journal of Tropical Medicine*, v. 2013, p. 1-9, 2013.

PINTO DIAS, J. C. ***Tendencias sociales de la enfermedad de Chagas para las próximas décadas.*** *Salud Colectiva*, Buenos Aires, v. 8(1), p. S39-S48, nov, 2012.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação.** Belém: UFPA, 2000, 315p.

ROGEZ, H.; AGUIAR, F. S. **Contaminação da bebida açaí envolvendo *Trypanosoma cruzi*.** In: PESSOA, J. D. C.; TEIXEIRA, G. H. DE A. (Org.). *Tecnologias para inovação das cadeias Euterpe*. 1 ed. Brasília: Embrapa, p. 205-228, 2012.

ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. C.; GERHARDT, M.; SILVA, M. F. O.; LIMA, V. S.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. ***Trypanosoma cruzi among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area.*** *Veterinary Parasitology*, v. 193, p. 71-77, 2013.

SAGRI. SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA. GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ. **A importância do açaí no contexto econômico, social e ambiental do Estado do Pará.** 2011. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fruticultura/27RO/App_A%C3%A7ai .pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fruticultura/27RO/App_A%C3%A7ai.pdf)>. Acesso em: 18 mai. 2012.

SAMPAIO, P. B.; PANTOJA, D.; SANTOS, M. G. **Estratégias de treinamento teórico/prático para realização da etapa de branqueamento em frutos de açaí com processadores artesanais do município de Belém/PA.** p. 1140-1143. XVIII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos – ENAAL. IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos. Gestão e Inovação Tecnológica. São Paulo. 15 a 18 de setembro de 2013.

SANTOS, S. O. **Eco-epidemiologia da doença de Chagas aguda em área amazônica. Município de Abaetetuba, Estado do Pará, Brasil, 2008 - 2009.** 2013. 161 f. Tese (Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais. 2013.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. **Chagas disease: A Latin America health problem becoming a world health problem.** *Acta Tropica*, v. 115, p. 14-21, 2010.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. **Oral transmission of Chagas disease.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 54(6), p. 845-852, 2012.

SOUTO, R. N. M.; SABAA-SRUR, A. U. O.; SILVA, A. G. **Uso da radiação gama e da refrigeração na conservação de polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.).** *Revista Higiene Alimentar*, v. 25(194/195), p. 1074-1076, 2011.

SOUZA, M. A. C.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; PANTOJA, L. **Suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): Microbiological evaluation thermal treatment and shelf life.** *Acta Amazônica*, v. 36(4), p. 497-502, 2006.

STEEGE, H. TER; PITMAN, N. C. A.; SABATIER, D.; BARALOTO, C.; SALOMAO, R. P.; GUEVARA, J. E.; PHILLIPS, O. L.; CASTILHO, C. V.; MAGNUSSON, W. E.; MOLINO, J. F. et al. **Hyperdominance in the Amazonian Tree Flora.** *Science*, v. 342(6156), 2013.

STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in Food Processing.** *Food Science and Technology*. London: Academic Press, 2 ed., 1973, 329p.

TONON, R. V. **Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto.** 2009. 212 f. Tese

(Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

TOSO, A. M.; VIAL, F. U.; GALANTI, N. **Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral**. *Revista Medica de Chile*, v. 139(2) p. 258-266, 2011.

VALENTE, S. A. S. **Estudos dos surtos de doença da Chagas ocorridas no Pará e Amapá: Análise parasitológica, sorológica e molecular**. 2008. 162 f. Tese (Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2008.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; PINTO, A. Y. N.; CÉSAR, M. J. B.; SANTOS, M. P.; MIRANDA, C. O. S.; CUERVO, P.; FERNANDES, O. **Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites**. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, p. 291-297, 2009.

VALENTE, V. C. **Estudo genotípico de *Trypanosoma cruzi*: Epidemiologia e caracterização molecular de isolados do homem, triatomíneos e mamíferos silvestres do Pará, Amapá e Maranhão**. 2011. 164 f. Tese (Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Universidade Federal do Pará. Belém. 2011.

WHO. *WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis)*. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em: 23 abr. 2014.

XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R.; BILAC, D.; ARAÚJO, V. A. L. ; COSTA NETO, S. F. ; LOROSA, E. S. ; SILVA, L. F. C. F.; JANSEN, A. M. **Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: A new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil**. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8(5), p. 1-9, may, 2014.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará a ter o seu tamanho original”

Albert Einstein

CAPÍTULO I:

TRATAMENTOS DE AQUECIMENTO, INATIVAÇÃO TÉRMICA E VIRULÊNCIA DO *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) EM POLPA *in natura* DE AÇAÍ (*Euterpe oleraceae* Martius) NA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA

ABSTRACT

HEAT TREATMENT, THERMAL INACTIVATION AND VIRULENCE OF *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) IN *in natura* AÇAÍ PULP (*Euterpe oleraceae* Martius) ABOUT ACUTE CHAGAS' DISEASE

Outbreaks of acute Chagas' disease (ACD) in the northern of Brazil can be caused by the ingestion of *in natura* fruit's açai of pulp contaminated with *Trypanosoma cruzi*. Due the economic and cultural relevance and considering that the cooling and freezing are not efficient to prevent the ACD foodborne, the aim of this study was determine the minimum "temperature x time" for inactivation or death of *T. cruzi* in fruit's açai of pulp. 10^5 trypomastigotes of *T. cruzi* Y strain were mixed with 0,15M NaCl or *in natura* fruit's açai of pulp and heat-treated between 37°C and 49°C in a high-precision water bath, for up to one hour, under constant homogenization, in two methodologies with different measures. When necessary, the contaminated mixtures were subjected to forced sieving process. 200µL of inoculum (negative control, positive control or test group) were administrated, intraperitoneally, in inbred immunodeficient hosts C.B-17-Prkdc^{scid}/Pas Unib, under preview antibiotic therapy (1,75mg/day). Parasitemia was scored as recommended by Brener and mortality registered. *T. cruzi* retained its virulence in 0,15M NaCl and in fruit's açai of pulp, respectively, at $44 \pm 0,1^\circ\text{C}$ for 10 minutes and at $43 \pm 0,1^\circ\text{C}$ for 20 minutes, caused ACD and death in mice up to 24 days after experimental infections. At 43°C for 30 minutes or more in *in natura* fruit's açai of pulp, it did not retain its virulence and did not cause ACD and death. Statistical analysis showed no significant difference in both methodologies (Duncan test, α 0,05). Thus, cooking *in natura* fruit's açai of pulp above 44°C will prevent foodborne ACD, following laboratory parameters defined.

Keywords: heat; prevention; foodborne diseases; acute Chagas' disease; immunodeficient host.

RESUMO

TRATAMENTOS DE AQUECIMENTO, INATIVAÇÃO TÉRMICA E VIRULÊNCIA DO *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) EM POLPA *in natura* DE AÇAÍ (*Euterpe oleraceae* Martius) NA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA

Microepidemias de doença de Chagas aguda (DCA) na região Norte do Brasil podem ser causadas pelo consumo de polpa *in natura* de açaí contaminada com *Trypanosoma cruzi*. Dada a sua relevância econômica, cultural e considerando que a refrigeração e o congelamento não são métodos eficientes à prevenção da DCA de transmissão alimentar, o objetivo desse estudo foi determinar um binômio “temperatura x tempo” mínimo necessário à inativação ou morte do *T. cruzi* em polpa de açaí. 10^5 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram misturadas com solução de NaCl 0,15M ou polpa *in natura* de açaí e submetidas a tratamentos térmicos entre 37°C e 49°C em um banho ultratermostático de alta precisão, por até uma hora, sob homogeneização constante, em duas metodologias de volumes diferentes. Quando necessário, as misturas contaminadas foram submetidas à tamisação forçada. 200µL do inóculo (controle negativo, controle positivo ou grupo teste) foram administrados, via intraperitoneal, em hospedeiros isogênicos imunodeficientes C.B-17-Prkdc^{scid}/Pas Unib, sob antibioticoterapia prévia (1,75mg/dia). A parasitemia foi realizada de acordo com o método de Brener e a mortalidade foi registrada. O *T. cruzi* pode preservar sua virulência em solução de NaCl 0,15M e em polpa de açaí, respectivamente, à $44 \pm 0,1^\circ\text{C}$ por 10 minutos e à $43 \pm 0,1^\circ\text{C}$ durante 20 minutos, causar DCA e morte em até 24 dias após as infecções experimentais. Entretanto, à 43°C por 30 minutos ou mais, em polpa *in natura* de açaí, o parasito não foi capaz de preservar sua virulência, não causou DCA e morte. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa em ambas metodologias utilizadas (teste de *Duncan*, 95% de confiança). Assim, a cocção da polpa *in natura* de açaí acima de 44°C poderá prevenir a DCA de transmissão alimentar, seguindo parâmetros laboratoriais definidos.

Palavras-chave: calor; prevenção; doenças transmitidas por alimentos; doença de Chagas aguda; hospedeiro imunodeficiente.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Principais processos de conservação da polpa de açaí

Os processos de conservação dos alimentos visam evitar alterações de origem física, tais como as produzidas por luz ou calor; química, por meio da reação com oxigênio ou água e biológica, pela presença de micro-organismos ou enzimas e podem ser classificados principalmente quanto ao tratamento pelo calor, pelo frio, pelo uso de substâncias químicas como aditivos ou de irradiação (VASCONCELOS & MELO FILHO, 2010).

Diversos métodos são estudados já há bastante tempo e buscam a eliminação de micro-organismos, a inativação de enzimas degradantes, a manutenção das características físicas, químicas e organolépticas dos alimentos (VASCONCELOS & MELO FILHO, 2010) e que também são aplicados à conservação da polpa de açaí.

1.1.1. Pasteurização

A pasteurização é um processo desenvolvido pelo cientista francês Louis Pasteur em 1864 e consiste em submeter um produto alimentício a tratamento térmico de alta temperatura e, logo em seguida, à baixa temperatura em um pasteurizador, que é geralmente um trocador de calor ou tanque de pasteurização (VASCONCELOS & MELO FILHO, 2010).

Essa variação de temperatura destrói as células vegetativas de micro-organismos patogênicos termossensíveis e parte dos deterioradores dos alimentos, aumentando seu tempo de prateleira. É um método de conservação relativamente curto, todavia pode ser utilizado por dias ou semanas, dependendo do pH do produto (MS, 1996).

O processo é relativamente brando porque não ultrapassa 100°C e pode ser produzido por diversas fontes de aquecimento como vapor, calor seco, corrente elétrica, radiação ionizante ou micro-ondas (VASCONCELOS & MELO FILHO, 2010).

É uma técnica que pode ser feita de maneira rápida ou lenta. A primeira é denominada HTST (*“high temperature and short time”*) ou “alta temperatura e curto tempo”, porque utiliza temperaturas superiores a 70°C durante alguns segundos, geralmente 72°C/ 15 segundos. A segunda forma é a LTLT (*“low*

temperature and long time") ou "baixa temperatura e longo tempo", pois são utilizadas temperaturas entre 58°C e 70°C por alguns minutos, geralmente 63°C/ 30 minutos (VASCONCELOS & MELO FILHO, 2010).

A pasteurização deve ocorrer em conjunto com outro método de preservação complementar, como a refrigeração ou o congelamento. É fundamental para a indústria de alimentos quando se pretende destruir agentes competitivos do meio, no caso de preparação para fermentação ou quando tratamentos térmicos mais elevados resultam em perdas significativas da composição e da qualidade do alimento, como é o caso do leite e seus derivados, embutidos, cervejas e frutas (VASCONCELOS & MELO FILHO, 2010).

Para a polpa de açaí, a recomendação é que as indústrias e grandes empresas utilizem temperaturas em torno de 80°C a 85°C, por 10 segundos, seguido de resfriamento. Após a pasteurização, o produto deve ser imediatamente congelado (EMBRAPA, 2005).

Segundo Souza et al. (2006), a pasteurização do suco de açaí a 90°C por cinco minutos e fervura durante um minuto demonstraram eficiência na erradicação de coliformes totais e fecais, bolores e leveduras, manutenção das características sensoriais e conservação do produto por 120 dias a -18°C.

Sabe-se também que o aquecimento do leite materno humano contaminado com formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* a 63°C, durante sete minutos, 45% de potência, em forno de micro-ondas doméstico (2450 MHz, 700 W) também se constitui em um método eficiente na inativação de tripomastigotas e garante a prevenção da transmissão da doença de Chagas pela via oral a recém-nascidos (FERREIRA et al., 2001; FERREIRA et al., 2003).

1.1.2. Branqueamento

O branqueamento é um processo de conservação de alimentos, como carnes, hortaliças ou frutas antes da desidratação, enlatamento ou congelamento, por até seis meses. É constituído por um tratamento térmico comumente aplicado após a colheita, seleção e lavagem dos alimentos, visando à inativação de enzimas, fixação de cor, remoção de gases,

principalmente o oxigênio dos tecidos, eliminação de odores e sabores desagradáveis, além da diminuição da carga microbiana superficial, para evitar sua deterioração precoce e doenças de transmissão alimentar (VASCONCELOS & MELO FILHO, 2010).

Alguns autores o consideram um pré-tratamento térmico e a técnica consiste em mergulhar os alimentos em água, à temperatura pré-determinada, superaquecida ou vapor fluente, para maior retenção dos nutrientes. O tempo e a temperatura variam conforme o tipo de matéria-prima, a carga microbiana inicial, a dimensão e a forma do alimento, o método de aquecimento utilizado e o tipo de enzima a ser inativada, mas geralmente utiliza temperaturas entre 70°C e 100°C, de um a cinco minutos, causando, portanto, a cocção do alimento (VASCONCELOS & MELO FILHO, 2010).

No caso das frutas, verduras e legumes, após o branqueamento, deve ocorrer a imersão em banho de gelo ou aspersão com água fria por igual período, de modo a evitar a contaminação por micro-organismos termófilos e não comprometer a sua textura (VASCONCELOS & MELO FILHO, 2010).

Para os frutos do açaizeiro, é de conhecimento que o branqueamento pode ser feito pela exposição à temperatura de 80°C, por 10 segundos. Essas condições são propícias à redução da carga microbiana, mas não permitem a inativação por completo de enzimas termorresistentes presentes. Por outro lado, devem ser evitados tratamentos acima de 80°C, pois há o risco de modificação das propriedades físico-químicas do fruto, mesmo imperceptíveis ao paladar da população (EMBRAPA, 2005).

As normas recomendam a aplicação de tratamento térmico na produção da polpa de açaí, sendo a pasteurização para as agroindústrias e o branqueamento para os produtores artesanais (EMBRAPA, 2005), ainda que não sejam processos plenamente capazes de solucionar o conjunto de desafios existentes.

No entanto, Rogez et al. (1996) já haviam estudado o branqueamento dos frutos de açaí para diminuição da carga microbiana do suco.

Atualmente, o Ministério da Saúde determina aos produtores artesanais a utilização das técnicas de higienização e branqueamento do fruto do açaí, inclusive com imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (MS, 2008), que aliada às boas práticas de colheita, transporte, armazenamento e

manipulação, evitará o risco da contaminação do açaí (ROGEZ & AGUIAR, 2012).

Nesse sentido, cabe ressaltar a atuação da Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará (SESPA) que, nos últimos anos, realizou capacitações sobre o branqueamento em frutos de açaí aos mais de 3000 produtores artesanais de açaí cadastrados no município de Belém (PA), conscientizando-os sobre a importância dessa prática para a eliminação do *T. cruzi* no alimento (SAMPAIO et al., 2013).

Contudo, Valente (2011) alertou para que as capacitações e as atividades de vigilância estejam presentes em todas as áreas da Amazônia, não somente aos grandes centros urbanos produtores.

Adicionalmente, dentro desse contexto, Santos (2013) propôs que fatores ambientais, culturais, ecológicos e geográficos são de maior relevância e sua avaliação será parte integrante das políticas públicas visando a implantação de programas de prevenção.

1.1.3. Conservação a frio: Refrigeração e congelamento

Os métodos baseados na conservação a frio, como a refrigeração e o congelamento, utilizam a baixa temperatura como processo principal de preservação dos alimentos. A transmissão de calor se dá do corpo mais quente para o mais frio, através da condução, para alimentos sólidos, ou da convecção, para alimentos líquidos ou pastosos. Durante a refrigeração ou congelamento, o alimento é colocado em contato com uma superfície ou ambiente mais frio, perde calor e esfria (EMBRAPA, 2013).

Na refrigeração, o alimento é mantido a temperaturas abaixo de 10°C, por um tempo limitado, por exemplo, de acordo com o produto alvo e a microbiota deteriorante a ser eliminada (EMBRAPA, 2013).

Já o congelamento mantém o alimento armazenado abaixo do ponto de congelamento da água e por períodos de tempo maiores. O frio, de acordo com a sua intensidade, pode causar injúrias nos micro-organismos e retardar reações químicas e enzimáticas (EMBRAPA, 2013).

O congelamento é o método comumente utilizado para a conservação do açaí. Sabe-se que o seu congelamento, sob temperaturas de -18°C ou mais

baixas, diminui a atividade das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), responsáveis pela degradação do fruto, pois quanto menor a temperatura de armazenamento, mais lenta será a atividade enzimática (EMBRAPA, 2013).

Para as antocianinas, que são os pigmentos naturais responsáveis pela coloração roxa-avermelhada do açaí, o congelamento também resulta em consideráveis perdas (EMBRAPA, 2013).

Trata-se de um procedimento simples e capaz de inibir o crescimento microbiano, mas que, além de alterar coloração, aroma e sabor, não é eficaz para a prevenção da transmissão oral da doença de Chagas aguda (DCA), pois o congelamento da polpa de açaí a -20°C durante 26 horas, bem como o resfriamento a 4°C por até 144 horas preservam a virulência do *T. cruzi* (LABELLO BARBOSA et al., 2012; PASSOS et al., 2012).

Embora utilizada de maneira ampla, essa técnica de conservação é bastante onerosa, pois exige a necessidade da "cadeia do frio", em que o produto deve ser conservado à baixa temperatura desde a produção até o consumo (EMBRAPA, 2013).

1.1.4. Desidratação

A desidratação é o método de preservação de alimentos que utiliza energia térmica para a remoção de parte ou a quase totalidade da água. Com isso, é possível limitar ou evitar o crescimento de micro-organismos, a ocorrência de reações químicas e proporcionar maior facilidade no transporte, armazenamento e manuseio do produto final (CORNEJO et al., 2011).

O açaí pode ser desidratado por *spray dryer*, também denominado de nebulização ou secagem por atomização, o mesmo processo usado na fabricação de leite em pó. Durante esse procedimento, o produto é conduzido a uma câmara de secagem em finas gotículas e em contato com uma corrente de ar quente desidrata (TONON, 2009).

Desse modo, a secagem se processa de maneira rápida, cerca de um a 10 segundos, e o produto resultante se apresenta na forma de pó (TONON, 2009).

Melo et al. (1988) utilizaram um modelo determinado de *spray dryer* para a obtenção de açaí em pó e aplicaram condições operacionais definidas, como temperatura do ar de entrada entre 135°C a 140°C, temperatura do ar de saída de 85°C a 90°C e pressão de trabalho de 4,9 a 6,2 kg/cm². O estabelecimento desses parâmetros permitiu um maior tempo de prateleira do alimento quando embalado em cartuchos plásticos aluminizados.

Tonon (2009) estudou a influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto na secagem por atomização do suco de açaí e, entre outros fatores, considerou como condições apropriadas o uso da temperatura de secagem de 140°C.

Freeze-drying, também conhecido como liofilização, é um processo de desidratação normalmente utilizado para conservar um material perecível ou torná-lo mais adequado para o transporte. O congelamento seguido da redução da pressão do meio exterior permite a sublimação do material e, portanto, ao perder água, há a passagem diretamente da fase sólida para a fase gasosa, restando apenas o conteúdo que se deseja conservar (MARQUES, 2008).

A liofilização é um processo relativamente de alto custo e aplicado a moléculas e células termossensíveis, tais como proteínas, enzimas, micro-organismos e plasma sanguíneo. A baixa temperatura de funcionamento do processo de congelamento causa danos mínimos aos produtos sensíveis ao calor (MARQUES, 2008).

Na indústria alimentícia, a liofilização é um processo usado para conservar os alimentos e foi popularizada na produção da “comida de astronauta”, mas é também amplamente usada para produzir ervas aromáticas, cafés, frutas e cereais para lanches. A liofilização resulta na obtenção de produtos mais leves e secos, de maior vida útil, possibilita reconstituir um alimento de maneira rápida e com pequena quantidade de água disponível. Por tratar-se de um tipo de alimento prático, atualmente, é também muito consumido entre adolescentes e viajantes, principalmente (MARQUES, 2008).

Da mesma maneira, o processo de *freeze dryer* permite que o “vinho” ou a polpa de açaí sejam transformados em pó para ser reconstituídos no momento do consumo. É um método que facilita o armazenamento, o transporte e mantém as características do alimento, porque o produto não é submetido a altas temperaturas (MENEZES et al., 2008).

A polpa de açaí liofilizada mantém as propriedades nutricionais e o valor calórico do alimento, constituindo importante complemento alimentar. Por isso, é indicada para pessoas de baixo peso, como crianças e idosos com a saúde debilitada (MENEZES et al., 2008).

Todavia, o equipamento ainda apresenta custo elevado e torna a tecnologia inviável para ampla utilização no Pará, que é o maior produtor e consumidor de produtos à base de açaí do país (CONAB, 2011).

1.1.5. Tecnologia de obstáculos

De acordo com Alexandre et al. (2004), a proposta do processo de conservação do açaí pela aplicação da tecnologia de obstáculos pode ser realizada pela combinação de diversos parâmetros em distintas formulações, como a diminuição de pH, redução da atividade de água, tratamento térmico e adição de conservante, para armazenamento à temperatura ambiente durante um período de cinco meses. Trata-se de uma metodologia satisfatória do ponto de vista econômico, da manutenção da inocuidade microbiológica e que apresenta boa aceitação sensorial pelos consumidores, porém expõe o alimento à temperatura de 82,5°C por um minuto e permite a alteração da cor do fruto.

1.1.6. Ácido bórico

Costa et al. (2009) afirmaram que o uso de solução de ácido bórico 3% (água boricada), associado à refrigeração, é um método simples, de fácil acesso e baixo custo para a conservação do suco de açaí, pois mantém o pH do alimento estável durante 24 horas. A adição dessa substância química pode evitar o decréscimo do pH e consequentemente o aparecimento do sabor azedo, decorrente da presença de micro-organismos que alteram a qualidade do produto.

1.1.7. Radiação gama

Ao avaliar o tempo de prateleira da polpa de açaí submetida à radiação ionizante (2,50kGy) combinada à refrigeração (5°C), concluiu-se que essa dose de radiação gama não foi eficiente para inibição completa de micro-organismos. Além disso, Souto et al. (2011) também demonstraram que o congelamento da polpa de açaí à -18°C apresentou uma população menor de bolores, leveduras e bactérias mesófilas, após 23 dias de armazenamento, quando comparado ao alimento irradiado.

1.1.8. Inibição da atividade enzimática

A ação benéfica ou desfavorável das reações enzimáticas nos alimentos varia de acordo com a matéria-prima, é responsável pela formação de compostos altamente desejáveis ou indesejáveis e pode ocorrer no alimento natural, durante o seu processamento ou armazenamento (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

A inativação enzimática, por meio de tratamento térmico, é um recurso utilizado no processamento, mas principalmente na conservação de um produto alimentício. Da mesma forma, a otimização de um processo térmico para a inativação de enzimas naturais termorresistentes é difícil, pois há uma relação estreita de dependência com o tempo aplicado e com a busca pela retenção máxima dos nutrientes e fatores de qualidade como cor, aroma e textura do alimento (EVANGELISTA, 1998).

As frutas contêm enzimas termorresistentes como pectinesterase, peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO). O escurecimento observado em várias frutas e vegetais *in natura* é proveniente de reações enzimáticas catalisadas pela PPO e deve ser controlado durante o processamento e o armazenamento do produto, visando à preservação da aparência visual, qualidade nutritiva, sabor e conseqüentemente para evitar perdas econômicas consideráveis (ARAÚJO, 1999).

Sabe-se que a identificação da enzima de maior termorresistência, bem como da sua porção termorresistente e termolábil, são parâmetros utilizados no

processo da cinética de inativação térmica, pois são responsáveis por causar alteração da qualidade do produto durante o armazenamento (LUND, 1975).

De acordo com Aylward & Haisman (1969), a POD possui o comportamento mais termorresistente nos produtos de origem vegetal e por isso é usada como índice de branqueamento.

A POD pertence ao grupo das oxidoredutases, está presente tanto em nível tissular quanto em nível subcelular nos tecidos vegetais e apresenta alto grau de versatilidade, uma vez que age sobre os componentes que produzem cores vivas durante a oxidação e promove grande variedade de reações de biodegradação (LING & LUND, 1978).

Quando é submetida a um processo de inativação incompleto ou reversível, a POD apresenta regeneração com alterações apenas em suas estruturas secundária e terciária (WHITAKER, 1972), sendo que o grau de regeneração pode variar dependendo do método de determinação da atividade, da severidade do tratamento térmico combinado com o tempo de processo ou das condições de estocagem antes da regeneração (REED, 1975).

Além de serem enzimas reconhecidas por sua termoestabilidade e responsáveis por alterações indesejáveis das características originais de produtos vegetais, a POD e a PPO são também capazes de conservar atividade sob os processos de refrigeração e congelamento convencionais (SCHMIDT, 2009) e, portanto, são indicadoras da degradação da polpa de açaí quanto à perda de cor, sabor, textura e de componentes nutricionais (ROGEZ, 2000; SCHMIDT, 2009).

Cunha et al. (2005) indicaram, no abacate, que 60°C pode ser considerada como uma temperatura ótima para a inativação de praticamente 100% da POD entre 10 e 15 minutos.

Menezes et al. (2008) estudaram a sua inativação na polpa de açaí pelo processamento de alta pressão hidrostática (APH) e concluíram que a temperatura de 35°C, associada à pressão hidrostática, reduziu cerca de 50% a atividade enzimática da PPO.

Além disso, nos alimentos ácidos, como é o caso das frutas tropicais, a flora microbiana deterioradora é constituída de bactérias não esporuladas, bolores e leveduras, que apresentam resistência térmica menor que as enzimas termorresistentes (CUNHA et al., 2005).

Dessa forma, um processo térmico baseado na destruição apenas desses micro-organismos pode resultar em uma alta percentagem de atividade enzimática remanescente, ocasionando a deterioração do produto (CUNHA et al., 2005). Assim, um processamento eficaz aplicado à indústria de alimentos deverá considerar o conjunto de micro-organismos alvo de eliminação, bem como a temperatura e o tempo necessários à inativação enzimática.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinação da temperatura e do tempo mínimos necessários à morte ou inativação do *Trypanosoma cruzi* em polpa *in natura* de açaí, ao atender uma necessidade de órgãos governamentais como o Ministério da Saúde (MS), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, de modo a contribuir à recomendação sobre o consumo e a comercialização segura desse alimento.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinação da virulência dos *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M, submetidos a tratamentos térmicos entre 37°C e 49°C, por períodos de incubação de até uma hora *in vitro*, seguido de ensaios *in vivo*, via intraperitonal, em camundongos imunodeficientes C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib;
- Determinação da temperatura e do tempo de morte ou inativação do *T. cruzi* em polpa *in natura* de açaí, com as misturas submetidas a tratamentos térmicos entre 37°C e 49°C, por períodos de incubação de até uma hora *in vitro*, seguido de ensaios *in vivo*, via intraperitonal, em camundongos imunodeficientes C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib;
- Comparação da eficiência e da viabilidade do uso de duas metodologias com diferentes volumes para o estudo da morte ou inativação do *T. cruzi* em polpa *in natura* de açaí;
- Avaliação da eficiência da cocção da polpa *in natura* de açaí para a prevenção da transmissão alimentar da DCA.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizadas formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, mantidas *in vivo* em camundongos isogênicos imunocompetentes CBA/J Unib, em unidades microisoladoras, do Centro Multidisciplinar para a Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (Cemib/Unicamp).

3.2. O modelo animal

As infecções experimentais foram realizadas em camundongos isogênicos imunodeficientes da linhagem C.B-17-*Prkdc^{scid}*/PasUnib (*Scid*), provenientes de colônias do Cemib/Unicamp, machos e fêmeas, entre oito e 12 semanas de idade, com peso médio de 30g.

Foram utilizados até 12 animais por grupo experimental, com aumento do “n” em grupos críticos.

Todos os procedimentos que utilizaram animais obedeceram à Lei 11.794 (2008), de acordo com protocolo experimental nº 2180-1 submetido à Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA/Unicamp) e aprovado em 30 de Junho de 2010 (Anexo 9.1).

3.3. A polpa de açaí

Polpa *in natura* de açaí média ou regular (11% a 14% de sólidos - tipo B) (BEZERRA, 2007) foi adquirida do comércio local de Belém (PA), mantida em freezer a -20°C, descongelada no momento do uso à temperatura ambiente e distribuída em alíquotas de 50mL em câmara de fluxo laminar.

3.4. O inóculo

Abaixo estão descritas a composição dos inóculos utilizados para os testes de inativação térmica do *T. cruzi*:

3.4.1. Controle negativo

Alíquotas contendo solução de NaCl 0,15M foram submetidas a temperaturas entre 37°C e 49°C durante 10, 20, 30 minutos ou por até uma hora, sob homogeneização constante e, em seguida, o volume total ou parcial foi utilizado para as infecções experimentais.

3.4.2. Controle positivo

Alíquotas contendo solução de NaCl 0,15M com 10^5 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram submetidas a temperaturas entre 37°C e 49°C durante 10, 20, 30 minutos ou por até uma hora, sob homogeneização constante, e em seguida, o volume total ou parcial foi utilizado para as infecções experimentais.

3.4.3. Grupos teste

Alíquotas contendo polpa *in natura* de açaí e 10^5 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram submetidas a temperaturas entre 37°C e 49°C durante 10, 20, 30 minutos ou por até uma hora, sob homogeneização constante, e, em seguida ao processo de tamisação forçada (PASSOS et al., 2012) o volume total ou parcial foi utilizado para as infecções experimentais.

3.5. Procedimentos experimentais

3.5.1. Antibioticoterapia

Os animais receberam um tratamento preventivo com cefalexina 500mg na dose de 1,75mg de antibiótico/dia (PASSOS et al., 2012), considerando o peso médio de cada animal (30g), a ingestão média de água de 15mL/100g de peso-animal/dia para camundongos (MEZADRI et al., 2004) e o volume do bebedouro (200mL), a fim de eliminar possíveis fatores de interferência bacteriana em um modelo animal imunodeficiente durante a experimentação,

dado o alto grau de contaminação sanitária da polpa *in natura* de açaí (ROGEZ, 2000).

Cada dose foi administrada pela via i.p. (dois dias antes da infecção experimental), gavagem (um dia antes da infecção) e pela via oral, diretamente na água do bebedouro (no dia da infecção e por sete dias consecutivos).

3.5.2. Sistema *in vitro* para contaminação experimental da polpa de açaí e inativação térmica do *T. cruzi* (metodologia A)

Na metodologia A, os ensaios de inativação térmica do *T. cruzi* foram realizados dentro de um banho ultratermostático de alta precisão, utilizando-se um balão de vidro artesanal com três aberturas ou “bocas” superiores, com capacidade total para 1L de solução (Figura 1).



Figura 1. Balão de vidro artesanal com três aberturas superiores adaptado dentro de um banho ultratermostático de alta precisão.

Na abertura ou “boca” central foi inserido um agitador mecânico, cuja haste de 35cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro permitiu a homogeneização constante e total da solução de NaCl 0,15M ou da polpa de açaí com os parasitos, por meio de uma pá de 5cm de diâmetro, a 240rpm. Na abertura ou “boca” da direita, o sensor de um termômetro digital, com precisão decimal e calibrado de acordo com os padrões propostos pelo Inmetro (2010), indicou diretamente a temperatura da amostra, desconsiderando as perdas de

calor entre o vidro do balão e a amostra, em relação à temperatura do sistema. A abertura ou “boca” da esquerda permitiu a adição do inóculo e retirada de amostras periodicamente (STUMBO, 1973), de acordo com a figura 2.



Figura 2. Sistema *in vitro* adaptado para o estudo da inativação térmica de *T. cruzi*.

Os testes iniciais utilizaram 10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* adicionadas a 20mL de solução estéril de NaCl 0,15M, considerado um volume mínimo necessário para garantir a homogeneização da amostra pela rotação contínua da pá do agitador mecânico no interior do balão de vidro. Posteriormente, houve a substituição da solução de NaCl 0,15M pela mesma quantidade de polpa *in natura* de açaí e após a estabilização da temperatura em contato com a solução ou a mistura, o tempo de incubação foi aplicado às amostras.

Ao final de cada intervalo de tempo, alíquotas de até 1mL foram retiradas do balão de vidro artesanal, imediatamente resfriadas em banho de gelo, submetidas à tamisação forçada quando apresentavam polpa de açaí (PASSOS et al., 2012) e utilizadas em sua totalidade para a infecção dos camundongos pela via intraperitoneal, sendo aplicado o volume de 200 μ L por animal.

3.5.3. Sistema *in vitro* para contaminação experimental da polpa de açaí e inativação térmica do *T. cruzi* (metodologia B)

Os experimentos foram realizados de maneira semelhante à metodologia A, porém em substituição ao balão de vidro artesanal utilizou-se um tubo de polisulfona, com capacidade total para apenas 50mL de solução, dentro de um banho ultratermostático de alta precisão.

Na única abertura superior foi inserido um agitador mecânico, cuja haste de 30cm de comprimento e 0,2cm de diâmetro permitiu a homogeneização constante e total da mistura contaminada com o parasito, por meio de uma pá de 2cm de diâmetro, a 240rpm, ao mesmo tempo que a abertura permitiu a adição do inóculo e retirada de amostras. Na lateral inferior do tubo, foi conectado o sensor de um termômetro digital, com precisão decimal e calibrado de acordo com os padrões propostos pelo Inmetro (2010), para indicar a temperatura da solução, desconsiderando as perdas de calor entre o tubo e as amostras, em relação à temperatura do sistema (Figuras 3 e 4).



Figura 3. Sistema *in vitro* adaptado para comparações de metodologias no estudo da inativação térmica de *T. cruzi*.

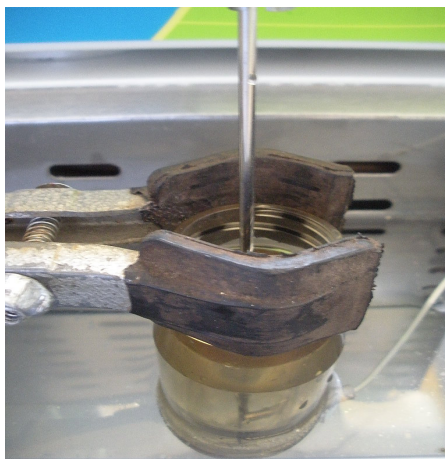


Figura 4. Detalhe do tubo de polisulfona com única abertura superior adaptado dentro de um banho ultratermostático de alta precisão.

A partir da definição dos tempos e das temperaturas mais relevantes estabelecidos pela metodologia A, 10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* foram adicionadas a 10mL de solução estéril de NaCl 0,15M, um volume mínimo necessário para garantir a homogeneização da amostra pela rotação contínua da pá do agitador mecânico no interior do tubo de polisulfona. Posteriormente, houve a substituição da solução de NaCl 0,15M pela mesma quantidade de polpa *in natura* de açaí contaminada e após a estabilização da temperatura em contato com as misturas, o tempo de incubação foi aplicado às amostras.

Da mesma maneira, ao final de cada intervalo de tempo, alíquotas de até 1mL foram retiradas do tubo, imediatamente resfriadas em banho de gelo, submetidas à tamisação forçada quando apresentavam polpa de açaí (PASSOS et al., 2012) e utilizadas em sua totalidade para a infecção dos camundongos pela via intraperitoneal, sendo aplicado o volume de 200 μ L por animal.

3.5.4. Separação do *Trypanosoma cruzi* da polpa *in natura* de açaí

A separação entre os parasitos e grande parte da matéria orgânica presente na polpa *in natura* de açaí foi feita por meio da tamisação forçada ou sob pressão do êmbolo, uma técnica de filtração descrita por Labello Barbosa

et al. (2012) e Passos et al. (2012) e utilizada de maneira eficiente em estudos anteriores e relacionados.

3.5.5. Manutenção dos animais

A integridade sanitária e genética dos camundongos foi preservada por meio de sua criação em condições controladas, utilizando-se mini-isoladores dentro de uma *rack* ventilada.

Os animais receberam ração autoclavada e água *ad libitum*, foram mantidos em salas a 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), com períodos de luz de 12 a 14 horas por dia (SANTOS, 2002; ONG & RODRIGUES, 2013) e umidade relativa (UR) entre 45 e 65%, de acordo com os padrões internacionais (MERUSSE & LAPICHIK, 1996; ONG & RODRIGUES, 2013).

Após as infecções experimentais, todos os animais foram mantidos em mini-isoladores e manipulados em área experimental com indicação de biossegurança nível 2. Os animais mortos e infectados foram separados em sacos plásticos específicos para descarte de carcaças infectadas, autoclavados (ARAÚJO-JORGE & PIRMEZ, 2000) e o seu destino final seguiu as normas de serviço especializado e terceirizado.

3.5.6. Parasitemia e mortalidade

O número de parasitos na fase aguda da doença de Chagas foi determinado a partir da contagem de tripomastigotas presentes em amostras de cinco μL de sangue, por meio de pequena secção na ponta da cauda dos camundongos, segundo metodologia descrita por Brener (1962), em dias após a infecção (d.a.i.), a partir da data da constatação da infecção experimental.

Todos os animais foram observados por até 60 dias e a mortalidade foi registrada diariamente.

3.6. Análise estatística

Os resultados dos experimentos *in vivo* foram submetidos a análises de média e desvio padrão considerando a constatação da infecção experimental e a data da mortalidade dos animais, em dias após a infecção (d.a.i.).

A análise estatística foi realizada pelo *software Statistical Analysis System* (SAS) para *Windows®*, utilizando ANOVA um ou dois fatores, procedimento *GLM* (*Global Linear Model*) pelo teste de Comparações Múltiplas *a posteriori* de *Duncan*, com a taxa global de erro (α) de 0,05.

4. RESULTADOS

Abaixo se encontram os resultados obtidos com os ensaios *in vitro* e *in vivo*, considerando ambas as metodologias utilizadas:

4.1. Análises da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M e em polpa *in natura* de açaí de acordo com o método A

Tabela 1. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com solução de NaCl 0,15M mantida a 37°C (±0,1°C), 43°C (±0,1°C), 44°C (±0,1°C), 45°C (±0,1°C) e 49°C (±0,1°C) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

| Temperaturas (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|--------------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 37 (±0,1) a 49 (±0,1) | 10 | 0 / 1 | 0 | Negativo | Não |
| | 20 | 0 / 1 | 0 | Negativo | Não |
| | 30 | 0 / 1 | 0 | Negativo | Não |
| | 60 | 0 / 1 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Não houve constatação da DCA e morte nos animais que receberam solução de NaCl 0,15M (controle negativo), submetidos a tratamentos térmicos entre 37°C(±0,1°C) e 49°C(±0,1°C), por até 60 minutos de incubação (Tabela 1).

Tabela 2. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 37°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 39°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 41°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

| Temperaturas (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|----------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 37 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 2 | 100 | 7,0 \pm 1,0 | 17,0 \pm 3,0 |
| | 20 | 2 / 2 | 100 | 6,0 \pm 0,0 | 17,0 \pm 3,0 |
| | 30 | 2 / 2 | 100 | 7,0 \pm 1,0 | 17,0 \pm 2,0 |
| | 60 | 2 / 2 | 100 | 7,0 \pm 1,0 | 17,0 \pm 2,0 |
| 39 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 2 | 100 | 6,0 \pm 0,0 | 17,0 \pm 1,0 |
| | 20 | 2 / 2 | 100 | 6,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 |
| | 30 | 2 / 2 | 100 | 6,0 \pm 0,0 | 15,0 \pm 2,0 |
| | 60 | 2 / 2 | 100 | 7,0 \pm 0,0 | 18,0 \pm 0,0 |
| 41 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 2 | 100 | 6,0 \pm 0,0 | 17,0 \pm 1,0 |
| | 20 | 2 / 2 | 100 | 6,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 |
| | 30 | 2 / 2 | 100 | 7,0 \pm 1,0 | 17,0 \pm 1,0 |
| | 60 | 2 / 2 | 100 | 7,0 \pm 0,0 | 17,0 \pm 1,0 |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M (controle positivo), para os tratamentos térmicos entre 37°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 41°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 100% dos animais apresentaram DCA entre o 6º e o 8º dia após as infecções experimentais e morte entre o 13º e o 18º dia após as infecções experimentais, independentemente do período de incubação (Tabela 2).

Tabela 3. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

| Temperatura ($^\circ\text{C}$) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|-------------------------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 43 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 2 | 100 | 7,0 \pm 1,0 | 16,0 \pm 1,0 |
| | 20 | 2 / 2 | 100 | 7,0 \pm 1,0 | 17,0 \pm 0,0 |
| | 30 | 1 / 2 | 50 | 9,0 \pm 0,0 | 17,0 \pm 0,0 |
| | 60 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M (controle positivo), para o tratamento térmico de 43°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), por até 20 minutos de incubação, 100% dos animais apresentaram DCA entre o 6º e o 8º dia após as infecções experimentais e morte entre o 15º e o 17º dia após as infecções experimentais. Contudo, para o período de incubação de 30 minutos, 50% dos animais apresentaram DCA no 9º dia após as infecções experimentais e morte no 17º dia após as infecções experimentais. Após 60 minutos, não houve constatação da DCA e morte nos animais após as infecções experimentais (Tabela 3).

Tabela 4. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 43,3°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 43,5°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

| Temperaturas (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|----------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 43,3 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 4 | 50 | 7,0 \pm 0,0 | 18,0 \pm 1,0 |
| | 20 | 2 / 4 | 50 | 7,0 \pm 1,0 | 19,0 \pm 1,0 |
| | 30 | 2 / 4 | 50 | 9,0 \pm 1,0 | 18,0 \pm 1,0 |
| 43,5 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 4 | 50 | 7,0 \pm 1,0 | 18,0 \pm 1,0 |
| | 20 | 2 / 4 | 50 | 7,0 \pm 1,0 | 18,0 \pm 1,0 |
| | 30 | 2 / 4 | 50 | 10,0 \pm 1,0 | 19,0 \pm 0,0 |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M (controle positivo), para os tratamentos térmicos de 43,3°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 43,5°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), por até 30 minutos de incubação, 50% dos animais apresentaram DCA entre o 6º e o 11º dia após as infecções experimentais e morte entre o 17º e o 20º dia após as infecções experimentais (Tabela 4).

Tabela 5. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

| Temperatura (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|---------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 44 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 2 | 100 | 8,0 \pm 0,0 | 17,0 \pm 1,0 |
| | 20 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 30 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M (controle positivo), para o tratamento térmico de 44°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), durante 10 minutos de incubação, 100% dos animais apresentaram DCA no 8º dia após as infecções experimentais e morte entre o 16º e o 18º dia após as infecções experimentais. Contudo, para os períodos de incubação de 20 e 30 minutos não houve constatação da DCA e morte nos animais após as infecções experimentais (Tabela 5).

Tabela 6. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 44,5°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

| Temperatura ($^\circ\text{C}$) | Tempo (min.) | Nº infectados / Nº inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|-------------------------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 44,5 ($\pm 0,1$) | 10 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 20 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 30 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M (controle positivo), para o tratamento térmico de 44,5°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), por até 30 minutos de incubação, não houve constatação da DCA e morte nos animais após as infecções experimentais (Tabela 6).

Tabela 7. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 45°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 47°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 49°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

| Temperaturas (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|--|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 45 ($\pm 0,1$) a 49 ($\pm 0,1$) | 10 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 20 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 30 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 60 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M (controle positivo), para os tratamentos térmicos entre 45°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 49°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), por até 60 minutos de incubação, não houve constatação da DCA e morte nos animais após as infecções experimentais (Tabela 7).

Após a realização dos ensaios *in vivo* visando a inativação térmica do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M sob diversas temperaturas (controle positivo), foram definidos os períodos de incubação e temperaturas a que foram submetidas as alíquotas de polpa de açaí contaminadas com o parasito (grupos teste). Os resultados correspondentes encontram-se indicados nas tabelas abaixo:

Tabela 8. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* recuperadas da mistura com polpa de açaí mantida a 37°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 39°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 41°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

| Temperaturas (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|----------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 37 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 2 | 100 | 14,0 \pm 1,0 | 24,0 \pm 1,0 |
| | 20 | 2 / 2 | 100 | 14,0 \pm 1,0 | 23,0 \pm 0,0 |
| | 30 | 2 / 2 | 100 | 13,0 \pm 1,0 | 22,0 \pm 0,0 |
| | 60 | 2 / 2 | 100 | 11,0 \pm 1,0 | 20,0 \pm 1,0 |
| 39 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 2 | 100 | 14,0 \pm 1,0 | 24,0 \pm 1,0 |
| | 20 | 2 / 2 | 100 | 14,0 \pm 1,0 | 23,0 \pm 0,0 |
| | 30 | 2 / 2 | 100 | 12,0 \pm 1,0 | 21,0 \pm 0,0 |
| | 60 | 2 / 2 | 100 | 10,0 \pm 1,0 | 20,0 \pm 1,0 |
| 41 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 2 | 100 | 14,0 \pm 1,0 | 24,0 \pm 1,0 |
| | 20 | 2 / 2 | 100 | 14,0 \pm 1,0 | 23,0 \pm 0,0 |
| | 30 | 2 / 2 | 100 | 11,0 \pm 1,0 | 20,0 \pm 0,0 |
| | 60 | 2 / 2 | 100 | 11,0 \pm 1,0 | 21,0 \pm 1,0 |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em polpa de açaí (grupos teste), para os tratamentos térmicos entre 37°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 41°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 100% dos animais apresentaram DCA entre o 9º e o 15º dia após as infecções experimentais e morte entre o 19º e o 25º dia após as infecções experimentais, após o período de incubação de até 60 minutos (Tabela 8).

Tabela 9. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* recuperadas da mistura com polpa de açaí mantida a 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

| Temperatura (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|---------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 43 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 2 | 100 | 13,0 \pm 1,0 | 23,0 \pm 1,0 |
| | 20 | 2 / 2 | 100 | 12,0 \pm 1,0 | 23,0 \pm 1,0 |
| | 30 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 60 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em polpa de açaí (grupos teste), para o tratamento térmico de 43°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), em até 20 minutos de incubação, 100% dos animais apresentaram DCA entre o 11º e o 14º dia após as infecções experimentais e morte entre o 22º e o 24º dia após as infecções experimentais. Contudo, para os períodos de incubação de 30 e 60 minutos não houve constatação da DCA e morte nos animais após as infecções experimentais (Tabela 9).

Tabela 10. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* recuperadas da mistura com polpa de açaí mantida a 43,3°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 43,5°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 44,5°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

| Temperaturas (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|--|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 43,3 ($\pm 0,1$) a 44,5 ($\pm 0,1$) | 10 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 20 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 30 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em polpa de açaí (grupos teste), para os tratamentos térmicos entre 43,3°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 44,5°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), por até 30 minutos de incubação, não houve constatação da DCA e morte nos animais após as infecções experimentais (Tabela 10).

Tabela 11. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* recuperadas da mistura com polpa de açaí mantida a 45°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

| Temperatura (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|---------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 45 ($\pm 0,1$) | 10 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 20 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 30 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| | 60 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em polpa de açaí (grupos teste), para o tratamento térmico de 45°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), por até 60 minutos de incubação, não houve constatação da DCA e morte nos animais após as infecções experimentais (Tabela 11).

4.2. Análises da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M e em polpa *in natura* de açaí de acordo com o método B

Tabela 12. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com solução de NaCl 0,15M mantida a 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 60 minutos.

| Temperaturas (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|--|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 43 ($\pm 0,1$) e 44 ($\pm 0,1$) | 10 | 0 / 1 | 0 | Negativo | Não |
| | 20 | 0 / 1 | 0 | Negativo | Não |
| | 30 | 0 / 1 | 0 | Negativo | Não |
| | 60 | 0 / 1 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Não houve constatação da DCA e morte nos animais que receberam solução de NaCl 0,15M (controle negativo), submetidos a tratamentos térmicos entre 43°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e 44°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), por até 60 minutos de incubação (Tabela 12).

Tabela 13. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M mantida a 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

| Temperatura (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|---------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 44 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 2 | 100 | 8,0 \pm 1,0 | 16,0 \pm 1,0 |
| 44 ($\pm 0,1$) | 20 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| 44 ($\pm 0,1$) | 30 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M (controle positivo), para o tratamento térmico de 44°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), em até 10 minutos de incubação, 100% dos animais apresentaram DCA entre o 7º e o 9º dia após as infecções experimentais e morte entre o 15º e o 17º dia após as infecções experimentais. Contudo, para os períodos de incubação de 20 e 30 minutos não houve constatação da DCA e morte nos animais após as infecções experimentais (Tabela 13).

Tabela 14. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* recuperadas da mistura com polpa de açaí mantida a 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 a 30 minutos.

| Temperatura (°C) | Tempo (min.) | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|---------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 43 ($\pm 0,1$) | 10 | 2 / 2 | 100 | 12,0 \pm 1,0 | 22,0 \pm 1,0 |
| 43 ($\pm 0,1$) | 20 | 2 / 2 | 100 | 13,0 \pm 1,0 | 23,0 \pm 0,0 |
| 43 ($\pm 0,1$) | 30 | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em polpa de açaí (grupos teste), para o tratamento térmico de 43°C($\pm 0,1^\circ\text{C}$), em até 20 minutos de incubação, 100% dos animais apresentaram DCA entre o 11º e o 14º dia após as infecções experimentais e morte entre o 21º e o 23º dia após as infecções experimentais. Contudo, para os períodos de incubação de 30 minutos não houve constatação da DCA e morte nos animais após as infecções experimentais (Tabela 14).

4.3. Comparação da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M e em polpa *in natura* de açaí entre ambas metodologias

Tabela 15. Quadro comparativo em relação à constatação da DCA e mortalidade em camundongos C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib infectados, pela via intraperitoneal, com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M ou recuperadas da mistura com polpa de açaí mantidas a 43°C e 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por períodos de incubação de 10 e 20 minutos, utilizando-se duas metodologias diferentes. Dados seguidos de letras minúsculas distintas entre parênteses apresentam diferença significativa (teste de Duncan, 95% de confiança).

| Método | Inóculo | Temperatura (°C) | Tempo (min.) | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|------------------|----------------------|---------------------|-----------------|--------------------------------------|-------------------------|
| A ^(a) | Controle negativo | 43 ($\pm 0,1$) | 10 | Negativo | Não |
| | | 43 ($\pm 0,1$) | 20 | Negativo | Não |
| | | 44 ($\pm 0,1$) | 10 | Negativo | Não |
| | Controle positivo | 44 ($\pm 0,1$) | 10 | 8,0 \pm 0,0 ^(b) | 17,0 \pm 1,0 |
| | Grupo teste | 43 ($\pm 0,1$) | 10 | 13,0 \pm 1,0 ^(c) | 23,0 \pm 1,0 |
| | | 43 ($\pm 0,1$) | 20 | 12,0 \pm 1,0 ^(c) | 23,0 \pm 1,0 |
| B ^(a) | Controle negativo | 43 ($\pm 0,1$) | 10 | Negativo | Não |
| | | 43 ($\pm 0,1$) | 20 | Negativo | Não |
| | | 44 ($\pm 0,1$) | 10 | Negativo | Não |
| | Controle positivo | 44 ($\pm 0,1$) | 10 | 8,0 \pm 1,0 ^(b) | 16,0 \pm 1,0 |
| | Grupo teste | 43 ($\pm 0,1$) | 10 | 12,0 \pm 1,0 ^(c) | 22,0 \pm 1,0 |
| | | 43 ($\pm 0,1$) | 20 | 13,0 \pm 1,0 ^(c) | 23,0 \pm 0,0 |

* doença de Chagas aguda ** dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* em solução de NaCl 0,15M e em polpa de açaí, para os períodos de incubação testados, não houve diferença significativa na constatação da DCA para ambas as metodologias utilizadas (Tabela 15).

5. DISCUSSÃO

Dada a relevância sócio-econômica da polpa de açaí para a região amazônica brasileira e no cenário internacional atual, tornou-se importante a determinação do binômio “temperatura x tempo” preciso, capaz de matar ou inativar o *T. cruzi* na polpa *in natura* de açaí, pela análise de virulência.

Os resultados relativos à parasitemia e mortalidade aqui apresentados foram obtidos por meio da administração do inóculo pela via intraperitoneal em camundongos imunodeficientes.

Com relação à medida da temperatura, foi utilizada calibração do termômetro de acordo com parâmetros estabelecidos pelo Inmetro (2010) e considerada a oscilação $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, em decorrência da necessidade da precisão da temperatura no período experimental. O uso de um termômetro diretamente em contato com a amostra em homogeneização constante foi importante porque permitiu desconsiderar as perdas de calor existente entre o balão de vidro e o aquecimento pelo banho ultratermostático, estabelecendo a leitura da temperatura correta da amostra durante todo o processo.

Os camundongos isogênicos imunodeficientes C.B-17-*Prkdc*^{scid}/Pas Unib (*Scid*) apresentam uma mutação pontual recessiva do gene *Prkdc* localizado no cromossomo 16, que os torna deficientes em linfócitos T e B funcionais (BOSMA et al., 1983; BOWLING, 1996; REED & BAYEY, 1998) e que por isso não controlam a infecção parasitária, sendo indispensáveis à detecção de quantidades mínimas de parasitos com virulência preservada, além de já terem sido utilizados anteriormente (ALVES, 1998; LABELLO BARBOSA et al., 2012).

Para isso, a via intraperitoneal se mostrou a mais sensível e eficiente para a detecção da virulência (ALVES, 1998; LABELLO BARBOSA et al., 2012), embora a via oral em temperaturas de aquecimento da polpa de açaí será uma importante fonte de considerações inovadoras.

Baseando-se na relação dose-dependência para a transmissão oral da doença de Chagas e sabendo-se da sua eficiência com 10^5 formas do parasito (DIAZ-UNGRÍA et al., 1968), essa mesma quantidade de *T. cruzi* foi adicionada ao volume total da solução de NaCl 0,15M e da polpa *in natura* de açaí.

Para o tratamento térmico de $43^{\circ}\text{C}(\pm 0,1^{\circ}\text{C})$, por até 20 minutos de incubação, 100% dos animais apresentaram DCA e morte, porém para o período de incubação de 30 minutos, 50% dos animais apresentaram DCA e morte e após 60 minutos, não houve constatação da DCA e morte nos animais

(Tabela 3). Esses resultados foram determinantes para prosseguir os experimentos em temperaturas superiores, excluindo-se o período de incubação de 60 minutos, pois essa faixa de tempo não permitiu sobrevivência ao parasito. Nossa estratégia considerou a relação do binômio “temperatura x tempo” e não apenas descartou esse período de tempo de maneira isolada.

Para os tratamentos térmicos de $43,3^{\circ}\text{C}(\pm 0,1^{\circ}\text{C})$ e $43,5^{\circ}\text{C}(\pm 0,1^{\circ}\text{C})$, por até 30 minutos de incubação, 50% dos animais apresentaram DCA e morte (Tabela 4). Nesse caso, apenas metade dos hospedeiros entrou, de fato, em contato com o parasito, a partir do produto inoculado durante as infecções experimentais, ao considerarmos a imunodeficiência dos hospedeiros.

Para o tratamento térmico de $44^{\circ}\text{C}(\pm 0,1^{\circ}\text{C})$, durante 10 minutos de incubação, 100% dos animais apresentaram DCA ($8,0 \pm 0,0$) e morte ($17,0 \pm 1,0$), contudo para os períodos de incubação de 20 e 30 minutos não houve constatação da DCA e morte nos animais, bem como para o tratamento térmico de $44,5^{\circ}\text{C}(\pm 0,1^{\circ}\text{C})$, por até 30 minutos de incubação (Tabelas 5 e 6). Embora esses resultados tenham indicado que períodos de incubação superiores a 20 minutos não possam conferir virulência ao parasito, nas referidas temperaturas testadas, em temperaturas superiores os períodos de incubação de até 60 minutos não foram descartados.

Essa medida estabeleceu com precisão o binômio “temperatura x tempo” crítico ao parasito, em relação à faixa de temperatura de cocção dos alimentos considerada eficiente, proposta por Dias (2006) e Dias & Amato Neto (2011), que estaria acima de 45°C .

Dessa maneira, para os tratamentos térmicos entre $45^{\circ}\text{C}(\pm 0,1^{\circ}\text{C})$ e $49^{\circ}\text{C}(\pm 0,1^{\circ}\text{C})$, por até 60 minutos de incubação, não houve constatação da DCA e morte nos animais (Tabela 7).

Os experimentos cujos resultados se apresentaram mais relevantes foram refeitos utilizando uma metodologia adaptada a partir da primeira, de maneira semelhante para estabelecer um padrão de comparação, mas que permitiu manter uma menor quantidade de solução de NaCl 0,15M ou polpa *in natura* de açaí sob homogeneização constante, em diferentes períodos de incubação e temperatura, como também possibilitou, posteriormente, a inoculação do volume total da amostra nos animais.

Resultados idênticos para o tempo e a termorresistência do parasito, tanto em solução de NaCl 0,15M à 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por 10 minutos de incubação, como em polpa *in natura* de açaí à 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por 20 minutos de incubação), permitiram comparar ambas metodologias testadas (Tabela 15), demonstrando a sensibilidade das técnicas e que não houve diferença significativa entre elas ($p < 0,05$).

Dessa maneira, o volume do inóculo em relação ao volume parcial ou total da amostra não interferiu na capacidade de obter parasitos com virulência preservada, obtidos de maneira aleatória durante a coleta das alíquotas, fato que poderá contribuir futuramente para a extrapolação em análises que utilizarem grandes quantidades de polpa de açaí contaminada com *T. cruzi*.

No entanto, até o momento, não seria apropriado fazer uma análise estatística da preservação da virulência dos parasitos na constatação da DCA em função das temperaturas de incubação e dos diferentes períodos de tempos apenas. Embora o volume do inóculo administrado a cada animal e a dose de parasitos presentes na contaminação experimental do alimento sejam conhecidos, a dose de parasitos presentes em cada inóculo, a partir da coleta das alíquotas, ainda que sob homogeneização constante, constituiu-se, naquele momento, uma variável não controlada e seus efeitos devem ser considerados na evolução da DCA nos hospedeiros.

Por essas razões, o método B estabeleceu comparação em relação ao método A por considerar a necessidade da infecção experimental em camundongos isogênicos imunodeficientes com a amostra total do alimento contaminado. Essa estratégia permitiu assegurar que a totalidade das formas tripomastigotas presentes na contaminação experimental foi, de fato, inoculada em pelo menos um camundongo do grupo. Assim, essa metodologia permitiu avaliar, seguramente, a virulência do *T. cruzi*.

Somado a isso, possivelmente, uma dose inferior à 10^5 formas do parasito foram inoculadas a cada animal mas que ainda assim permitiu a ocorrência da DCA *in vivo* com doses menores de parasitos virulentos.

Esse fato pode ajudar a explicar o caráter esporádico e circunstancial (ANVISA, 2008) ou aleatório e inesperado (DIAS & AMATO NETO, 2011) da transmissão oral da doença de Chagas em seres humanos. Além disso, as diferenças naturais existentes entre os hospedeiros, ocasionadas pela

influência do meio, como por exemplo, o peso, o sexo ou o grau de estresse também devem ser considerados durante a avaliação da mortalidade, em d.a.i.

Apesar disso, deve-se considerar que houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os resultados da constatação da DCA, em função do inóculo, dentro de uma mesma metodologia proposta (Tabela 15) e, portanto, pode existir diferença de comportamento do *T. cruzi* em polpa *in natura* de açaí e em solução de NaCl 0,15M para a faixa de temperatura e tempo limites, sendo 43°C e 44°C e 20 e 10 minutos, respectivamente.

Embora exista diferença entre os meios ou veículos testados em um sistema *in vitro*, é necessário ressaltar a importância de utilizar inicialmente a solução de NaCl 0,15M tanto para direcionar quais seriam os períodos de tempo e temperatura a serem testados, como também como controle negativo.

Tratou-se de uma estratégia a fim de facilitar o estudo posterior sobre o comportamento do parasito em uma matriz alimentícia que é de difícil manipulação, mas principalmente porque considerando-se que a polpa *in natura* de açaí utilizada foi produzida na cidade de Belém (PA), embora de procedência nunca antes vinculada a microepidemias de origem alimentar e atestada pelo serviço de vigilância sanitária local, na ocasião da compra, em 2009, não havia sua certificação, de fato, quanto à ausência do *T. cruzi*.

Sabendo que o *T. cruzi* possui uma resistência térmica definida e notadas as diferenças de termorresistência em diferentes meios em sistemas *in vitro*, a comparação do comportamento do parasito em um sistema *in vivo* também se faz necessária, pois resultados distintos em diferentes temperaturas limite com relação à virulência poderiam ser obtidos.

O *T. cruzi* é um parasito isotônico com o meio interno de mamíferos e triatomíneos vetores, capaz de sobreviver de maneira ideal entre 24°C e 28°C, correspondente à temperatura do inseto e culturas artificiais e também entre 36°C e 37°C, no organismo de mamíferos parasitados em fase aguda ou crônica (DIAS, 2006).

As aves, especialmente *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758), que fazem parte do peridomicílio em zonas rurais e cujo sangue geralmente serve de alimento aos triatomíneos, são refratárias ao *T. cruzi*. Acreditou-se que uma das hipóteses seria a temperatura corpórea elevada e variável, superior à dos mamíferos. Todavia, sabe-se que a temperatura corporal de aves adultas oscila

entre 41°C e 42°C e que o fenômeno refratário é devido ao parasito possuir uma proteína formada a partir do kDNA mitocondrial, de pouca ou nenhuma interação com macrófagos de aves (GRYNBERG et al., 1974; AQUINO, 2008). Sendo assim, a faixa de termorresistência proposta no presente trabalho é coerente, mas ao se comparar a virulência do parasito em sistemas *in vitro* e *in vivo*, é imprescindível considerar o metabolismo em seu conjunto e também as altas temperaturas do ambiente na região amazônica.

No caso da inativação térmica do *T. cruzi* em alimentos, os resultados dos testes *in vivo* obtidos estão de acordo com o proposto por Dias (2006) e Dias & Amato Neto (2011), ao afirmarem que a cocção de alimentos acima de 45°C é capaz de impedir a transmissão alimentar da DCA.

Entretanto, nossos resultados apresentaram uma temperatura precisa (até 43°C), um período de incubação definido (durante 20 minutos) e, além disso, são válidos para a morte ou a inativação do parasito em um alimento contaminado específico, a polpa *in natura* de açaí.

Sob o ponto de vista tecnológico, qualquer tratamento térmico em condições de alta umidade, que atinja 45°C, pode eliminar o *T. cruzi*. Essas temperaturas estão muito abaixo daquelas necessárias para eliminar outros micro-organismos vinculados à saúde pública e à higiene na manipulação de alimentos, tais como *E. coli* e *Salmonella* sp., que são destruídos em tratamentos térmicos em torno de 65°C (STUMBO, 1973; PFLUG, 1999) ou para inativar enzimas oxidativas da polpa de açaí, cujos binômios temperatura/tempo estão na faixa de 80°C por 20 minutos a 90°C por 5 minutos, de acordo com Schmidt et al. (dados não publicados).

Os resultados obtidos não permitiram uma regressão dos dados para cálculo de valores de resistência térmica com precisão, porém, a morte térmica dos *T. cruzi* mostrou-se extremamente dependente da temperatura. Isso significa que esses protozoários são muito suscetíveis a pequenos incrementos de temperatura, principalmente a partir de 43°C. Assim, uma pequena variação de temperatura, a partir de 43°C, causa uma diminuição drástica na resistência térmica do parasito.

Essa temperatura limite para a sobrevivência do *T. cruzi* pode contribuir para a explicação da complexidade da ocorrência ou não de microepidemias na região amazônica. A possibilidade da ocorrência de uma temperatura ambiente

acima dos 43°C no Estado do Pará (INPE, 2014) pode inviabilizar naturalmente o *T. cruzi* presente em cestos (paneiros) com frutos de açaí ou quando máquinas utilizadas para a produção artesanal ou mesmo a polpa de açaí pronta são expostos à energia solar ou a ambientes com essa temperatura, por exemplo. Do mesmo modo, temperaturas ambiente elevadas nessa região (INPE, 2014), mas inferiores a 43°C, permitem a sobrevivência e a manutenção da virulência do parasito em questão.

Sabe-se que no Estado do Pará, o segundo semestre é o período do ano que, historicamente, apresenta o maior número de notificações de DCA, corresponde à safra do açaí (ROGEZ & AGUIAR, 2012) e, principalmente, entre os meses de setembro e outubro, ocorre o “verão amazônico”, quente e seco, com dias sucessivos sem precipitação e possibilidades de temperaturas frequentes acima de 40°C. Em setembro de 2014, por exemplo, a temperatura média registrada foi de 37°C com sensações térmicas acima de 40°C (INPE, 2014).

Apesar disso, entende-se que não se pode disseminar a aplicação dessas informações de maneira generalizada, uma vez que a produção artesanal da polpa *in natura* de açaí é muito alta (ROGEZ, 2000) e provavelmente, o produtor artesanal e informal não tem disponível no seu dia-a-dia mecanismos para estabelecer o conjunto dos parâmetros necessários à reprodução doméstica ou comercial desse procedimento, como por exemplo, a manutenção da precisão da temperatura de incubação e a homogeneização constante do volume total do alimento, geralmente grande, durante todo o período, além de não ser comum a produção de um pequeno volume de polpa de açaí, conforme foi testado de maneira experimental.

Portanto, o perigo da transmissão oral com esse alimento ainda é elevado sem o uso de ferramentas e medidas que reproduzam as condições controladas em laboratório, nos casos em que a polpa *in natura* de açaí é submetida a uma temperatura inferior à 43°C ou quando práticas higiênico-sanitárias eficientes não estiverem presentes durante todas as etapas da cadeia produtiva do açaí (OPAS, 2006;2009).

Considerando que o aquecimento a 50°C causa a desnaturação biológica inicial irreversível de proteínas (SEHN, 2009) e é uma temperatura eficaz para a inativação do *T. cruzi*, bem como de outros micro-organismos

patogênicos e toxinas em alimentos e sabendo-se que a polpa de açaí é um alimento de fácil deterioração e contaminação devido à falta de infra-estrutura de saneamento básico (ROGEZ, 2000; CONAB, 2011), é recomendável o uso da pasteurização como processo eficiente de morte ou inativação do *T. cruzi* (OPAS, 2006;2009; PASSOS et al., 2012), como também do conjunto de outros micro-organismos e enzimas responsáveis pela deterioração da polpa de açaí.

Por outro lado, essa medida não tem se mostrado útil na região amazônica, pois o processo de pasteurização é questionável do ponto de vista da manutenção das propriedades funcionais, de suas características físico-químicas e organolépticas, como alteração do sabor, cor, aroma ou textura (CAVALCANTE, 1991; DONADIO et al., 2004; SAGRI, 2011), não sendo, portanto, atrativo comercialmente.

Esse fato não é detectado facilmente nas demais regiões do país, onde o açaí ainda é comumente consumido na forma de polpa congelada, acrescida de xarope de guaraná e/ou frutas, mel, cereais e outros produtos industrializados, denominado *mix* de açaí (NOGUEIRA et al.,1995; OLIVEIRA & MÜLLER, 1998; CONAB, 2010; REVISTA PESQUISA FAPESP, 2013). Portanto, nota-se a nítida modificação da forma cultural do seu consumo local e, dessa maneira, é relevante considerar que o hábito de consumo do açaí na região amazônica difere dos demais Estados brasileiros.

Embora seja complexo transpor paradigmas culturais e alimentares em nossa sociedade, atualmente, o branqueamento dos frutos do açaí para a produção de polpa de açaí sem *T. cruzi* vem sendo realizado em Belém (PA) e tem se mostrado aceitável (SAMPAIO et al., 2013). Todavia, sabendo-se que métodos alternativos para a inativação de *T. cruzi* em polpa de açaí ainda são escassos, obter informações sobre termorresistência e estabelecer uma comparação com o perfil de outros micro-organismos já estudados em alimentos, como sucos de outras frutas, torna-se importante.

Dentro do setor agroindustrial brasileiro, a indústria de sucos de frutas, especialmente a citricultura, é uma das maiores em todo o mundo e o suco de laranja é o seu produto de maior destaque internacional (CORRÊA NETO & FARIA, 1999; MAPA, 2014).

Sabe-se que a deterioração microbiológica do suco de laranja pode ser decorrente de contaminação cruzada durante a manipulação na cadeia

produtiva, seja por utensílios, ferramentas, poeira ou da microbiota natural do fruto e está restrita à presença de micro-organismos tolerantes ao meio ácido (pH entre 2,0 e 4,5), com predomínio de bactérias lácticas, leveduras e fungos. A degradação por leveduras é a causa mais comum da deterioração dos sucos de frutas, entre outros fatores, por apresentarem maior resistência térmica, com temperatura ótima de crescimento na faixa de 20 a 30°C, suportando até temperaturas entre 65°C e 70°C (SHIGEOKA, 1999).

Temperaturas em torno de 90°C, normalmente empregadas no tratamento térmico para a preservação dos sucos, podem não ser suficientes para inativar fungos termorresistentes, sendo que o tratamento com temperaturas ainda mais elevadas afetariam as características físico-químicas dos sucos e, portanto, o controle da sua deterioração se faz por meio da higienização adequada, visando diminuir a possibilidade de contaminação das matérias-primas (SCHMIDT, 1995; CORRÊA NETO & FARIA, 1999).

Além disso, acreditava-se que a característica ácida dos sucos de frutas cítricas (pH 4,5) exercia um efeito letal sobre as células de micro-organismos patogênicos, até ser constatada a sobrevivência de coliformes termotolerantes e outras enterobactérias em sucos de frutas e outros substratos ácidos (PEREIRA & LEITÃO, 1989).

Convém ressaltar que, os resultados do presente estudo foram obtidos utilizando-se solução de NaCl 0,15M, que é um sal forte (pH neutro) e polpa *in natura* de açaí, produzida em Belém, com pH 5 verificado por papel indicador de pH. Esse parâmetro deve ser considerado e é semelhante ao proposto por Rogez (2000), ao afirmar que a polpa de açaí produzida no Pará apresenta pH 5,3.

Resultados diversos podem ser obtidos ao considerar a diferença de pH de diferentes alimentos e a influência que exerce sobre o *T. cruzi* (AÑEZ & CRISANTE, 2008), uma vez que o pH ideal para o parasito está entre 7,2 e 7,3, correspondente ao sangue de mamíferos e ao lúmen do tubo digestório dos triatomíneos, podendo ocorrer morte celular em pH muito ácido ou básico (DIAS, 2006).

Outra fonte importante de deterioração em sucos de frutas é a deterioração enzimática. A fim de se evitar a deterioração enzimática, de acordo com Kimball (1991), o tratamento térmico à temperatura de, no mínimo,

91 °C durante 40 segundos, é suficiente para a inativação enzimática, entre elas, da pectinesterase do suco de laranja.

Para a polpa de açaí, sabe-se que é possível evitar o escurecimento enzimático do produto e ao mesmo tempo manter as suas propriedades sensoriais, entretanto, os dados existentes em relação à temperatura e tempo ideais para sua conservação ainda são limitantes (MENEZES et al., 2008).

Até então, ainda não havia na literatura científica a correlação entre uma temperatura e tempo ótimos para se obter a máxima inativação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase na polpa de açaí e uma temperatura e tempo mínimos necessários à morte ou inativação do *T. cruzi* nesse alimento.

Nesse sentido, pode-se afirmar a necessidade de que estudos de atividade enzimática sejam realizados de forma conjunta ao estudo da detecção e inativação de diversos patógenos em diferentes alimentos.

Corrêa Neto (1998) avaliou o efeito dos tratamentos térmicos a 72°C por 16 segundos e 91°C por 40 segundos sobre as características sensoriais, cores e leveduras, bactérias lácticas e coliformes em suco de laranja. Nas avaliações sensoriais, houve uma tendência à preferência pelo produto submetido ao processo mais brando.

Além disso, a pasteurização do suco de açaí a 90°C durante cinco minutos e a fervura do alimento por um minuto é um método viável, prático, de baixo custo e acessível à população para a eliminação de vários micro-organismos contaminantes desse alimento e possibilita sua conservação sob congelamento a -18°C, por até quatro meses (SOUZA et al., 2006).

O tratamento do alimento à temperatura de pasteurização convencional, embora exigido pelo mercado internacional, ainda encontra resistência dos fabricantes e rejeição dos produtores locais (FREIRE, 2007) para atender à forma habitual de consumo *in natura* pela população da região Norte, mesmo sabendo-se que apenas a etapa de conservação por congelamento não é um método seguro para evitar a transmissão oral do *T. cruzi* (LABELLO BARBOSA et al., 2012; PASSOS et al., 2012).

Segundo Ferreira et al. (2003), o aquecimento do leite materno humano à 63°C em forno de micro-ondas mostra-se um método eficaz para a inativação do *T. cruzi* e de simples execução em ambiente doméstico, porém, sua aplicação na polpa *in natura* de açaí deve considerar tratar-se de alimentos de

origens distintas, o volume do alimento a ser aquecido, o tempo de tratamento térmico, a manutenção das propriedades nutricionais dos alimentos submetidos à 63°C, além da temperatura limite para a virulência do parasito proposta no presente trabalho, que é consideravelmente menor na polpa de açaí.

Assim, entende-se que a exposição da polpa de açaí ao tempo e temperatura ainda mais baixos ou limite aqui considerados para o *T. cruzi*, é possível e constitui-se em um grande desafio, considerando o cenário da produção e comercialização atual (CONAB, 2011; REVISTA PESQUISA FAPESP, 2013), porque possivelmente além de conservar o produto a níveis mais aceitáveis pelo consumidor local, ao utilizar uma temperatura mais branda que a pasteurização convencional (EMBRAPA, 2005) ou o branqueamento (SAMPAIO et al., 2013), poderá ser um meio mais viável economicamente, ao diminuir os custos de produção e igualmente seguro a fim de se evitar a transmissão alimentar da DCA no Brasil e em países onde há exportação.

Estudos que submetam o alimento a tratamento térmico em trocador de calor devem ser avaliados quanto à eficiência para a eliminação da virulência do *T. cruzi* na polpa de açaí, pois não necessita super aquecimento. Quando o produto é rapidamente aquecido e resfriado, as alterações químicas são minimizadas, ao mesmo tempo em que há adequada letalidade a micro-organismos e enzimas (RYLEY & KAJDA, 1994).

Sendo assim, verifica-se que a possibilidade de contaminação por diferentes fontes e micro-organismos não é característica exclusiva da polpa de açaí e que há uma grande dificuldade na busca de um único processo e temperatura a ser utilizada para a obtenção de um alimento totalmente seguro.

Essa escolha deve variar conforme o tipo de alimento, suas formas de consumo e certamente refletirá o conjunto de micro-organismos ou enzimas que se pretende eliminar, de modo a minimizar as perdas nutricionais e características sensoriais do produto. De qualquer maneira, o uso de medidas preventivas, como práticas higiênicas e sanitárias adequadas, ainda é a forma mais eficaz de se minimizar o risco com a contaminação do açaí e evitar doenças de transmissão alimentar (MS, 2010; WHO, 2014), principalmente quando a cultura local preconiza o consumo *in natura*.

De acordo com Dória (2013), as atuais normas sanitárias e higienistas restringem tradições gastronômicas genuínas e seus modos de fazer são

imposições do poder público segundo padrões estabelecidos pela grande indústria. Para ele, a proteção de um alimento artesanal deve significar, em primeiro lugar, a elaboração de um estatuto próprio de funcionamento dessa economia, de modo que ocorra aproximação entre produtor e consumidor sem a mediação dos processos industriais.

Dessa maneira, a grande dificuldade que ainda existe de se colocar em prática as medidas higiênicas e sanitárias deverá ser superada por meio da assimilação e incorporação desses conceitos, aparentemente muito simples, no dia-a-dia de cada cidadão, por meio de uma educação básica de qualidade e disseminada na sociedade.

No entanto, para uma possível aplicação futura do uso da técnica de inativação térmica do *T. cruzi* na polpa *in natura* de açaí em média e larga escala, seguindo nossos parâmetros de temperatura e tempo de incubação definidos, acredita-se que testes em nível industrial são também indispensáveis e serão complementares aos resultados aqui obtidos, de modo a garantir a viabilidade da utilização dessa técnica para a inativação do *T. cruzi* em grandes quantidades de polpa *in natura* de açaí e, posteriormente, a disponibilidade, em escala comercial, de um alimento seguro à saúde e aceitável ao consumidor final.

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, concluiu-se que:

1. O *Trypanosoma cruzi* foi capaz de preservar a sua virulência em solução de NaCl 0,15M mantida à 44°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por até 10 minutos, causar DCA e morte em até 18 dias após a infecção experimental pela via intraperitoneal em camundongos isogênicos imunodeficientes C.B-17-*Prkdc*^{scid}/Pas Unib;
2. O *T. cruzi* foi capaz de preservar a sua virulência em polpa *in natura* de açaí mantida à 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por até 20 minutos, causar DCA e morte em até 24 dias após a infecção experimental pela via intraperitoneal em camundongos isogênicos imunodeficientes C.B-17-*Prkdc*^{scid}/Pas Unib;
3. As duas metodologias propostas e testadas foram eficientes para a obtenção do *T. cruzi* e para a demonstração *in vivo* da preservação de sua virulência ou de sua inativação, após diferentes temperaturas de incubação *in vitro* e períodos de tempo;
4. *T. cruzi* é um micro-organismo termolábil porque não preservou sua virulência acima de 45,5°C, comparando-se a outros micro-organismos com importância de transmissão alimentar;
5. A cocção da polpa *in natura* de açaí acima de 44°C foi capaz de impedir a transmissão alimentar da DCA;
6. Testes em nível industrial são indispensáveis e serão complementares antes de uma possível aplicação da técnica de inativação térmica do *T. cruzi* na polpa *in natura* de açaí em média e larga escala, seguindo nossos parâmetros de temperatura de incubação e tempo definidos em laboratório;
7. Considerando a faixa de termorresistência mínima do *T. cruzi*, as perdas nutricionais e sensoriais durante o aquecimento poderão ser minimizadas, contudo, a obtenção de um método para a conservação ideal da polpa de açaí ainda é um obstáculo a ser transposto e sua escolha deverá considerar o

conjunto de micro-organismos a ser eliminado e a inativação completa das enzimas degradantes do alimento;

8. O perigo da transmissão oral do *T. cruzi* por meio do consumo da polpa *in natura* de açaí continuará elevado quando condições não controladas forem utilizadas pelos produtores artesanais na produção do alimento ou principalmente quando práticas higiênico-sanitárias eficientes não estiverem presentes durante todas as etapas da cadeia produtiva do açaí.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVES, D. P. ***Trypanosoma cruzi: A influência dos linfócitos T na regulação da infecção experimental em camundongos SCID***. 1998. 85 f. Dissertação (Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. Informe Técnico - nº 35 de 19 de junho de 2008**. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35_190608.pdf>. Acesso em: 17 set. 2010.

AÑEZ, N.; CRISANTE, G. ***Supervivencia de formas de cultivo de Trypanosoma cruzi en alimentos experimentalmente contaminados***. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, n. XLVIII(1), p. 91-94, 2008.

AQUINO, J. P. **O mal de Chagas pelas lentes e pelo conhecimento do farmacêutico-bioquímico**. Pharmacia Brasileira. Maio/Junho de 2008. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/3/15a22.pdf>> Acesso em: 18 fev. 2013.

ARAÚJO, J. M. A. **Química dos alimentos**, 2.ed. Viçosa: UFV, 1999, 319p.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; PIRMEZ, C. **Normas de segurança para o trabalho com *Trypanosoma cruzi***. In: Doença de Chagas: Manual para experimentação. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 125-132, 2000.

AYLWARD, F.; HAISMAN, D. R. ***Oxidation systems in fruits and vegetable - Their relation to the quality preserved products***. Advances in Food Research, v.17, p.1-76, 1969.

- BEZERRA, V. S. **Açaí congelado**. Coleção Agroindústria Familiar. Embrapa Amapá, 2007, 45p.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992.
- BOSMA, G. C.; CUSTER, R. P.; BOSMA, M. J. **A severe combined immunodeficiency mutant in the mouse**. *Nature*, v. 301, p. 527-530, 1983.
- BOWLING, A. T. **Medical Genetics - Blood and immunologic defects**. In: *Horses Genetics, Wallingford: CAB International*, p.106-107, 1996.
- BRENER, Z. **Therapeutic activity as criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi**. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 4, p. 389-396, 1962.
- CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**, Museu Paraense Emílio Goeldi, 5.ed. Belém: CEJUP, 1991, 279p.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conjuntura mensal. Açaí (fruto). Período: 01 a 30/06/2010**. 2010. Disponível em: <<http://portal.mda.gov.br/o/7446519>>. Acesso em: 9 mai. 2012.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conjuntura mensal. Açaí (fruto). Período: 01 a 30/06/2011**. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_06_22_17_13_53_conjunturaacaijunho2011.pdf>. Acesso em: 9 mai. 2012.
- CORNEJO, F. E. P.; NOGUEIRA, R. I.; WILBERG, V. C. **Secagem e desidratação**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2011. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgie02wyiv80z4s473tokdiw5.html>. Acesso em: 21 mai. 2013.

CORRÊA NETO, R. S. **Processamento de suco de laranja pasteurizado em garrafas de polietileno tereftalato (PET)**. 1998. 93 f. Tese (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.

CORRÊA NETO R. S.; FARIA, J. A. F. **Fatores que influem na qualidade do suco de laranja**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 19(1), p. 153-161, 1999.

COSTA, W. S.; ABREU, C. R.; NETO A. L. C.; MAGNO, A. P.; VILAR, D. A. N. **O uso de água boricada para a conservação do açaí**. Anais do 49º Congresso Brasileiro de Química. Química dos Alimentos. Porto Alegre. Associação Brasileira de Química, 2009. Disponível em: <www.abq.org.br/cbq/2009/trabalhos/10/10-106-6032.htm>. Acesso em: 9 abr. 2013.

CUNHA, G. M. A.; ALVES, J. K. P.; JÚNIOR, W. M. A.; DUARTE, W. K. C.; MAGALHÃES, M. M. A. **Estudo da cinética de inativação térmica da peroxidase presente na polpa de goiaba**. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. 6p. 2005.

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

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V. **Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil**. História sobre a doença de Chagas no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 44(II), p. 68-72, 2011.

DIAZ-UNGRÍA, C. **Estudio experimental del *Trypanosoma cruzi* en el perro y otros vertebrados. El problema de la transmisión**. Kasma (Venezuela), v. 3, p. 73-88, 1968.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras**. 2. ed.

Jaboticabal: Novos Talentos, 2004, 248p.

DORIA, C. A. **O alimento na mesa-redonda**. Revista Metr pole – Correio Popular. p. 6-7, 17 mar. 2013.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Conservação a frio**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2013. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgie02wyiv80z4s473caciza4.html>. Acesso em: 1 nov. 2013.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema de produção do açaí**. 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/>. Acesso em: 9 abr. 2013.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

FERREIRA, C. J.; AMATO NETO, V.; GAKIYA, E.; BEZERRA, R. C.; RODRÍGUEZ ALARCÓN, R. S. ***Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas disease***. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 45(1), p. 41-42, 2003.

FERREIRA, C. J.; MARTINHO, P. C.; AMATO NETO, V.; CRUZ, R. R. B. ***Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease***. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 43(3), p. 161-162, 2001.

FREIRE, S. **Polpa de açaí no Pará será pasteurizada**. Folha de São Paulo. 2007. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/fsp/dinheiro/fi1007200717.htm>>. Acesso em: 29 set. 2010.

GRYNBERG, N.; NERY-GUIMARÃES, F.; VENÂNCIO, I. **Refratariedade das galinhas ao “*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*” III – Dissociação dos**

fenômenos da refratariedade e da lise dos epimastigotas pelo soro das aves. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 72(1/2), p. 131-136, 1974.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientação para acreditação de laboratórios para o Grupo de Serviços de calibração em temperatura e umidade.** Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-009-Revisão 02, 2010, 16p.

INPE. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos.** Disponível em: <www.cptec.inpe.br>. Acesso em: 10 jun. 2014.

KIMBALL, D. A. ***Citrus processing quality control and technology.*** N.Y.; Chapman & Hall – ITP, 1991, 473p.

LABELLO BARBOSA, R.; DIAS, V. L.; PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; FRANCO, R. M. B.; GUARALDO, A. M. A.; ALVES, D. P.; PASSOS, L. A. C. ***Survival in vitro and virulence of Trypanosoma cruzi in açai pulp in experimental acute Chagas disease.*** *Journal of Food Protection*, v. 75, p. 601-606, 2012.

LING, A. C.; LUND, D. B. ***Determining kinetics parameters for thermal inactivation of heat resistant and heat labile isoenzymes from thermal destruction curves.*** *Journal of Food Science*, Chicago, v. 43, p. 1307-1310, 1978.

LUND, D. B. ***Heat processing.*** *Principles of food science. Part II: Physical principles of food preservation.* New York: M. Dekker, 1975, 474p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. ***Citrus.*** 2014. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>. Acesso em: 10 abr. 2013.

MARQUES, L. G. **Liofilização de frutas tropicais**. 2008. 255 f. Tese (Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2008.

MELO, C. F. M.; BARBOSA, W. C.; ALVES, S. M. **Obtenção de açaí desidratado**. Belém, PA: Embrapa-CPATU, 1988. 13p.

MENEZES, E. M. S.; ROSENTHAL, A.; SABAA-SRUR, A.; CAMARGO, L.; CALADO, V.; SANTOS, A. **Efeito da alta pressão hidrostática na atividade de enzimas da polpa de açaí**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, p. 14-19, 2008.

MERUSSE, J. L. B.; LAPICHNIK, V. B. V. **Instalações e equipamentos**. In: Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. São Paulo: EPM, 1996, 259p.

MEZADRI, T. J.; TOMAZ, V. A.; AMARAL, V. L. L. **Animais de Laboratório. Cuidados na iniciação experimental**. Florianópolis: UFSC, 2004, 154p.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Cuidado com os alimentos para consumo humano em situação de enchentes**. 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/alimentos_folder.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2013.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2010. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília/DF: Editora MS, 2010. 159p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_doencas_transmitidas_por_alimentos_pdf.pdf>. Acesso em: 6 mai. 2013.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 2.415**. Diário Oficial da União, 12 de dezembro de 1996. 1996.

NOGUEIRA, O. L.; CARVALHO, C. J. R.; MULLER, C. H.; GALVÃO, E. U. P.; SILVA, H. M. E.; RODRIGUES, J. E. L. F.; OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J.

E. U.; ROCHA NETO, O. G.; NASCIMENTO, W. M. O.; CALZAVARA, B. B. G. **A cultura do açaí**. Brasília: EMBRAPA, 1995, 49p.

OLIVEIRA, M. S. P.; MÜLLER, A. A. **Caracterização e avaliação de germoplasma de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1998, 3p.

ONG, F. M. P.; RODRIGUES, L. D. **Seção de Experimentação**. In: NEVES, S. M. P.; MANCINI FILHO, J.; de MENEZES, E. W. (Org.). Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: USP, p. 91-154, 2013.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39(5), p. 512-514, 2006.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Doença de Chagas: Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos**. Rio de Janeiro: OPAS-VP/OPAS/OMS, Série Manuais Técnicos, v. 12, 2009, 92p.

PASSOS, L. A. C.; GUARALDO, A. M. A.; LABELLO BARBOSA, R.; DIAS, V. L.; PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; FRANCO, R. M. B.; ALVES, D. P. **Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo***. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 21(2), p. 213-222, abr-jun, 2012.

PEREIRA, M. L.; LEITÃO, M. F. F. ***Salmonella* e *Escherichia coli* em Sucos de Frutas e Outros Substratos Ácidos – Uma Revisão Sobre Injúria Bacteriana**. Revista de Farmácia e Bioquímica da UFMG. Belo Horizonte, v. 10, p. 67-80, 1989.

PFLUG, I. J. ***Microbiology and Engineering of Sterilization Process.*** Mineapolis: Environmental Sterilization Laboratory, 10 ed., 1999.

REED, G. ***Enzimes in Food Processing.*** 2. ed. New York: Academic Press, 1975, 573p.

REED, S. M.; BAYEY, W. M. ***Disorders of the immune system.*** In: *Equine internal medicine.* 1. ed. Saunders Company, p. 47-53, 1998.

REVISTA PESQUISA FAPESP. **Açaí: Do pé para o lanche.** Tecnologia, Recursos Naturais, Revista Pesquisa Fapesp, p. 64-68, 2013.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação.** Belém: UFPA, 2000, 315p.

ROGEZ, H.; AGUIAR, F. S. **Contaminação da bebida açaí envolvendo *Trypanosoma cruzi*.** In: PESSOA, J. D. C.; TEIXEIRA, G. H. DE A. (Org.). *Tecnologias para inovação das cadeias Euterpe.* 1 ed. Brasília: Embrapa, p. 205-228, 2012.

ROGEZ, H.; SOUZA, J. N. S.; NASCIMENTO, M. Q.; BUXANT, R.; PASCAL, S. **Branqueamento dos frutos de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) para diminuição da carga microbiana do suco.** Anais da Associação Brasileira de Química, v. 45(4), p. 177-184, 1996.

RYLEY, J.; KAJDA, P. ***Vitamins in thermal processing.*** Food Chemistry, Essex, v. 49, n. 1, p. 119-129, 1994.

SAGRI. SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA. GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ. **A importância do açaí no contexto econômico, social e ambiental do Estado do Pará.** 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fruticultura/27RO/App_A%C3%A7ai.pdf>. Acesso em: 18 mai. 2012.

SAMPAIO, P. B.; PANTOJA, D.; SANTOS, M. G. **Estratégias de treinamento teórico/prático para realização da etapa de branqueamento em frutos de açaí com processadores artesanais do município de Belém/PA.** p. 1140-1143. XVIII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos – ENAAL. IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos. Gestão e Inovação Tecnológica. São Paulo. 15 a 18 de setembro de 2013.

SANTOS, B. F. **Macro e micro ambientes.** *In:* Animais de laboratório: Criação e experimentação. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002, 388p.

SANTOS, S. O. **Eco-epidemiologia da doença de Chagas aguda em área amazônica. Município de Abaetetuba, Estado do Pará, Brasil, 2008 – 2009.** 2013. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais. 2013.

SCHMIDT, F. L. **Cinética de inativação térmica das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) visando qualidade e segurança alimentar.** Centro de Documentação e Informação da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. 2009. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/27122/cinetica-de-inativacao-termica-das-enzimas-peroxidase-e-polifenoloxidase-em-polpa-de-acai-euterpe-ol/>>. Acesso em: 22 mai. 2012.

SCHMIDT, F. L. **Deterioração de sucos de frutas em embalagens assépticas. Um "novo" microrganismo desponta: *Alicyclobacillus acidoterrestris*.** Informativo FRUTHOTEC, Campinas, v. 2, n. 4, 1995.

SEHN, E. **Dinâmica da desnaturação térmica das proteínas do sangue e fotoestabilidade de formulações de uso tópico: Estudo quantitativo com métodos fototérmicos.** 2009. 123 f. Tese (Física) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2009.

SHIGEOKA, D. S. **Tratamento térmico mínimo do suco de laranja natural: estudo da viabilidade de armazenamento em latas de alumínio.** 1999. 67 f.

Dissertação (Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SOUTO, R. N. M.; SABAA-SRUR, A. U. O.; SILVA, A. G. **Uso da radiação gama e da refrigeração na conservação de polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.)**. Revista Higiene Alimentar, v. 25(194/195), p. 1074-1076, 2011.

SOUZA, M. A. C.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; PANTOJA, L. **Suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): Microbiological evaluation thermal treatment and shelf life**. Acta Amazônica, v. 36(4), p. 497-502, 2006.

STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in Food Processing**. Food Science and Technology. London: Academic Press, 2 ed., 1973, 329p.

TONON, R. V. **Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto**. 2009. 212 f. Tese (Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

VALENTE, V. C. **Estudo genotípico de *Trypanosoma cruzi*: Epidemiologia e caracterização molecular de isolados do homem, triatomíneos e mamíferos silvestres do Pará, Amapá e Maranhão**. 2011. 164 f. Tese (Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Universidade Federal do Pará. Belém. 2011.

VASCONCELOS, M. A. S.; MELO FILHO, A. B. **Técnico em Alimentos. Conservação de Alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2010, 130p.

WHITAKER, J. R. **Effect of temperature on enzyme-catalysed reactions**. In: *Principles of enzymology for the food science*. New York: Marcel Dekker, 1972, p. 319-349.

WHO. *WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis)*. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em: 23 abr. 2014.

8. APÊNDICE

8.1. Datos estadísticos

```

The SAS System                                263
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=10 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

Class          Levels    Values
inocula         2      PC TG
method          1       A

Number of Observations Read          4
Number of Observations Used          4

The SAS System                                196
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=10 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

Source          DF          Sum of
                    Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model            1      25.00000000    25.00000000     50.00    0.0194
Error            2       1.00000000     0.50000000
Corrected Total   3      26.00000000

R-Square      Coeff Var      Root MSE    freq Mean
0.961538      7.071068      0.707107     10.00000

Source          DF      Type I SS    Mean Square    F Value    Pr > F
inocula          1      25.00000000    25.00000000     50.00    0.0194
method           0       0.00000000      .           .         .

Source          DF      Type III SS    Mean Square    F Value    Pr > F
inocula          1      25.00000000    25.00000000     50.00    0.0194
method           0       0.00000000      .           .         .

The SAS System                                197
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=10 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the
      experimentwise error rate.

Alpha          0.05
Error Degrees of Freedom    2

```


Error Mean Square 0.5

Number of Means 2
Critical Range 3.042

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | inocula |
|-----------------|---------|---|---------|
| A | 12.5000 | 2 | TG |
| B | 7.5000 | 2 | PC |

The SAS System 198
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=10 -----

The GLM Procedure

| Level of method | N | Mean | Std Dev |
|-----------------|---|------------|------------|
| A | 4 | 10.0000000 | 2.94392029 |

The SAS System 199
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=20 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|---------|--------|--------|
| inocula | 2 | PC TG |
| method | 1 | A |

Number of Observations Read 4
Number of Observations Used 4

The SAS System 200
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=20 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 1 | 16.00000000 | 16.00000000 | 32.00 | 0.0299 |
| Error | 2 | 1.00000000 | 0.50000000 | | |
| Corrected Total | 3 | 17.00000000 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | freq Mean |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 0.941176 | 7.443229 | 0.707107 | 9.500000 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|---------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| inocula | 1 | 16.00000000 | 16.00000000 | 32.00 | 0.0299 |
| method | 0 | 0.00000000 | . | . | . |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|---------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| inocula | 1 | 16.00000000 | 16.00000000 | 32.00 | 0.0299 |
| method | 0 | 0.00000000 | . | . | . |

The SAS System 201
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=20 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 2 |
| Error Mean Square | 0.5 |

| | |
|-----------------|-------|
| Number of Means | 2 |
| Critical Range | 3.042 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | inocula |
|-----------------|---------|---|---------|
| A | 11.5000 | 2 | TG |
| B | 7.5000 | 2 | PC |

The SAS System 202
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=20 -----

The GLM Procedure

| Level of method | N | Mean | Std Dev |
|--------------------|---|------------|------------|
| A | 4 | 9.50000000 | 2.38047614 |

----- temp=44 time=10 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|---------|--------|--------|
| inocula | 1 | PC |
| method | 1 | A |

| | |
|-----------------------------|---|
| Number of Observations Read | 2 |
| Number of Observations Used | 2 |

The SAS System 225
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=44 time=10 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

Sum of

| Source | DF | Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|---------|-------------|---------|--------|
| Model | 0 | 0 | . | . | . |
| Error | 1 | 0 | 0 | | |
| Corrected Total | 1 | 0 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | freq Mean |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 0.000000 | 0 | 0 | 8.000000 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|---------|----|-----------|-------------|---------|--------|
| inocula | 0 | 0 | . | . | . |
| method | 0 | 0 | . | . | . |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|---------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| inocula | 0 | 0 | . | . | . |
| method | 0 | 0 | . | . | . |

The SAS System 226
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=44 time=10 -----

The GLM Procedure

| Level of inocula | N | Mean | Std Dev |
|------------------|---|------------|---------|
| PC | 2 | 8.00000000 | 0 |

| Level of method | N | Mean | Std Dev |
|-----------------|---|------------|---------|
| A | 2 | 8.00000000 | 0 |

The SAS System 337
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=10 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|---------|--------|--------|
| inocula | 2 | PC TG |

| | |
|-----------------------------|---|
| Number of Observations Read | 6 |
| Number of Observations Used | 6 |

The SAS System 338
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=10 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 1 | 33.33333333 | 33.33333333 | 88.89 | 0.0007 |

| | | | |
|-----------------|---|-------------|------------|
| Error | 4 | 1.50000000 | 0.37500000 |
| Corrected Total | 5 | 34.83333333 | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|-----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | freq Mean |
| 0.956938 | 5.652669 | 0.612372 | 10.83333 |

| | | | | | |
|---------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| inocula | 1 | 33.33333333 | 33.33333333 | 88.89 | 0.0007 |

| | | | | | |
|---------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| inocula | 1 | 33.33333333 | 33.33333333 | 88.89 | 0.0007 |

The SAS System 339
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=20 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| | | |
|---------|--------|--------|
| Class | Levels | Values |
| inocula | 2 | PC TG |

| | |
|-----------------------------|---|
| Number of Observations Read | 6 |
| Number of Observations Used | 6 |

The SAS System 340
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=43 time=20 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

| | | | | | |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
| Model | 1 | 33.33333333 | 33.33333333 | 24.24 | 0.0079 |
| Error | 4 | 5.50000000 | 1.37500000 | | |
| Corrected Total | 5 | 38.83333333 | | | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|-----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | freq Mean |
| 0.858369 | 10.82404 | 1.172604 | 10.83333 |

| | | | | | |
|---------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| inocula | 1 | 33.33333333 | 33.33333333 | 24.24 | 0.0079 |

| | | | | | |
|---------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| inocula | 1 | 33.33333333 | 33.33333333 | 24.24 | 0.0079 |

The SAS System 355
09:09 Friday, February 22, 2013

----- temp=44 time=10 -----

The GLM Procedure


```

Class Level Information
Class          Levels    Values
inocula        1        PC

Number of Observations Read      4
Number of Observations Used      4
The SAS System                    356
                                09:09 Friday, February 22, 2013

```

```

----- temp=44 time=10 -----

```

```

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

Source          DF          Sum of
                  Squares    Mean Square   F Value   Pr > F
Model            0          0.00000000    .            .        .
Error            3          0.75000000    0.25000000
Corrected Total  3          0.75000000

R-Square      Coeff Var      Root MSE    freq Mean
0.000000      6.060606      0.500000    8.250000

```

```

Source          DF      Type I SS    Mean Square   F Value   Pr > F
inocula         0          0          .            .        .

```

```

Source          DF      Type III SS    Mean Square   F Value   Pr > F
inocula         0          0          .            .        .

```

```

The SAS System                    167
                                08:12 Friday, February 22, 2013

```

```

----- temp=43.0 time=10 -----

```

```

The GLM Procedure

Class Level Information
Class          Levels    Values
inocula        2        PC TG
method         2        A B

Number of Observations Read      6
Number of Observations Used      6
The SAS System                    168
                                08:12 Friday, February 22, 2013

```

```

----- temp=43.0 time=10 -----

```

```

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

Source          DF          Sum of
                  Squares    Mean Square   F Value   Pr > F
Model            2          33.33333333    16.66666667    33.33    0.0089

```


| | | | |
|-----------------|---|-------------|------------|
| Error | 3 | 1.50000000 | 0.50000000 |
| Corrected Total | 5 | 34.83333333 | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|-----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | freq Mean |
| 0.956938 | 6.527140 | 0.707107 | 10.83333 |

| | | | | | |
|---------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| inocula | 1 | 33.33333333 | 33.33333333 | 66.67 | 0.0038 |
| method | 1 | 0.00000000 | 0.00000000 | 0.00 | 1.0000 |

| | | | | | |
|---------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| inocula | 1 | 25.00000000 | 25.00000000 | 50.00 | 0.0058 |
| method | 1 | 0.00000000 | 0.00000000 | 0.00 | 1.0000 |

The SAS System 169
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=10 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|-----------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 3 |
| Error Mean Square | 0.5 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 2.666667 |

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | |
|-----------------|-------|
| Number of Means | 2 |
| Critical Range | 1.949 |

Means with the same letter are not significantly different.

| | | | |
|-----------------|---------|---|---------|
| Duncan Grouping | Mean | N | inocula |
| A | 12.5000 | 4 | TG |
| B | 7.5000 | 2 | PC |

The SAS System 170
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=10 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|-----------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 3 |
| Error Mean Square | 0.5 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 2.666667 |

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means 2
Critical Range 1.949

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | method |
|-----------------|---------|---|--------|
| A | 12.5000 | 2 | B |
| B | 10.0000 | 4 | A |

The SAS System 171
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=20 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|---------|--------|--------|
| inocula | 2 | PC TG |
| method | 2 | A B |

Number of Observations Read 6
Number of Observations Used 6

The SAS System 172
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=20 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 2 | 37.33333333 | 18.66666667 | 37.33 | 0.0076 |
| Error | 3 | 1.50000000 | 0.50000000 | | |
| Corrected Total | 5 | 38.83333333 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | freq Mean |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 0.961373 | 6.527140 | 0.707107 | 10.83333 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|---------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| inocula | 1 | 33.33333333 | 33.33333333 | 66.67 | 0.0038 |
| method | 1 | 4.00000000 | 4.00000000 | 8.00 | 0.0663 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|---------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| inocula | 1 | 16.00000000 | 16.00000000 | 32.00 | 0.0109 |
| method | 1 | 4.00000000 | 4.00000000 | 8.00 | 0.0663 |

The SAS System 173
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=20 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 3
Error Mean Square 0.5
Harmonic Mean of Cell Sizes 2.666667

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means 2
Critical Range 1.949

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | inocula |
|-----------------|---------|---|---------|
| A | 12.5000 | 4 | TG |
| B | 7.5000 | 2 | PC |

The SAS System 174
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=20 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 3
Error Mean Square 0.5
Harmonic Mean of Cell Sizes 2.666667

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means 2
Critical Range 1.949

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | method |
|-----------------|---------|---|--------|
| A | 13.5000 | 2 | B |
| B | 9.5000 | 4 | A |

The SAS System 175
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=44.0 time=10 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|---------|--------|--------|
| inocula | 1 | PC |
| method | 2 | A B |

Number of Observations Read 4


```

Number of Observations Used          4

The SAS System                      176
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=44.0 time=10 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

Source              DF          Sum of
                    Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model                1          0.25000000      0.25000000      1.00    0.4226
Error                2          0.50000000      0.25000000
Corrected Total      3          0.75000000

R-Square      Coeff Var      Root MSE      freq Mean
0.333333      6.060606      0.500000      8.250000

Source              DF          Type I SS      Mean Square    F Value    Pr > F
inocula             0          0.00000000      .              .          .
method              1          0.25000000      0.25000000      1.00    0.4226

Source              DF          Type III SS      Mean Square    F Value    Pr > F
inocula             0          0.00000000      .              .          .
method              1          0.25000000      0.25000000      1.00    0.4226

The SAS System                      177
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=44.0 time=10 -----

The GLM Procedure

Level of          -----freq-----
inocula           N          Mean          Std Dev
PC                4          8.25000000      0.50000000

Level of          -----freq-----
method           N          Mean          Std Dev
A                2          8.00000000      0.00000000
B                2          8.50000000      0.70710678

The SAS System                      178
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=10 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

Class          Levels    Values
method          2      A B

Number of Observations Read      6
Number of Observations Used      6

The SAS System                      179
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=10 -----

```



```

                                The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

Source              DF          Sum of
                        Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model                1          8.33333333    8.33333333    1.26    0.3248
Error                4         26.50000000    6.62500000
Corrected Total      5         34.83333333

                                R-Square    Coeff Var    Root MSE    freq Mean
                                0.239234    23.75915    2.573908    10.83333

Source              DF          Type I SS    Mean Square    F Value    Pr > F
method              1          8.33333333    8.33333333    1.26    0.3248

Source              DF          Type III SS    Mean Square    F Value    Pr > F
method              1          8.33333333    8.33333333    1.26    0.3248

                                The SAS System                                180
                                08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=10 -----

                                The GLM Procedure

                                Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the
      experimentwise error rate.

Alpha                                0.05
Error Degrees of Freedom              4
Error Mean Square                     6.625
Harmonic Mean of Cell Sizes 2.666667

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means                       2
Critical Range                       6.189

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping      Mean      N    method
      A      12.500      2    B
      A
      A      10.000      4    A

                                The SAS System                                181
                                08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=20 -----

                                The GLM Procedure

                                Class Level Information

Class      Levels      Values
method      2      A B

```


Number of Observations Read 6
Number of Observations Used 6

The SAS System 182
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=20 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 1 | 21.33333333 | 21.33333333 | 4.88 | 0.0918 |
| Error | 4 | 17.50000000 | 4.37500000 | | |
| Corrected Total | 5 | 38.83333333 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | freq Mean |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 0.549356 | 19.30754 | 2.091650 | 10.83333 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| method | 1 | 21.33333333 | 21.33333333 | 4.88 | 0.0918 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| method | 1 | 21.33333333 | 21.33333333 | 4.88 | 0.0918 |

The SAS System 183
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=43.0 time=20 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|-----------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 4 |
| Error Mean Square | 4.375 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 2.666667 |

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | |
|-----------------|-------|
| Number of Means | 2 |
| Critical Range | 5.029 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | method |
|-----------------|--------|---|--------|
| A | 13.500 | 2 | B |
| A | | | |
| A | 9.500 | 4 | A |

The SAS System 184
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=44.0 time=10 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|--------|--------|--------|
| method | 2 | A B |

| | |
|-----------------------------|---|
| Number of Observations Read | 4 |
| Number of Observations Used | 4 |

The SAS System 185
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=44.0 time=10 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 1 | 0.25000000 | 0.25000000 | 1.00 | 0.4226 |
| Error | 2 | 0.50000000 | 0.25000000 | | |
| Corrected Total | 3 | 0.75000000 | | | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|-----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | freq Mean |
| 0.333333 | 6.060606 | 0.500000 | 8.250000 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|------------|-------------|---------|--------|
| method | 1 | 0.25000000 | 0.25000000 | 1.00 | 0.4226 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| method | 1 | 0.25000000 | 0.25000000 | 1.00 | 0.4226 |

The SAS System 186
08:12 Friday, February 22, 2013

----- temp=44.0 time=10 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the Experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 2 |
| Error Mean Square | 0.25 |

| | |
|-----------------|-------|
| Number of Means | 2 |
| Critical Range | 2.151 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | method |
|-----------------|--------|---|--------|
| A | 8.5000 | 2 | B |
| A | 8.0000 | 2 | A |

9. ANEXO

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada **“Tratamentos de aquecimento, inativação térmica e virulência do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) de vetores e reservatório em polpa *in natura* de açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) na doença de Chagas aguda de transmissão alimentar no Estado do Pará, Brasil”**:

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança, projeto N°. _____, Instituição: _____.

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto N°. 2180-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo N°. _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Aluno: Rodrigo Labello Barbosa

Orientador: Luiz Augusto Corrêa Passos

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

“Se tu estás verdadeiramente comprometido com tua meta,
o universo inteiro conspira a teu favor
para que apareçam os instrumentos e pessoas que te permitirão lográ-lo”

Goethe

CAPÍTULO II:

**VIRULÊNCIA DO *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) DE
VETORES E RESERVATÓRIO EM POLPA *in natura* DE
AÇAÍ (*Euterpe oleraceae* Martius) NA DOENÇA DE
CHAGAS AGUDA DE TRANSMISSÃO ALIMENTAR
NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

ABSTRACT

VIRULENCE OF *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) FROM VECTORS AND RESERVOIR IN *in natura* AÇAÍ PULP (*Euterpe oleraceae* Martius) ABOUT FOODBORNE ACUTE CHAGAS' DISEASE AT PARÁ STATE, BRAZIL

In the Brazilian Amazon, especially at Pará State, outbreaks of acute Chagas' disease (ACD) foodborne in humans are observed by clinical and epidemiological characterization after association with the ingestion of *in natura* fruit's açai of pulp contaminated with *T. cruzi*. The aim of this study was evaluate the possibility of experimental transmission of this parasitosis, with strains from vectors and reservoir at different locations at Pará State, in an accidental contamination in food. For this, it was necessary to evaluate the feasibility of using inbred immunodeficient B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib for the study of ACD. After this, it were performed *in vitro* analysis about survival of *T. cruzi* under optical microscopy, *in vivo* clonal amplification and analysis about virulence of *T. cruzi* (TcI) from *Rhodnius pictipes*, Val-De-Cans' forest, Belém (PA); from *R. pictipes*, Ajuai River, Abaetetuba (PA); from *Rhodnius* sp. and *Philander opossum*, Combu's Island, Belém (PA), comparing with *T. cruzi* Y strain (TcII) in several doses and routes of administration. Subsequently, 10⁵ trypomastigotes of *T. cruzi* from different sources and locations at Pará were mixed with *in natura* fruit's açai of pulp, at room temperature, and subjected to forced sieving process. 100 µL of inoculum (negative control, positive control or test group) were administered intraperitoneal, gavage or oral in inbred immunodeficient hosts B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib, under previous antibiotic therapy (1.75 mg/day). Parasitemia was scored as recommended by Brener and mortality registered. All *T. cruzi* did not present ACD and death in the negative control. For the *T. cruzi* Y strain, the positive control presented ACD and death, respectively, on days 5,0±1,0 and 20,0±0,0 (intraperitoneal) and the test group presented ACD and death, respectively, on days 8,0±1,0 and 20,0±1,0 (intraperitoneal). For *T. cruzi* from *R. pictipes*, Val-De-Cans' forest, the positive control presented ACD and death, respectively, on days 15,0±1,0 and 21,0±1,0 (intraperitoneal); 23,0±1,0 and 31,0±1,0 (gavage) and 27,0±2,0 and 33,0±3,0 (oral) and the test group presented ACD and death, respectively, on

days $18,0 \pm 1,0$ and $24,0 \pm 1,0$ (intraperitoneal); $27,0 \pm 1,0$ and $33,0 \pm 1,0$ (gavage) and $32,0 \pm 3,0$ and $40,0 \pm 3,0$ (oral). For *T. cruzi* from *R. pictipes*, Ajuai River, the positive control presented ACD and death, respectively, on days $15,0 \pm 1,0$ and $26,0 \pm 1,0$ (intraperitoneal); $27,0 \pm 2,0$ and $37,0 \pm 1,0$ (gavage) and $29,0 \pm 2,0$ and $40,0 \pm 1,0$ (oral) and test group presented ACD and death, respectively, on days $18,0 \pm 1,0$ and $25,0 \pm 1,0$ (intraperitoneal); $31,0 \pm 2,0$ and $43,0 \pm 3,0$ (gavage) and $35,0 \pm 1,0$ and $49,0 \pm 1,0$ (oral). For *T. cruzi* from *P. opossum*, Combu's Island, the positive control presented ACD and death, respectively, on days $17,0 \pm 0,0$ and $26,0 \pm 1,0$ (intraperitoneal); $29,0 \pm 2,0$ and $39,0 \pm 2,0$ (gavage) and $37,0 \pm 5,0$ and $45,0 \pm 4,0$ (oral) and the test group presented ACD and death, respectively, on days $20,0 \pm 2,0$ and $34,0 \pm 1,0$ (intraperitoneal); $41,0 \pm 1,0$ and $47,0 \pm 1,0$ (gavage) and $45,0 \pm 2,0$ and $51,0 \pm 1,0$ (oral). Statistical analysis showed no significant difference for the ACD from vectors of different locations, however, there was significant difference for the ACD between *T. cruzi* from vectors and reservoir, as well as for the *T. cruzi* Y strain (Duncan test, $\alpha 0,01$). Therefore, *T. cruzi* from different sources and locations at Pará State, after contact with *in natura* fruit's açai of pulp, at room temperature, by different routes of administration, retained its virulence *in vivo*, caused ACD and death between 17 and 52 days after experimental infections in inbred immunodeficient hosts B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag). A quality basic education will facilitate hygiene practices occur throughout the productive chain of açai and will prevent ACD foodborne in the northern region of Brazil in next decades.

Keywords: experimental acute Chagas' disease; açai; virulence; *Rhodnius pictipes*; *Philander opossum*.

RESUMO

VIRULÊNCIA DO *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) DE VETORES E RESERVATÓRIO EM POLPA *in natura* DE AÇAÍ (*Euterpe oleraceae* Martius) NA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA DE TRANSMISSÃO ALIMENTAR NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL

Na amazônia brasileira, especialmente no Estado do Pará, microepidemias de doença de Chagas aguda (DCA) humana, de transmissão alimentar, são observadas por meio da caracterização clínica e epidemiológica após associação ao consumo de polpa *in natura* de açaí contaminada com *Trypanosoma cruzi*. O objetivo desse estudo foi avaliar a possibilidade experimental da transmissão dessa parasitose, com cepas provenientes de vetores e reservatório de diferentes localizações do Pará, por contaminação acidental no alimento. Para isso, avaliou-se a viabilidade do uso do modelo isogênico imunodeficiente B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib para o estudo da DCA. Em seguida, realizou-se análise *in vitro* da sobrevivência de *T. cruzi* à microscopia óptica comum, amplificação clonal *in vivo* e análise *in vivo* da virulência de *T. cruzi* (Tcl) de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans, Belém (PA); de *R. pictipes* do Rio Ajuá, Abaetetuba (PA); de *Rhodnius* sp. e de *Philander opossum*, ambos da Ilha do Combu, Belém (PA), comparando-se à cepa Y de *T. cruzi* (Tcll), por meio de diferentes doses e vias de administração. Posteriormente, 10⁵ tripomastigotas de *T. cruzi* das diferentes fontes e localizações foram misturadas à polpa *in natura* de açaí, à temperatura ambiente e submetidas à tamisação forçada. 100µL dos inóculos (controle negativo, controle positivo ou grupo teste) foram administrados via intraperitoneal, gavagem ou oral em hospedeiros isogênicos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib, sob antibioticoterapia prévia (1,75mg/dia). A parasitemia foi realizada de acordo com o método de Brener e a mortalidade foi registrada. Os resultados demonstraram que para todos os *T. cruzi* não houve constatação de DCA e morte no controle negativo. Para a cepa Y de *T. cruzi*, o controle positivo apresentou DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 5,0±1,0 e 20,0±0,0 (via intraperitoneal). Já o grupo teste apresentou DCA, com início de parasitemia e morte, respectivamente,

nos dias $8,0 \pm 1,0$ e $20,0 \pm 1,0$ (via intraperitoneal). Para *T. cruzi* de *R. pictipes* da Mata do Val-De-Cans, o controle positivo apresentou DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $15,0 \pm 1,0$ e $21,0 \pm 1,0$ (via intraperitoneal); $23,0 \pm 1,0$ e $31,0 \pm 1,0$ (via gavagem) e $27,0 \pm 2,0$ e $33,0 \pm 3,0$ (via oral). Já o grupo teste apresentou DCA, com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $18,0 \pm 1,0$ e $24,0 \pm 1,0$ (via intraperitoneal); $27,0 \pm 1,0$ e $33,0 \pm 1,0$ (via gavagem) e $32,0 \pm 3,0$ e $40,0 \pm 3,0$ (via oral). Para *T. cruzi* de *R. pictipes* do Rio Ajuai, o controle positivo apresentou DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $15,0 \pm 1,0$ e $26,0 \pm 1,0$ (via intraperitoneal); $27,0 \pm 2,0$ e $37,0 \pm 1,0$ (via gavagem) e $29,0 \pm 2,0$ e $40,0 \pm 1,0$ (via oral). Já o grupo teste apresentou DCA, com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $18,0 \pm 1,0$ e $25,0 \pm 1,0$ (via intraperitoneal); $31,0 \pm 2,0$ e $43,0 \pm 3,0$ (via gavagem) e $35,0 \pm 1,0$ e $49,0 \pm 1,0$ (via oral). Para *T. cruzi* de *P. opossum* da Ilha do Combu, o controle positivo apresentou DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $17,0 \pm 0,0$ e $26,0 \pm 1,0$ (via intraperitoneal); $29,0 \pm 2,0$ e $39,0 \pm 2,0$ (via gavagem) e $37,0 \pm 5,0$ e $45,0 \pm 4,0$ (via oral). Já o grupo teste apresentou DCA, com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $20,0 \pm 2,0$ e $34,0 \pm 1,0$ (via intraperitoneal); $41,0 \pm 1,0$ e $47,0 \pm 1,0$ (via gavagem) e $45,0 \pm 2,0$ e $51,0 \pm 1,0$ (via oral). Na análise estatística, não houve diferença significativa para a DCA de vetores de diferentes localizações, contudo, houve diferença significativa para a DCA entre *T. cruzi* de vetores e reservatório, bem como em relação à cepa Y de *T. cruzi* (teste de Duncan, 99% de confiança). Portanto, *T. cruzi* obtidos de diferentes fontes e localizações no Estado do Pará, após o contato com a polpa *in natura* de açaí, à temperatura ambiente, por meio de diferentes vias de administração, foram capazes de preservar sua virulência *in vivo*, causar DCA e morte, em geral, respectivamente entre o 17º e o 52º dias após as infecções experimentais, em hospedeiros isogênicos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag). Uma educação básica de qualidade facilitará que práticas de higiene sejam estabelecidas durante toda a cadeia produtiva do açaí e evitará a ocorrência de DCA de transmissão alimentar na região Norte do país nas próximas décadas.

Palavras-chave: doença de Chagas aguda experimental; açaí; virulência; *Rhodnius pictipes*; *Philander opossum*.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Classificação atual do *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909) pertence ao Filo Euglenozoa, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae (COX, 2002). Estão descritas mais de 60 cepas isoladas de *T. cruzi*, com distribuições geográficas distintas e agrupadas em seis linhagens (grupos TcI a TcVI) denominadas *Discrete Typing Units (DTU's)*, que são conjuntos de isolados geneticamente semelhantes e que podem ser identificados por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (ZINGALES et al., 2009).

Os grupos TcI, TcIII e TcIV (antigos zimodemas TcI e ZIII) estão associados a um ciclo silvestre, originalmente ligados a uma evolução primitiva em marsupiais do gênero *Didelphis*. Atualmente, referem-se à maioria dos isolados de transmissão doméstica vetorial das formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas ao norte da Linha do Equador, como casos humanos na América Central, no México, ao norte da América do Sul e na Amazônia brasileira (MILES et al., 1978; COURA & DIAS, 2009; ZINGALES et al., 2009; ZINGALES, 2011).

Os grupos TcII, TcV e TcVI (antigo zimodema TcII) estão associados a um ciclo doméstico, provavelmente posterior, transferidos originalmente dos marsupiais a placentários, como primatas e roedores por meio de populações de triatomíneos. Já foram registrados principalmente nos países andinos, ao sul da América do Sul, na região nordeste e no centro-sul brasileiro (MILES et al., 1978; ZINGALES et al., 2009; ZINGALES, 2011).

1.2. O panorama da doença de Chagas na Amazônia brasileira

Embora a distribuição global da doença de Chagas tenha se modificado nos últimos anos, ela é uma enzootia nas Américas, compreendendo desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina, mas considerada endemia em algumas regiões, principalmente na Amazônia, responsável pela emergência como doença infecciosa e negligenciada (MS, 2005b; OPAS, 2006; COURA & DIAS, 2009; COURA & JUNQUEIRA, 2012).

De acordo com Coura & Junqueira (2012), atualmente a região amazônica internacional ou Pan-Amazônia apresenta mais de 30 milhões de

habitantes, engloba cerca de 30% da biodiversidade do planeta, corresponde a 44% do território sul-americano e pertence à Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela.

A Amazônia brasileira ocupa 67% da extensão total da Pan-Amazônia, 57,23% do território brasileiro e pertence a nove Estados: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (COURA & JUNQUEIRA, 2012).

Acredita-se que assim como o carnivorismo e o insetivorismo são características importantes à manutenção da enzootia, a presença de hemípteros infectados é proporcional à manutenção da endemia nessas regiões (KRUSE et al., 2004; COURA & JUNQUEIRA, 2012).

Dentro desse contexto, é necessário considerar que, nos Estados Unidos não houve colonização domiciliar pelo vetor em decorrência das suas condições habitacionais, consideradas superiores quando comparadas às sul-americanas e que, portanto, o *T. cruzi* permaneceu exclusivamente no ambiente silvestre, em um intenso ciclo enzoótico, há milhares de anos, ao habitar distintos ecótopos arbóreos e terrestres, em uma relação restrita a parasitos, vetores e reservatórios (ABAD-FRANCH et al., 2007; VALENTE, 2011; COURA & BORGES-PEREIRA, 2012).

Já na Amazônia, historicamente, a perda de biodiversidade decorrente da destruição da vegetação original por ação antrópica; a expansão desordenada das cidades; a aproximação do ser humano ao ambiente silvestre pela caça, pesca ou condição habitacional; a intensa migração de indivíduos das zonas rurais para áreas urbanas; a condição social das populações que ocupam a periferia de grandes cidades; a criação de animais domésticos; a eficiência vetorial, assim como a antropofilização dos hábitos alimentares dos vetores hematófagos são fatores de risco e transformaram a doença de Chagas em uma importante endemia (COURA & DIAS, 2009; COURA & JUNQUEIRA, 2012; SANTOS, 2013).

Para Briceño-León (2009), esse fato deveu-se provavelmente ao processo de sedentarismo das populações que, através da apropriação do meio diante da necessidade de terras para cultivo de alimentos ou exploração dos recursos naturais, propiciou a interação parasito-hospedeiro-ambiente necessária à transmissão ao ser humano.

No Estado do Pará, nas últimas décadas, tem sido frequente a construção de represas, rodovias, a implantação de atividades mineradoras, a extração madeireira, a abertura de novas frentes agropecuárias e a plantação e/ou cultivo de extensas áreas de monocultura, como os açaizeiros (SANTOS, 2013).

Tais atividades constituem-se promotoras de alterações da flora e fauna silvestre e peridoméstica que causam modificações na ecologia dos vetores e dos reservatórios do *T. cruzi*. Ao desalojar e atrair redúvídeos e animais silvestres para ecótopos artificiais, focos zoonóticos residuais tornam-se riscos potenciais para a ocorrência da doença de Chagas humana (COURA & DIAS, 2009; SANTOS, 2013).

Desde o início do século XX, a abundância de vetores triatomíneos e reservatórios mamíferos é reconhecida na Amazônia. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas já havia registrado os primeiros casos de infecção pelo *T. cruzi* na Amazônia brasileira em símios *Saimiri sciureus* capturados no Estado do Pará nos anos iniciais que sucederam a descoberta e a caracterização da doença (CHAGAS, 1924).

Todavia, os primeiros quatro casos agudos humanos autóctones somente foram registrados em 1969, em Belém, no Estado do Pará, por Shaw et al. (1969) e a partir de então, casos autóctones com morbidade e mortalidade, assim como a investigação da presença de *T. cruzi* em diversos mamíferos passaram a ser relatados em número crescente (ALBAJAR et al., 2003; XAVIER et al., 2006; PEREIRA et al., 2010; VALENTE, 2011).

Silveira et al. (2011) apresentaram dados referentes ao inquérito de soroprevalência da infecção chagásica humana, realizado por iniciativa governamental, entre 1975 e 1980, considerado o primeiro estudo com alcance nacional. Nessa pesquisa, a soroprevalência estimada foi de 4,22% da doença para a população geral residente em área rural no país.

Em geral, os Estados amazônicos apresentaram baixos índices de soroprevalência, sendo 0% no Amapá, 0,31% em Roraima, 0,41% em Rondônia, 0,56% no Pará, 1,88% no Amazonas e 2,39% no Acre (CAMARGO et al., 1984).

Embora baixos, esses resultados foram surpreendentes para a Amazônia, uma vez que não existia relato de domiciliação de triatomíneos,

presença do *Triatoma infestans*, que naquele período era o principal transmissor da doença no país, ou qualquer indício de transmissão ativa. No Estado do Acre, aceitou-se que o mais elevado índice de soropositividade seria devido à migração desde áreas endêmicas (SILVEIRA et al., 2011).

Alguns municípios do Alto Rio Negro, localizados no Estado do Amazonas, como Barcelos, Japurá e Novo Airão apresentaram elevadas taxas de soroprevalência, quando comparadas à média nacional (CAMARGO et al., 1984).

No município de Barcelos (AM) esse índice atingiu 12,5% de anticorpos anti- *T. cruzi*. Nesse caso, considerou-se a hipótese de transmissão extradomiciliar por *Rhodnius brethesi*, associada à extração de *Leopoldinia piassaba* ou popularmente denominada de piaçava (COURA et al., 1994a; SILVEIRA et al., 2011).

Ainda no final da década de 1970, a presença de triatomíneos domiciliados em uma área compreendida por 18 Estados comprovou o risco potencial de transmissão vetorial da doença de Chagas, embora, naquele momento, a Amazônia estivesse excluída dessa área de risco (MS, 2005a).

De acordo com um levantamento realizado por Valente (2011) na região amazônica brasileira, até o final da década de 1980, havia a descrição da ocorrência de nove casos de DCA humana no Amapá, seis no Pará, um no Acre e um no Amazonas.

Apesar de toda ocupação desordenada e predatória das últimas décadas, por falta de evidências, considerava-se que na Amazônia brasileira seria incomum a existência de triatomíneos domiciliados, o que equivocadamente seria a única situação para a ocorrência da transmissão do *T. cruzi* ao ser humano (MS, 2005b; COURA & JUNQUEIRA, 2012).

Em 2004, foi fundada a Iniciativa Intergovernamental de Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia (AMCHA), integrada pelos nove países sul-americanos que compõem a Amazônia Internacional, cujo objetivo é controlar a transmissão autóctone e importada, bem como os triatomíneos *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius brethesi*, *R. prolixus* e *R. robustus* (TECHNICAL REPORT, 2006; OPAS, 2010; COURA, 2013).

No entanto, de acordo com Briceño-León (2007), a região amazônica não fazia parte do mapa nosológico para a transmissão da doença de Chagas

até 2005 e foi oficialmente reconhecida como questão de saúde pública somente em 2006 (OPAS, 2006).

De acordo com Ostermayer et al. (2011), um inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil também foi realizado, entre o período de 2001 e 2008, em cerca de 105.000 crianças com idade até cinco anos da área rural brasileira, sendo 0,03% confirmadas infectadas.

Entretanto, sintetizou-se que os resultados para alguns municípios amazônicos como Barcelos e Novo Airão, no Amazonas, Normandia e Bonfim, em Roraima, Santarém e todos os municípios da Ilha de Marajó, no Pará, deveriam ser tratados separadamente, por apresentarem particularidades epidemiológicas (OSTERMAYER et al., 2011).

Valente (2011), utilizando dados referentes do Instituto Evandro Chagas, afirmou que a mais recente casuística da doença de Chagas na Amazônia registrou 1125 casos autóctones, contabilizados entre 1968 e fevereiro de 2011. Destes, 99,1% dos casos foram diagnosticados em fase aguda, sendo que o maior número de casos registrados no período de um ano ocorreu em 2009, cuja notificação correspondeu a 244 casos (21,69% do total).

A distribuição dos casos autóctones ocorreu de maneira que 752 casos foram registrados no Pará (66,85%), 249 casos no Amapá (22,13%), 72 casos no Amazonas (6,40%), 36 casos na pré-Amazônia maranhense (3,20%) e 16 casos no Acre (1,42%) (VALENTE, 2011).

Ainda segundo Valente (2011), até o mesmo período, foram notificados 162 surtos no Brasil, sendo 155 na Amazônia (95,68%) e destes, 125 somente no Estado do Pará (80,65%). Dos casos agudos autóctones registrados na Amazônia, 75,8% estiveram relacionados a algum surto. Além disso, estimou-se que a média foi de 5,21 casos por surto.

Contudo, acredita-se que apesar de frequentes notificações e da realização de dois grandes inquéritos nacionais, o conhecimento da doença Chagas na área amazônica ainda é escasso e sua magnitude ainda não está dimensionada (SANTOS, 2013).

Estudos epidemiológicos afirmaram que a transmissão da DCA na região ocorre, fundamentalmente, no intradomicílio ou peridomicílio, por meio do contato com vetores ou reservatórios infectados; em áreas de coletas de

fibra de piaçava; ou ainda, de maneira acidental, pelo consumo de um alimento contaminado com o parasito (COURA et al., 1995; DIAS et al., 2011; COURA & BORGES-PEREIRA, 2012).

Embora a transmissão oral do *T. cruzi* não se constitua um fato recente (PEREIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; TOSO et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012), Santos (2013) afirmou que a atenção necessária à doença de Chagas na região amazônica e, conseqüentemente, ao Estado do Pará, no Brasil, ocorreu após o surto de transmissão oral por caldo de cana contaminado com *T. cruzi*, no município de Navegantes, em Santa Catarina, em 2005 (STEINDEL et al., 2005).

Esse acontecimento, amplamente divulgado pela mídia, de repercussão internacional, contribuiu fortemente para a mudança de estratégia política e para o fortalecimento da vigilância na Amazônia, ao estabelecer como prioridade a transmissão alimentar da DCA (SANTOS, 2013).

As microepidemias familiares ou multifamiliares de DCA, registradas nos últimos anos, por via oral associadas ao consumo de polpa *in natura* de açaí, possivelmente contaminada nos Estados do Pará e Amapá, demonstraram ainda mais a complexidade do ciclo de transmissão do *T. cruzi* na Amazônia e evidenciaram que as características dessa parasitose adquiriram um novo perfil epidemiológico (VALENTE et al., 2008; PEREIRA et al., 2009).

Segundo Valente (2011), o envolvimento do açaí à transmissão oral da DCA está associado a surtos há algumas décadas. Entre 1998 e 2001, foram notificados 21 casos, sendo dois óbitos, com sintomas que variaram de febre à insuficiência cardíaca, nos municípios de Abaetetuba, Bagre, Belém e Cametá, no Pará e em Santana, no Amapá.

Souza-Lima et al. (2013) descreveram 17 casos de DCA ocorridos no Amazonas em 2010, no qual todos os pacientes haviam consumido produtos derivados de açaí oriundos da área rural de Monte Alegre, próximo à Santa Izabel do Rio Negro.

Em 2011, um surto de DCA foi confirmado pela Secretaria Estadual de Saúde do Amazonas, no município de Carauari, tendo como principal causa o consumo de açaí contaminado em um evento familiar. Na ocasião, as 12 pessoas infectadas residiam em um assentamento do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (Incra), na Estrada do Riozinho, zona rural do

município. Houve relatos de que os caroços de açaí não foram lavados e de que a água utilizada para a diluição da polpa de açaí foi coletada direto da chuva (PROMED, 2011b).

Também em 2011, foi registrado um surto de DCA no município de Ananás, no Tocantins, com o envolvimento de sete indivíduos após a ingestão de suco de juçara (*Euterpe edulis* Martius), uma fruta típica local, geralmente comercializada em feiras livres e utilizada para merenda escolar (PROMED, 2011a).

Teixeira et al. (2001) consideraram que para cada caso de DCA detectado poderiam ser estimados entre 20 e 100 outros casos sem notificação, o que potencializaria a gravidade da infecção na região amazônica.

De acordo com Valente (2011), a via de transmissão alimentar apresenta distribuição espaço-temporal bem definida, independe da colonização domiciliar de triatomíneos e sua ocorrência é regular, com média de 100 casos por ano, cerca de 5% de óbitos e, portanto, de grande importância à saúde pública principalmente dos Estados do Pará, Amapá e Amazonas.

A presença de mamíferos como *Didelphis marsupialis* e triatomíneos como *Rhodnius pictipes* e *Panstrongylus geniculatus* infectados com *T. cruzi* no entorno das residências de pacientes com doença de Chagas durante análises epidemiológicas de microepidemias ocorridas nos municípios de Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari, no Pará, e no município de Santana, no Amapá, reforçaram a importância desses hospedeiros à transmissão da DCA (VALENTE, 2011).

Santos (2013) propõe que reconhecer a diversidade regional e a complexidade do ecossistema amazônico continua indispensável para a compreensão de aspectos ecológicos e epidemiológicos da transmissão da doença na região porque inúmeras observações sugeriram que o seu comportamento é variável de acordo com determinado ambiente e influenciado pelo impacto causado decorrente das atividades humanas.

Esse novo cenário epidemiológico (XAVIER et al., 2014) indica que a adoção de medidas de controle da doença de Chagas amazônica baseada exclusivamente no controle vetorial não é totalmente eficiente (VALENTE et al., 1999; NÓBREGA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009; VALENTE et al., 2009; OPAS, 2010).

Seja pelo fato de a região amazônica ser considerada área endêmica, seja pela mudança na distribuição da doença de Chagas no panorama mundial, o modelo de vigilância vigente até a década de 2000 já não era mais adequado à epidemiologia da doença e necessitava da organização de um modelo de vigilância que se adaptasse ao atual quadro epidemiológico (SANTOS, 2013).

Dessa forma, medidas de prevenção para evitar a doença de Chagas na região amazônica como o reconhecimento dos vetores e reservatórios pela população, seus modos de transmissão e higiene dos alimentos, inseridos em uma educação básica de qualidade, assim como o desenvolvimento de formas de tratamento rápidas, eficazes e de baixo custo, a fim de interromper o ciclo do parasito, devem ser enfatizadas nos próximos anos (OPAS, 2010; DIAS et al., 2011; COURA & JUNQUEIRA, 2012; COURA, 2013).

1.3. Os vetores da doença de Chagas na Amazônia brasileira

Triatomíneos são artrópodes pertencentes à Ordem Hemiptera, Família Reduviidae e Subfamília Triatominae (SANTOS-MALLET, 2000).

Possuem diversas denominações, sugeridas por observações indígenas ou populares, a partir de aspectos morfológicos e hábitos variados no Brasil. São eles: baratão, barbeiro, bicho-de-parede, bicho-de-parede preto, bicimo, bicudo, bruxa, cafeco, cafote, cascudo, chupança, chupão, chupa-pinto, fincão, furão, percevejo, percevejo-do-sertão, percevejo francês, percevejo gaudério, percevejo grande, piolho de piaçava, procotó, prorocotó, quiche do sertão, rondão ou vum-vum (LENKO & PAPAVERO, 1979; SANTOS-MALLET, 2000).

Em outros países das Américas podem ser reconhecidos também como *blood-sucking cone nose* ou *kissing bug* nos Estados Unidos; *chinchorro* no Equador; *chinha-voladora* no México; *chipó* na Colômbia e Venezuela; *chupón* na Venezuela e *vinchuca* na Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai (LENKO & PAPAVERO, 1979; SANTOS-MALLET, 2000).

Geralmente a maioria é silvestre, mas podem ocorrer também em ambientes peridomiciliares ou intradomiciliares. Entre seus principais habitats silvestres estão as tocas de animais; ninhos de aves, carnívoros, edentados, marsupiais ou roedores; rochas e muros de pedras; cascas ou buracos de árvores, palmeiras ou bromélias. Já no peridomicílio podem ocorrer no mesmo

habitat de animais domesticados como coelhos, porcos, além de currais, estábulos, galinheiros ou pombais (NOIREAU et al., 2005; ARGOLO et al., 2008).

Sabe-se que o processo de domiciliação de triatomíneos é contínuo, corresponde à atração de hemípteros à luz das residências, dado seu fototropismo positivo, podendo ocorrer um intenso processo de colonização e adaptação domiciliar e peridomiciliar de vetores e parasitos. É geralmente dependente das condições precárias de moradia, falta de higiene e/ou saneamento básico, seguido pelo desaparecimento de espécimes do ambiente silvestre (FORATTINI, 1980).

No ambiente intradomiciliar têm preferência por lugares escuros atrás de móveis, objetos ou dentro de fendas nas paredes (NOIREAU et al., 2005; ARGOLO et al., 2008).

Além disso, o grau de domiciliação de triatomíneos, por sua vez, dependerá da competência do vetor em encontrar abrigo e fonte alimentar para o seu repasto sanguíneo (FORATTINI, 1980).

São insetos de grande porte. Os adultos medem de um a quatro centímetros de comprimento e apresentam hemimetabolia. São fundamentalmente neotropicais, a maioria é terrestre, possuem hábitos noturnos, comportamento gregário e ciclo de vida de até dois anos. Os triatomíneos tendem a voar pouco, embora as fêmeas sejam mais ativas do que os machos e apresentam maior capacidade de dispersão (ARGOLO et al., 2008).

As fêmeas são ovíparas e apresentam um período de três a quatro meses de oviposição. Os ovos são grandes, com aproximadamente dois milímetros de comprimento e a postura acontece de 20 a 30 dias após a fecundação. O número de ovos varia de acordo com a espécie e é dependente de fatores como temperatura, umidade e disponibilidade de alimento. Há cinco estádios ninfais não alados e o dimorfismo sexual ocorre somente nos adultos (ARGOLO et al., 2008).

Quanto aos hábitos alimentares, apresentam aparelho bucal picador-sugador, a maioria é fitófaga, mas existem também espécies predadoras ou hematófagas (ARGOLO et al., 2008).

As espécies hematófagas possuem saliva anticoagulante, vasodilatadora e anestésica, o repasto sanguíneo é preferencialmente noturno, com duração de cerca de 20 minutos e pode causar reação alérgica seguida de prurido no hospedeiro. Por serem hematófagos obrigatórios, machos e fêmeas dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* são os mais importantes do ponto de vista médico-veterinário, sendo vetores biológicos do *T. cruzi* (ARGOLO et al., 2008).

Sabe-se que das 141 espécies de triatomíneos conhecidas, 63 espécies já foram identificadas no país em estratos florestais de todos os biomas (MS, 2014) e que o Brasil reúne condições ambientais favoráveis à adaptação vetorial e ao risco de transmissão da doença de Chagas (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012).

Apesar de todas serem consideradas vetoras em potencial, segundo o Consenso Brasileiro em doença de Chagas, há diferenças na competência vetorial entre as espécies e somente algumas delas oferecem perigo para a transmissão de *T. cruzi* ao homem, como por exemplo, *Panstrongylus geniculatus*, *P. herreri*, *P. megistus*, *Rhodnius neglectus*, *R. pictipes*, *R. robustus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans*, *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (MS, 2005a).

Comparada à sua abundância, os estudos de triatomíneos da região amazônica brasileira ainda são escassos e referem-se principalmente aos seus hábitos alimentares e à taxa de infecção natural por tripanosomas (VALENTE, 2008; VALENTE, 2011; ROQUE et al., 2013; SANTOS, 2013).

Na Amazônia brasileira, desde 1942, já foram identificadas inúmeras espécies de triatomíneos infectadas com *T. cruzi*, entre elas *Eratyrus mucronatus*, *Microtriatoma trinidadensis*, *P. geniculatus*, *P. lignarius*, *P. paraensis*, *P. rufotuberculatus*, *R. brethesi*, *R. neglectus*, *R. pictipes* e *R. robustus* (COURA & JUNQUEIRA, 2012).

Valente (2011) analisou 3279 triatomíneos capturados em áreas de microepidemias de DCA nos Estados do Pará e Amapá e verificou taxas de infecções variáveis por *T. cruzi* em *E. mucronatus* e *P. geniculatus* (50%), *R. robustus* (76%) e *T. rubrofasciata* (30,46%).

Nesse estudo, Valente (2011) afirmou que as palmeiras foram os principais ecótopos dos triatomíneos, com taxas de infestações variando entre 1,87% e 47,41% de acordo com a espécie de palmeira analisada.

Entretanto, principalmente no Estado do Pará, a transmissão da doença de Chagas está relacionada geralmente a *P. geniculatus*, *R. pictipes* e *R. robustus*, que apresentam tanto níveis variáveis de infecção por *T. cruzi* como também de invasão e/ou colonização domiciliar, cujo processo se dá quando o inseto é atraído pela luz residencial essencialmente em busca de uma fonte alternativa de alimento, dadas as alterações antrópicas ao ambiente silvestre (COURA et al., 1994b; COURA et al., 2002; VALENTE, 2008; VALENTE, 2011).

1.3.1. *Rhodnius pictipes*

Rhodnius pictipes (Stål, 1872) é uma espécie de triatomíneo com ampla distribuição geográfica e boa capacidade de dispersão. Ela já foi descrita em 36 ecorregiões da Amazônia e relaciona-se diretamente com algumas espécies de palmeiras da Família Arecaceae como babaçu (*Orbignya speciosa*), bacaba (*Oenocarpus bacaba*), dendê (*Elaeis melanococca*), inajá (*Maximiliana regia*), piaçava (*Attalea funifera* e *Leopoldinia piassaba*) e urucuri (*Scheelea martiana*), que constituem seus habitats preferenciais (GALVÃO et al., 2003; VALENTE, 2008; VALENTE, 2011).

Essas palmeiras localizam-se em ambientes florestais ou rurais, possuem, em média, 10 metros de altura, grande quantidade de matéria orgânica, anatomia favorável à proliferação de hemípteros, sendo frequentemente encontradas infestadas. Elas atuam como fonte de abrigo para espécimes de *Rhodnius* em vários biomas do continente americano e constituem um importante indicador de risco ecológico para a ocorrência de triatomíneos na região amazônica (ROMAÑA et al., 1999; ABAD-FRANCH et al., 2007; ABAD-FRANCH et al., 2010).

R. pictipes apresenta fototropismo positivo e, nas últimas décadas, tem sido também capturado com frequência em habitações humanas, geralmente infectado com *T. cruzi* (VALENTE et al., 2009; VALENTE, 2011).

Entre 1995 e 2005, *R. pictipes* foi o vetor mais capturado em ecótopos nos Estados do Amapá e do Pará (VALENTE, 2008; VALENTE et al., 2009).

Valente (2011) demonstrou a presença de 56,9% de *R. pictipes* infectados com *T. cruzi* em áreas de microepidemias de DCA em Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari, no Pará e em Santana, no Amapá.

Santos (2013) afirmou que *R. pictipes* foi a espécie mais abundante (85,2%) encontrada em ecótopos silvestres do município de Abaetetuba (PA), alimentando-se principalmente com sangue de marsupiais, roedores e presença de *T. cruzi* correspondente a 11,26%, o que contribui consideravelmente para a manutenção do ciclo silvestre do parasito.

O estudo demonstrou que se trata do vetor mais importante naquela região, sugeriu que a dinâmica da transmissão local da doença de Chagas não depende da domiciliação do triatomíneo e indicou, em um modelo eco-epidemiológico, forte associação de risco para a doença em indivíduos que tem contato com palmeiras infestadas por triatomíneos infectados (SANTOS, 2013).

1.4. Os reservatórios da doença de Chagas na Amazônia brasileira

Há, na literatura científica, diversas Ordens de mamíferos já encontradas parasitadas pelo *T. cruzi*: Artiodactyla, Carnivora, Chiroptera, Cingulata, Edentata (Xenathra), Marsupialia (Didelphimorphia), Primates e Rodentia (LISBOA et al., 2009; COURA & JUNQUEIRA, 2012).

Além do ser humano, já foram registradas a descrição de mais de 200 outras espécies de mamíferos com presença de *T. cruzi*, entre eles marsupiais como *Didelphis* sp., *Marmosa* sp. e *Philander* sp.; roedores como *Akodan* sp., *Hydrochoerus* sp., *Nectomys* sp., *Neotoma* sp., *Proechymis* sp. e *Rattus* sp.; carnívoros como *Euphractus* sp., *Nasua* sp., *Procyon* sp., *Sus* sp., *Tayra* sp. e *Urocyon* sp.; quirópteros como *Artibeus* sp. e primatas como *Aotus* sp., *Cebus* sp., *Leontocebus* sp., *Leontopithecus* sp. e *Saimiri* sp. (COURA & JUNQUEIRA, 2012; COLTRYP, 2014).

O Brasil ocupa posição estratégica dentro da América do Sul, não somente pelo clima tropical, mas principalmente por apresentar grande diversidade de mamíferos suscetíveis ao *T. cruzi* (KEESING et al., 2006; ROQUE et al., 2008).

A lista de hospedeiros mamíferos é extensa, apresentam taxas variáveis de infectividade de até 80% e a variação genética dos parasitos pode ser encontrada nos diferentes biomas brasileiros como Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (ARAÚJO et al., 2011).

Pequenos mamíferos terrestres ou arborícolas encontrados próximos ao homem como cães, gatos, ratos, gambás, tatus ou morcegos têm uma maior importância epidemiológica porque, quando infectados, sua alta parasitemia pode aumentar o risco de infecção humana por meio da transmissão vetorial, cujo sangue serve de alimento aos triatomíneos e como elo entre o ambiente silvestre e o ambiente domiciliar (DIAS, 2007; SANTOS, 2013).

Entretanto, ainda que as aves e animais pecilotérmicos sejam refratários ao *T. cruzi*, estudos epidemiológicos demonstraram que as aves domésticas apresentam relevância na dinâmica de transmissão da infecção ao homem, pois, frequentemente, servem como fonte de alimentação para os triatomíneos no peridomicílio (MS, 2005b; COURA & DIAS, 2009).

Na Amazônia brasileira, as palmeiras representam um ecossistema único e abrigam, além de vetores, uma grande diversidade de reservatórios, tais como marsupiais, quirópteros e roedores (ABAD-FRANCH & MONTEIRO, 2007; GURGEL-GONÇALVES, 2008; GURGEL-GONÇALVES et al., 2012).

A transmissão enzoótica de *T. cruzi* entre mamíferos silvestres tem sido caracterizada pela presença de *Chiropotes satanas*, *Dasypus novencinctus*, *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum*, *Saimiri sciureus* e *Tamandua tetradactyla* parasitados com *T. cruzi* (DEANE, 1984; VALENTE et al., 1992).

Contudo, Santos (2013) citou que a probabilidade da transmissão de *T. cruzi* a um mamífero é pequena e dependente de contatos abundantes entre o triatomíneo e o homem, quando comparado às vias de transmissão de outros patógenos.

Apesar disso, os marsupiais além de considerados os mais importantes reservatórios, são ao mesmo tempo vetores da doença de Chagas, uma vez que possuem comprovadamente tripomastigotas metacíclicos no lúmen de suas glândulas anais e circulam tanto entre o ambiente silvestre, peridoméstico e doméstico à procura de alimento (DEANE et al., 1984; JANSEN et al., 1999).

Valente (2011) demonstrou uma taxa de infecção de 7,14% em mamíferos infectados com *T. cruzi*, entre eles *Didelphis marsupialis*, *Marmosa*

cinerea, *Metachirus nudicaudatus*, *Oecomys bicolor*, *Oryzomys macconnelli*, *Philander opossum* e *Rattus rattus*, todos capturados em áreas de microepidemias de DCA nos Estados do Pará e Amapá.

Dessa forma, o estudo da interação do *T. cruzi* com marsupiais é fundamental, pois tem contribuído não somente com novos dados sobre a biologia e ecologia do parasito, como também para melhor entendimento da complexidade do ciclo biológico do *T. cruzi* em áreas de DCA na região amazônica (MS, 2005b).

1.4.1. *Philander opossum*

Philander opossum (Linnaeus, 1758) é um marsupial da Família Didelphidae, popularmente conhecido como cuíca-verdadeira ou cuíca-de-quatro-olhos. É encontrado em florestas tropicais do continente americano, especialmente do México à Argentina (WILSON & REEDER, 2005; LEW et al., 2006; FLORES et al., 2008).

O tamanho do seu corpo é de aproximadamente 30 centímetros de comprimento, apresenta cauda longa com pelos em sua base, dorso cinza-escuro, com membros inferiores e manchas acima dos olhos com coloração amarelo-claro (WILSON & REEDER, 2005; LEW et al., 2006; FLORES et al., 2008).

Podem construir ninhos nos ramos de árvores entre oito e 10 metros de altura, sobre árvores caídas, ocas no solo ou ocasionalmente em tocas abandonadas por outros animais. O ninho possui aproximadamente 30 centímetros de diâmetro e seu território pode atingir até 300 metros quadrados (WILSON & REEDER, 2005; LEW et al., 2006; FLORES et al., 2008).

As fêmeas podem gestar de dois a sete filhotes. São onívoros e sua alimentação consiste basicamente na predação de pássaros pequenos, caranguejos, rãs, insetos, lagartos, roedores ou ingestão de frutas (WILSON & REEDER, 2005; LEW et al., 2006; FLORES et al., 2008).

São pequenos, porém ágeis e apresentam comportamento de ataque quando ameaçados. Podem correr, subir em árvores, mostrar os dentes, que são capazes de cortar a pele e provocar dor e sangramento no ser humano (WILSON & REEDER, 2005; LEW et al., 2006; FLORES et al., 2008).

Entre outras espécies já descritas estão *Philander andersoni*, *P. deltae*, *P. frenatus*, *P. mcilhennyi*, *P. mondolfii*, *P. olrogi*, *P. opossum canus*, *P. opossum fuscogriseus*, *P. opossum melanuris* e *P. opossum opossum* (WILSON & REEDER, 2005; LEW et al., 2006; FLORES et al., 2008).

Segundo Coura & Junqueira (2012) há registros de *P. opossum* identificados com *T. cruzi* desde 1958.

Um levantamento realizado por Valente (2008) demonstrou que, de 145 mamíferos investigados nos Estados do Pará e Amapá, 23,45% deles eram *P. opossum*, o segundo mais capturado. Enquanto a taxa de infecção total dos mamíferos infectados por *T. cruzi* foi de 68,96%, verificou-se que 70,58% dos *P. opossum* apresentavam *T. cruzi*.

Roque et al. (2013) determinaram que *P. opossum* foi o mamífero mais abundante coletado no município de Abaetetuba (PA), com 57% de positividade para *T. cruzi* em hemoculturas. Esse estudo afirmou também que o potencial de esses hospedeiros infectar vetores difere significativamente de acordo com o grau de uso da terra, cuja maior estimativa verificada entre as áreas estudadas foi para a Ilha de Ajuai (64%).

1.5. Municípios de estudo

Abaixo serão descritas características acerca de Belém e Abaetetuba, dois municípios localizados no Estado do Pará, na região Norte do Brasil, envolvidos diretamente nessa pesquisa.

1.5.1. A capital Belém

O município de Belém está situado no Estado do Pará, pertence à mesorregião metropolitana de Belém e à microrregião Belém. Está localizado a 01°27'20" de latitude sul e 40°30'15" de longitude oeste (BELÉM, 2014a), de acordo com a figura 1 (GOOGLE SATÉLITE, 20014c).

De acordo com dados oficiais (BELÉM, 2014a), Belém limita-se ao norte pela Baía do Marajó, a leste pelos municípios de Ananindeua, Santo Antônio do Tauá e Santa Bárbara, ao sul pelo município de Acará e a oeste pela Baía do Guajará e Baía do Marajó, como na figura 2 (GOOGLE SATÉLITE, 20014e).



Figura 1. Visualização aérea e limite geográfico do município de Belém, no Estado do Pará, Brasil.



Figura 2. Visualização aérea do município de Belém, no Estado do Pará, Brasil.

Possui área territorial de 1.059.406 quilômetros quadrados, população estimada em 1.425.922 habitantes e densidade demográfica aproximada de 1.315,26 habitantes por quilômetro quadrado (IBGE, 2014b).

O clima é quente e úmido, característico de floresta tropical, com precipitação média anual em torno de 2.800 milímetros. A temperatura média é de 25°C nos meses de fevereiro e 26°C em novembro (BELÉM, 2014a).

A cobertura vegetal compõe-se de florestas secundárias ou capoeiras que substituíram a antiga floresta densa dos baixos platôs. A vegetação dos mangues acompanham as porções fluviais e semilitorâneas do setor estuarino, a floresta ombrófila predomina nos tratos marginais dos cursos d'água e nas baixadas prevalecem formações herbáceas, subarbustivas e arbustivas (BELÉM, 2014a).

Nas últimas décadas, houve considerável alteração da cobertura vegetal observada no município, principalmente devido à velocidade do desmatamento, à crescente ocupação urbana e à dilapidação das florestas remanescentes (BELÉM, 2014a).

Atualmente, as áreas de matas preservadas são muito restritas em Belém, porém como matas do tipo capoeira ainda são observadas na periferia do município, é possível verificar a presença de triatomíneos, roedores e marsupiais, que apresentam fundamental papel no ciclo biológico do *T. cruzi* (VALENTE, 2011).

Os principais acidentes geográficos do município são as baías de Marajó ao norte e a oeste e Guajará a oeste (BELÉM, 2014a).

Na baía de Guajará deságua o rio Guamá que, em conjunto, contribui para a conformação peninsular do município, além dos igarapés, Bacuri, Val-De-Cans, Una e o furo do Maguari que separa a Ilha de Caratateua (Outeiro) do continente (BELÉM, 2014a).

Na foz do rio Guamá, aparecem três grandes ilhas: Combu, Grande ou Paulo Cunha e Marinheiro (BELÉM, 2014a).

A topografia de Belém é baixa e pouco variável, atingindo 25 metros na Ilha de Mosqueiro, ponto de altitude máxima (BELÉM, 2014a).

A parte urbana possui grandes áreas abaixo de quatro metros, denominadas “baixadas de Belém” que, frequentemente, sofrem influência das

marés altas e apresentam dificuldades no escoamento das águas da chuva (BELÉM, 2014a).

A economia do município é impulsionada pelo comércio, extrativismo vegetal, indústria, pesca e turismo (BELÉM, 2014a).

Sabe-se que o Estado do Pará é o maior produtor e consumidor mundial de açaí (CONAB, 2010) e que, a grande região de Belém, no período da safra, comercializa aproximadamente 470 mil litros de polpa de açaí diariamente, *in natura* ou congelado (SAGRI, 2011).

Segundo Valente (2008), entre 1995 e 2005, foram registrados 26 surtos de DCA com 86 casos humanos confirmados somente em Belém.

Entretanto, de 2005 a 2012, Belém foi o município que mais registrou casos autóctones (XAVIER et al., 2014) e notificações de DCA, concentrando cerca de 20% dos casos de todo o Estado (SANTOS, 2013) e, somado ao fato de localizar-se na região amazônica brasileira, constitui-se área de grande interesse para a pesquisa em doenças negligenciadas, em especial ao estudo da doença de Chagas.

1.5.1.1. Val-De-Cans

Val-De-Cans ou Val-de-Cães é um bairro localizado na zona oeste da cidade de Belém, Estado do Pará. Apresenta uma área periurbana com 870,2 hectares (Figura 3), floresta tropical remanescente (GOOGLE SATÉLITE, 20014f) e uma população com cerca de sete mil habitantes (IBGE, 2014b).

O nome Val-De-Cans originou-se de uma região localizada em Portugal e consta em documentos desde a medição e demarcação de légua patrimonial do Conselho do Senado e da Câmara de Belém, em 20 de agosto de 1703 (INFRAERO, 2014).

A fazenda Val-De-Cans foi deixada em testamento por D. Maria Mendonça aos padres Mercedários em 1675. Posteriormente, por Carta Régia de 1798, foi autorizado o sequestro e venda dos bens dos padres, logo após comercializado por terceiros (INFRAERO, 2014).

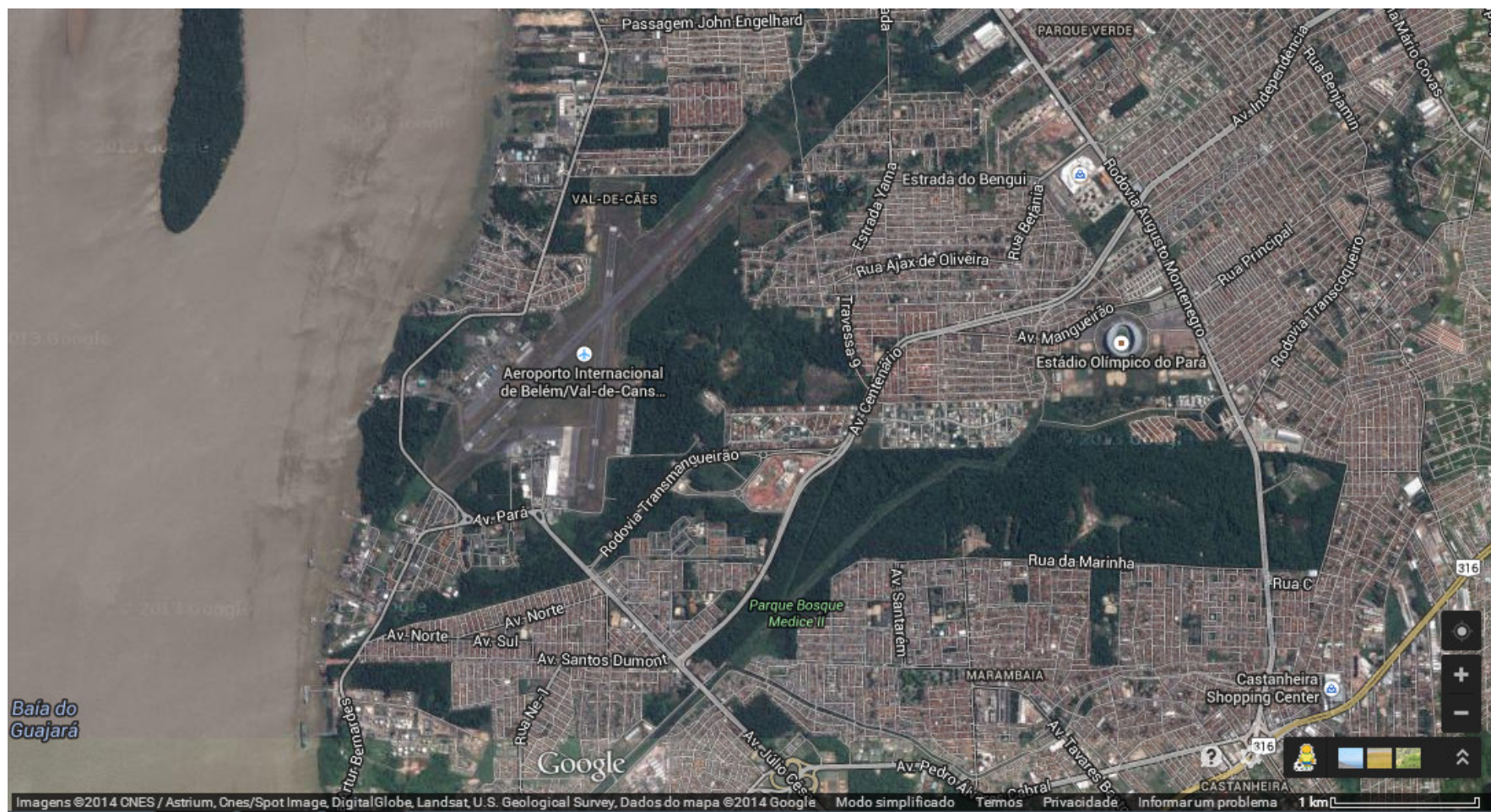


Figura 3. Visualização aérea da mata do bairro de Val-De-Cans, no município de Belém, no Estado do Pará, Brasil.

Em 1934, o General Eurico Gaspar Dutra, Diretor da Aviação Militar, designou o Tenente Armando Serra de Menezes para escolher em Val-de-Cans um terreno onde seria construído um aeroporto (INFRAERO, 2014).

Com a eclosão da II Guerra Mundial, o aeroporto passou a ser rota vital e estratégica para milhares de aviões que, saindo das fábricas do Canadá e Estados Unidos, seriam trasladados para os teatros de operações no norte da África e na Europa (INFRAERO, 2014).

Val-De-Cans e outras bases aéreas utilizadas pelos americanos na II Guerra Mundial foram entregues ao Ministério da Aeronáutica em 1945 (INFRAERO, 2014).

A primeira estação de passageiros para uso geral das companhias de aviação construída pelo Ministério da Aeronáutica, em Belém, foi em 1958. Contudo, apenas em 13 de abril de 2010, pela Lei 12.228, sancionada pela Presidência da República do Brasil, passou a denominar-se Aeroporto Internacional de Belém/Val-De-Cans/Júlio Cezar Ribeiro (INFRAERO, 2014).

Recentemente, um estudo identificou 21,43% de triatomíneos infectados com Tcl em Val-de-Cães (XAVIER et al., 2014).

1.5.1.2. A Ilha do Combu

A ilha do Combu faz parte do Arquipélago do Combu que, por sua vez, pertence à Belém, no Estado do Pará, dentro dos limites do Distrito Administrativo do Outeiro (DAOut), povoado por pouco mais de dois mil habitantes permanentes (BELÉM, 2014b).

Está situada à margem esquerda do rio Guamá, a 1,5 quilômetros ao sul da capital paraense, de acordo com a figura 4 (GOOGLE SATÉLITE, 20014d).

Suas características estão inseridas dentro do panorama paisagístico-ambiental e humano-amazônico que, em associação à sua beleza e bucolismo, atraem também muitos turistas e pesquisadores (BELÉM, 2014b).

Sua população é denominada parte integrante da comunidade ribeirinha. A ilha compreende uma área calculada por triangulação e integração gráfica de 15 quilômetros quadrados. O ecossistema sofre influência direta das marés dos rios. Durante o período de dezembro a abril, há constantes inundações, daí a caracterização do solo de várzea (BELÉM, 2014b).



Figura 4. Visualização aérea da Ilha do Combu, pertencente ao município de Belém, no Estado do Pará, Brasil.

O interesse pela ilha chegou até aos poderes públicos através de várias iniciativas municipais e estaduais, como a transformação da ilha em Área de Proteção Ambiental (APA), através da Lei nº 6.083, de 13 de novembro de 1997. A Lei diz que, em respeito ao manejo, implantação e funcionamento, podem ser utilizados instrumentos legais para incentivos financeiros governamentais a fim de proteger o uso racional dos recursos naturais, impedir atividades causadoras de sensível degradação da qualidade de vida ambiental, principalmente derrubada de açazeiro, para comércio do palmito (BELÉM, 2014b).

Um estudo recente identificou que, na Ilha do Combu, 15,32% de triatomíneos, 60% de marsupiais e 4,26% de cães estavam infectados com tripanosomatídeos (XAVIER et al., 2014).

1.5.2 O município de Abaetetuba

Abaetetuba é um município situado no Pará e pertence à mesorregião do noroeste paraense, microrregião de Cametá. Contém áreas de terra firme e cerca de 80 ilhas formadas por terras semi-inundadas em função das marés, podendo ser acessado o ano todo via terrestre ou fluvial. Sua sede localiza-se à latitude 01°43'05" sul e à longitude 48°52'57" oeste, a 10 metros de altitude. Segundo o IBGE (2014a), apresenta área territorial de 1.610,606 quilômetros quadrados, como apresentado na figura 5 (GOOGLE SATÉLITE, 20014a).

Está próximo à Baía de Marajó, por ele passam os rios Pará e Capim e dista 60 quilômetros da capital Belém (ROGEZ, 2000).

Sua população foi estimada em 147.267 habitantes, fundamentalmente residente em zonas urbanas ou ilhas constituídas de mata nativa ou modificada, cuja densidade demográfica é de 87,61 habitantes por quilômetro quadrado (IBGE, 2014a).

Apresenta clima muito úmido, altas temperaturas, baixa amplitude térmica, ventos e precipitações variáveis. O período chuvoso estende-se de janeiro a julho, sendo de fevereiro a abril os meses com maiores volumes pluviométricos e entre outubro e novembro os meses com as menores taxas de precipitação (VALENTE, 2011).



Figura 5. Visualização aérea e limite geográfico do município de Abaetetuba, no Estado do Pará, Brasil.

A cidade cresceu às margens do Rio Maratauíra (ou Meruú), um dos afluentes do Rio Tocantins. A cobertura vegetal original era representada pela Floresta Hileiana de grande porte, uma floresta densa de terra firme, que recobria a maior parte do município indistintamente. Atualmente, ela é praticamente inexistente e há predominância de uma floresta secundária, intercalada com cultivos agrícolas (VALENTE, 2011).

Já as áreas de várzea apresentam sua vegetação característica, com espécies umbrófilas latifoliadas, intercaladas com palmeiras, dentre as quais se destaca o açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) com grande importância para as populações ribeirinhas (ROGEZ, 2000).

Esse município tem sua atividade econômica baseada na agricultura de subsistência. Grande parte da população ribeirinha beneficia-se da extração da polpa de açaí para o consumo próprio ou para a venda no comércio local ou regional há décadas, sendo considerado o segundo maior fornecedor de açaí para dentro e fora do Estado. Adicionalmente, há uma parcela da população paraense que se expõe a áreas de zona rural ou silvestre para o cultivo da agricultura de subsistência ou extrativismo vegetal de outros produtos, mesmo frente à globalização (VALENTE et al., 1999; ROGEZ, 2000; COURA, 2007; DIAS, 2007; SANTOS, 2013).

Sabe-se que, entre 1995 e 2005, Abaetetuba foi o segundo município do Pará com o maior número de casos de DCA. Nesse período, houve seis surtos de DCA com 40 casos humanos confirmados (VALENTE, 2008).

No período de 2005 a 2012, Abaetetuba foi responsável pela notificação de aproximadamente 20% dos casos agudos da doença de Chagas do Pará e uma incidência de 41,93/100.000 habitantes em 2012. Além disso, em Abaetetuba, assim como em outras áreas do Estado, a maioria dos surtos esteve associada ao consumo de polpa de açaí e a relatos frequentes da ocorrência de triatomíneos no interior das residências em áreas urbanas, rurais e ilhas (NÓBREGA et al., 2009; SANTOS, 2013).

Para o mesmo período, Santos (2013) apontou uma letalidade causada por DCA em Abaetetuba de 2,17%, sendo todos os óbitos associados à transmissão oral. Esses resultados foram semelhantes à letalidade de 2,13% estimada para toda a região amazônica, decorrente de microepidemias alimentares (VALENTE, 2011).

1.5.2.1. Ajuai

A ilha de Ajuai está localizada no município de Abaetetuba (PA) e situada à latitude 01°44'55.8" sul e à longitude 49°04'04.1" oeste. Sua população está estimada em cerca de três mil habitantes (SANTOS, 2013).

Apresenta os rios Alto Ajuai, Baixo Ajuai, Ajuazinho, Riozinho, Rio Abaeté e Igarapé Mujumiri, conforme sugerido na figura 6 (GOOGLE SATÉLITE, 20014b).

É uma área de várzea que apresenta vegetação característica contendo espécies umbrófilas latifoliadas intercaladas com palmeiras (SANTOS, 2013).

Dentre as palmeiras, destaca-se o açaí que está presente em 55% do território. Além de possuir relevância econômica e cultural para as populações locais, representam um ecossistema singular para triatomíneos e reservatórios, responsáveis pela manutenção do ciclo biológico do *T. cruzi*. Em agosto de 2010, houve notificação de DCA no referido município, caracterizando-a como importante área de surto (ROGEZ, 2000; VALENTE, 2008; SANTOS, 2013).

Segundo Santos (2013), a espécie de reduvídeos predominante nessa região é a *R. pictipes*, seguida por *P. geniculatus*, ambas já encontradas infectadas com *T. cruzi*. O estudo afirmou que as taxas de infectividade não apresentaram diferença significativa ao se comparar ambientes rurais e ilhas às áreas urbanas.

Por outro lado, na Ilha de Ajuai, a ocorrência da fauna triatomínica em palmeiras foi mais expressiva que em outras áreas analisadas anteriormente e esse fato se deve ao menor grau de antropização do ambiente, geralmente decorrente de atividades humanas de subsistência (VALENTE, 2008; VALENTE, 2011; SANTOS, 2013).



Figura 6. Visualização aérea dos principais rios do município de Abaetetuba, no Estado do Pará, Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a possibilidade de transmissão oral da doença de Chagas aguda por ingestão de polpa *in natura* de açaí contaminada com *T. cruzi* I (TcI) proveniente de triatomíneos e reservatório de diferentes localidades da região amazônica brasileira, Estado do Pará, Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência do uso do camundongo isogênico imunodeficiente B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag) como alternativa para o estudo da DCA, mediante infecções experimentais, via intraperitoneal, com diferentes doses de formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (TcII);
- Avaliar a virulência de TcI obtidos de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans (PA), *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (PA), *Rhodnius* sp. da Ilha do Combu (PA) e *Philander opossum* da Ilha do Combu (PA), mediante infecções experimentais com diferentes doses de formas tripomastigotas e vias de administração, em hospedeiros isogênicos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag);
- Comparar a virulência entre *T. cruzi* obtidos de triatomíneos e reservatório de diferentes localizações na região amazônica brasileira (TcI) e a cepa Y (TcII), mediante infecções experimentais, via intraperitoneal, com diferentes doses de formas tripomastigotas em hospedeiros isogênicos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag);
- Comprovar *in vivo* a importante evidência eco-epidemiológica relacionada à transmissão oral da DCA pela ingestão de polpa *in natura* de açaí contaminada com TcI proveniente de triatomíneos e reservatórios infectados da região amazônica brasileira, mediante infecções experimentais, por diferentes vias de administração, em

camundongos isogênicos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag).

- Comparar os dados experimentais obtidos com estudos eco-epidemiológicos sobre a doença de Chagas aguda de transmissão alimentar realizados na região amazônica brasileira, especialmente no Estado do Pará.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. *Trypanosoma cruzi*

Para a padronização do estudo, foram utilizadas formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (TcII), mantidas *in vivo* em camundongos isogênicos imunocompetentes CBA/J Unib, em unidades mini-isoladoras, do Centro Multidisciplinar para a Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (Cemib/Unicamp).

Para os ensaios experimentais, os protozoários foram provenientes do Estado do Pará e obtidos da Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores, da Fundação Oswaldo Cruz (ColTryp - Fiocruz).

De acordo com a tabela 1, foram utilizados *T. cruzi* (TcI) obtidos de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans, Amazônia, área de surto, Belém (COLTRYP00065 IROD/BR/2009/BARBEIRO); de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai, Amazônia, área de surto, Abaetetuba (COLTRYP00112 IRHO/BR/2008/BARBEIRO); de *Rhodnius* sp. da Ilha do Combu, Amazônia, Belém (COLTRYP00423 IRHO/BR/2011/BARBEIRO) e de *Philander opossum* da Ilha do Combu, Amazônia, Belém (COLTRYP00462 MPHL/BR/2011/CUÍCA) (COLTRYP, 2014).

Após coleta, identificação e armazenamento, os parasitos foram retirados do nitrogênio líquido (-196°C) e cultivados em meio bifásico *Liver Infusion Tryptose* (LIT) e *Neal, Novy e Nicolle* (NNN) (COLTRYP, 2014).

Seguida a avaliação de sua viabilidade *in vitro*, formas tripomastigotas foram inoculadas e mantidas *in vivo* por meio de repiques sucessivos em camundongos isogênicos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag), mantidos em unidades microisoladoras, no Cemib/Unicamp.

Posteriormente, os parasitos foram utilizados para a contaminação experimental da polpa de açaí.

Tabela 1. Identificação das amostras de *T. cruzi* utilizadas durante o estudo, incluindo código internacional, dados do hospedeiro, classificação e procedência.

| Código internacional | Hospedeiro | DTU | Bioma | Município (PA) | Localização |
|--|--------------------------|-----|----------|----------------|---------------------|
| COLTRYP00065 IROD/BR/2009/ BARBEIRO | <i>Rhodnius pictipes</i> | Tcl | Amazônia | Belém | Mata do Val-De-Cans |
| COLTRYP00112 IRHO/BR/2008/ BARBEIRO | <i>Rhodnius pictipes</i> | Tcl | Amazônia | Abaetetuba | Rio Ajuai |
| COLTRYP00423 IRHO/BR/2011/ BARBEIRO | <i>Rhodnius</i> sp. | Tcl | Amazônia | Belém | Ilha do Combu |
| COLTRYP00462 MPHL/BR/2011/ CUÍCA | <i>Philander opossum</i> | Tcl | Amazônia | Belém | Ilha do Combu |

3.2. O modelo animal

As infecções experimentais foram realizadas em camundongos isogênicos imunodeficientes da linhagem B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag), provenientes de colônias do Cemib/Unicamp, machos e fêmeas, entre oito e 12 semanas de idade, com peso médio de 30g.

Foram utilizados até 12 animais por grupo experimental, com aumento do “n” em grupos críticos.

Todos os procedimentos que utilizaram animais obedeceram à Lei 11.794 (2008), de acordo com protocolo experimental nº 2180-1 submetido à Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA/Unicamp) e aprovado em 30 de Junho de 2010 (Anexo 9.1).

3.3. A polpa de açaí

Polpa *in natura* de açaí média ou regular (11% a 14% de sólidos - tipo B) (BEZERRA, 2007) foi adquirida do comércio local de Belém (PA), mantida em *freezer* a -20°C, descongelada no momento do uso à temperatura ambiente e distribuída em alíquotas de 50mL em câmara de fluxo laminar.

3.4. O inóculo

A seguir estão descritas a composição dos inóculos utilizados para os estudos da virulência do *T. cruzi* de diferentes localidades da região amazônica, bem como os inóculos utilizados para os testes da virulência do *T. cruzi* em contato com a polpa *in natura* de açaí.

3.4.1. Controle negativo

Um volume correspondente a 100µL de polpa *in natura* de açaí foi administrado pelas vias intraperitoneal, gavagem ou oral a camundongos isogênicos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag).

3.4.2. Controle positivo

Diferentes doses de formas tripomastigotas (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 ou 10^5) de *T. cruzi* (Tcl ou TcII) contidas em volumes de 100µL, obtidas de diferentes fontes e localidades, foram administradas pelas vias intraperitoneal, gavagem ou oral a camundongos isogênicos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag).

3.4.3. Grupos teste

Volumes de 100µL de polpa *in natura* de açaí contaminada com 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram administrados pelas vias intraperitoneal, gavagem ou oral a camundongos isogênicos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag), após tratamento para a separação dos parasitos de resíduos da polpa de açaí.

3.5. Procedimentos experimentais

3.5.1. Antibioticoterapia

Os animais receberam um tratamento preventivo com cefalexina 500mg na dose de 1,75mg de antibiótico/dia (PASSOS et al., 2012), considerando o peso médio de cada animal (30g), a ingestão média de água de 15mL/100g de peso-animal/dia para camundongos (MEZADRI et al., 2004) e o volume do bebedouro (200mL), a fim de eliminar possíveis fatores de interferência bacteriana em um modelo animal imunodeficiente durante a experimentação, dado o alto grau de contaminação sanitária da polpa *in natura* de açaí (ROGEZ, 2000).

Cada dose foi administrada pela via i.p. (dois dias antes da infecção experimental), gavagem (um dia antes da infecção) e pela via oral, diretamente na água do bebedouro (no dia da infecção e por sete dias consecutivos).

3.5.2. Separação do *Trypanosoma cruzi* da polpa *in natura* de açaí

A separação entre os parasitos e grande parte da matéria orgânica presente na polpa *in natura* de açaí foi feita por meio da tamisação forçada ou sob pressão do êmbolo, uma técnica de filtração descrita por Labello Barbosa et al. (2012) e Passos et al. (2012) e utilizada de maneira eficiente em estudos anteriores e relacionados.

3.5.3. Manutenção dos animais

A integridade sanitária e genética dos camundongos foi preservada por meio de sua criação em condições controladas, utilizando-se mini-isoladores dentro de uma *rack* ventilada.

Os animais receberam ração autoclavada e água *ad libitum*, foram mantidos em salas a 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), com períodos de luz de 12-14 horas/24 horas (SANTOS, 2002; ONG & RODRIGUES, 2013) e umidade relativa (UR) entre 55 e 65%, de acordo com os padrões internacionais (MERUSSE & LAPICHIK, 1996; ONG & RODRIGUES, 2013).

Após a infecção experimental, todos os animais foram mantidos em mini-isoladores e manipulados em área experimental com indicação de biossegurança nível 2. Os animais mortos e infectados foram separados em sacos plásticos específicos para descarte de carcaças infectadas, autoclavados (ARAÚJO-JORGE & PIRMEZ, 2000) e o seu destino final seguiu as normas de serviço especializado e terceirizado.

3.5.4. Parasitemia e mortalidade

O número de parasitos na fase aguda da doença de Chagas foi determinado a partir da contagem de tripomastigotas presentes em amostras de cinco μL de sangue, por meio de pequena secção na ponta da cauda dos camundongos, segundo metodologia descrita por Brener (1962), em dias após a infecção (d.a.i.), a partir da data da constatação da infecção experimental.

Todos os animais foram observados por até 60 dias e a mortalidade foi registrada diariamente.

3.6. Análise estatística

Os resultados dos experimentos *in vivo* foram submetidos a análises de média e desvio padrão considerando a constatação da infecção experimental e a data da mortalidade dos animais, em dias após a infecção (d.a.i.).

A análise estatística foi realizada pelo *software Statistical Analysis System* (SAS) para *Windows®*, utilizando ANOVA um ou dois fatores, procedimento *GLM (Global Linear Model)* pelo teste de Comparações Múltiplas *a posteriori* de *Duncan*, com a taxa global de erro (α) de 0,01.

4. RESULTADOS

Abaixo encontram-se os resultados obtidos durante os ensaios *in vitro* e *in vivo*:

4.1. Viabilidade do uso do modelo animal B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib para o estudo da doença de Chagas aguda e curva-padrão da infectividade da cepa Y de *T. cruzi* em hospedeiro imunodeficiente

Tabela 2. Constatação da DCA e mortalidade, em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, com diferentes doses de tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (TcII).

| Dose | Nº infectados / Nº inoculados | % de infecção | % de mortalidade | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|-----------------|----------------------------------|------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 10 ¹ | 2 / 2 | 100 | 100 | 12,0±2,0 | 24,0±2,0 |
| 10 ² | 2 / 2 | 100 | 100 | 11,0±1,0 | 21,0±2,0 |
| 10 ³ | 2 / 2 | 100 | 100 | 10,0±0,0 | 19,0±0,0 |
| 10 ⁴ | 2 / 2 | 100 | 100 | 7,0±0,0 | 19,0±1,0 |
| 10 ⁵ | 2 / 2 | 100 | 100 | 4,0±0,0 | 17,0±1,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

A inoculação de 10¹ formas tripomastigotas da cepa Y (TcII) causou DCA e morte, respectivamente, nos períodos de 12,0±2,0 e 24,0±2,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10² formas tripomastigotas da cepa Y (TcII), a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 11,0±1,0 e 21,0±2,0 dias após as infecções em 100% dos hospedeiros; para 10³ formas tripomastigotas da cepa Y (TcII), a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 10,0±0,0 e 19,0±0,0 dias após as infecções em 100% dos hospedeiros; para 10⁴ formas tripomastigotas da cepa Y (TcII), a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 7,0±0,0 e 19,0±1,0 dias após as infecções em 100% dos hospedeiros; para 10⁵ formas tripomastigotas da cepa Y (TcII), a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 4,0±0,0 e 17,0±1,0 dias após as infecções em 100% dos hospedeiros (Tabela 2).

4.2. Análise *in vitro* de *T. cruzi* de vetores e reservatório isolados de diversas localizações do Estado do Pará, Brasil

Tabela 3. Avaliação *in vitro* da sobrevivência de *T. cruzi* (Tcl) de diferentes fontes, por meio da contagem de formas epimastigotas ou tripomastigotas em meio bifásico LIT e NNN, à microscopia óptica comum (1000x), sem coloração, segundo a metodologia de Brener (1962).

| Espécie | Localização (PA) | Parasitas/mL (média) |
|--------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| <i>Rhodnius pictipes</i> | Mata do Val-De-Cans (área de surto) | 10^6 |
| <i>Rhodnius pictipes</i> | Rio Ajuai (área de surto) | 10^6 |
| <i>Rhodnius</i> sp. | Ilha do Combu | 10^6 |
| <i>Philander opossum</i> | Ilha do Combu | 2.10^5 |

Na análise *in vitro*, foram encontradas 10^6 formas vivas de *T. cruzi* nas amostras provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans (área de surto - PA), *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (área de surto - PA) e *Rhodnius* sp. da Ilha do Combu (PA). Nas amostras oriundas de *Philander opossum* da Ilha do Combu (PA), foram encontradas 2.10^5 formas de *T. cruzi* vivas (Tabela 3).

4.3. Análise *in vivo* de *T. cruzi* de vetores e reservatório isolados de diversas localizações do Estado do Pará, Brasil

Tabela 4. Virulência de 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans (PA), obtidos de meio bifásico LIT e NNN e utilizados para infecção experimental, por diferentes vias de administração, por meio da constatação da DCA e mortalidade em camundongos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib.

| Espécie / Localização (PA) | Via | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | % de mortalidade | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|---|---------|----------------------------------|------------------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| <i>Rhodnius pictipes</i> / Mata do Val-De-Cans | i.p. | 2 / 2 | 100 | 100 | 26,0±1,0 | 36,0±1,0 |
| <i>Rhodnius pictipes</i> / Mata do Val-De-Cans | gavagem | 2 / 2 | 100 | 100 | 35,0±0,0 | 42,0±0,0 |
| <i>Rhodnius pictipes</i> / Mata do Val-De-Cans | oral | 2 / 2 | 100 | 100 | 36,0±6,0 | 42,0±4,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

A inoculação de 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl), obtidas de meio de cultivo bifásico LIT e NNN, provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans causou DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 26,0±1,0 e 36,0±1,0 (via intraperitoneal); 35,0±0,0 e 42,0±0,0 (via gavagem) e 36,0±6,0 e 42,0±4,0 (via oral) em 100% dos hospedeiros (Tabela 4).

Tabela 5. Virulência de 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (PA), obtidos de meio bifásico LIT e NNN e utilizados para infecção experimental, por diferentes vias de administração, por meio da constatação da DCA e mortalidade em camundongos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-tmMom}/J Unib.

| Espécie / Localização (PA) | Via | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | % de mortalidade | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|---|---------|----------------------------------|------------------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| <i>Rhodnius pictipes</i> / Rio Ajuai | i.p. | 2 / 2 | 100 | 100 | 17,0±3,0 | 27,0±2,0 |
| <i>Rhodnius pictipes</i> / Rio Ajuai | gavagem | 2 / 2 | 100 | 100 | 25,0±0,0 | 37,0±0,0 |
| <i>Rhodnius pictipes</i> / Rio Ajuai | oral | 2 / 2 | 100 | 100 | 19,0±2,0 | 29,0±5,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

A inoculação de 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl), obtidas de meio de cultivo bifásico LIT e NNN, provenientes de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (área de surto) causou DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 17,0±3,0 e 27,0±2,0 (via intraperitoneal); 25,0±0,0 e 37,0±0,0 (via gavagem) e 19,0±2,0 e 29,0±5,0 (via oral) em 100% dos hospedeiros (Tabela 5).

Tabela 6. Virulência de 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Rhodnius* sp. da Ilha do Combu (PA), obtidos de meio bifásico LIT e NNN e utilizados para infecção experimental, por diferentes vias de administração, por meio da constatação da DCA e mortalidade em camundongos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-tmMom}/J Unib.

| Espécie / Localização (PA) | Via | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | % de mortalidade | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|--|---------|----------------------------------|------------------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| <i>Rhodnius</i> sp. / Ilha do Combu | i.p. | 2 / 2 | 100 | 100 | 31,0±0,0 | 34,0±0,0 |
| <i>Rhodnius</i> sp. / Ilha do Combu | gavagem | 0 / 6 | 0 | 0 | Negativo | Não |
| <i>Rhodnius</i> sp. / Ilha do Combu | oral | 0 / 6 | 0 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

A inoculação de 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl), obtidas de meio de cultivo bifásico LIT e NNN, provenientes de *Rhodnius* sp. da Ilha do Combu causou DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 31,0±0,0 e 34,0±0,0 (via intraperitoneal). Não houve constatação da DCA e morte pelas vias gavagem e oral (Tabela 6).

Tabela 7. Virulência de 2.10^4 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Philander opossum* da Ilha do Combu (PA), obtidos de meio bifásico LIT e NNN e utilizados para infecção experimental, por diferentes vias de administração, por meio da constatação da DCA e mortalidade em camundongos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-tmMom}/J Unib.

| Espécie / Localização (PA) | Via | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | % de mortalidade | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|---|---------|----------------------------------|------------------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| <i>Philander opossum</i> / Ilha do Combu | i.p. | 2 / 2 | 100 | 100 | 24,0±3,0 | 34,0±4,0 |
| <i>Philander opossum</i> / Ilha do Combu | gavagem | 0 / 6 | 0 | 0 | Negativo | Não |
| <i>Philander opossum</i> / Ilha do Combu | oral | 0 / 6 | 0 | 0 | Negativo | Não |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

A inoculação de 2.10^4 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl), obtidas de meio de cultivo bifásico LIT e NNN, provenientes de *Philander opossum* da Ilha do Combu causou DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 24,0±3,0 e 34,0±4,0 (via intraperitoneal). Da mesma forma, não houve constatação da DCA e morte pelas vias gavagem e oral (Tabela 7).

4.4. Amplificação clonal *in vivo* de *T. cruzi* de vetores e reservatório isolados de diversas localizações do Estado do Pará, Brasil

Tabela 8. Constatação da DCA para amplificação clonal de formas tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans (PA) em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, a partir de meio bifásico LIT e NNN.

| Origem | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Dose de inoculação <i>in vivo</i> (parasitos/mL) | Constatação da DCA* (d.a.i.)** |
|--|----------------------------------|------------------|---|-----------------------------------|
| Meio LIT e NNN | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 26,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 14,0±0,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 15,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 15,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 15,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 15,0±1,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

A inoculação de 10⁵ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans causou DCA no período de 26,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros (obtido de meio de cultivo bifásico LIT e NNN). Após o 1º repique *in vivo*, *T. cruzi* causou DCA no período de 14,0±0,0 dias após as infecções em 100% dos hospedeiros. Após o 2º repique *in vivo*, *T. cruzi* causou DCA no período de 15,0±1,0 dias após as infecções em 100% dos hospedeiros e assim sucessivamente até pelo menos o 5º repique *in vivo* (Tabela 8).

Tabela 9. Constatação da DCA para amplificação clonal de formas tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (PA), em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, a partir de meio bifásico LIT e NNN.

| Origem | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Dose de inoculação <i>in vivo</i> (parasitos/mL) | Constatação da DCA* (d.a.i.)** |
|--|----------------------------------|------------------|---|-----------------------------------|
| Meio LIT e NNN | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 17,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 11,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 12,0±0,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 13,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 17,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 17,0±0,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

A inoculação de 10⁵ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai causou DCA no período de 17,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros (obtido de meio de cultivo bifásico LIT e NNN). Após o 1º repique *in vivo*, *T. cruzi* causou DCA no período de 11,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros. Após o 2º repique *in vivo*, *T. cruzi* causou DCA no período de 12,0±0,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros. Após o 3º repique *in vivo*, *T. cruzi* causou DCA no período de 13,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros. Após o 4º repique *in vivo*, *T. cruzi* causou DCA no período de 17,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros. Após o 5º repique *in vivo*, *T. cruzi* causou DCA no período de 17,0±0,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros (Tabela 9).

Tabela 10. Constatação da DCA para amplificação clonal de formas tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes de *Philander opossum* da Ilha do Combu (PA) em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, a partir de meio bifásico LIT e NNN.

| Origem | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Dose de inoculação <i>in vivo</i> (parasitos/mL) | Constatação da DCA* (d.a.i.)** |
|--|----------------------------------|------------------|---|-----------------------------------|
| Meio LIT e NNN | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 23,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 15,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 16,0±0,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 15,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 16,0±1,0 |
| B6.129S7Rag1 ^{-/-tmMom} /J Unib | 2 / 2 | 100 | 10 ⁵ | 16,0±1,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

A inoculação de 10⁵ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Philander opossum* da Ilha do Combu causou DCA no período de 23,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros (obtido de meio de cultivo bifásico LIT e NNN). Após o 1º repique *in vivo*, *T. cruzi* causou DCA no período de 15,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros. Após o 2º repique *in vivo*, *T. cruzi* causou DCA no período de 16,0±0,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros. Após o 3º repique *in vivo*, *T. cruzi* causou DCA no período de 15,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros. Após o 4º e o 5º repiques *in vivo*, *T. cruzi* causou DCA no período de 16,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros (Tabela 10).

4.5. Curvas-padrão da infectividade de *T. cruzi* isolados de vetores e reservatório de diversas localizações do Estado do Pará, Brasil

Tabela 11. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, com diferentes doses de tripomastigotas (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans, Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

| Dose | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | % de mortalidade | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|-----------------|----------------------------------|------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 10 ¹ | 2 / 2 | 100 | 100 | 36,0±3,0 ^(a) | 40,0±3,0 |
| 10 ² | 2 / 2 | 100 | 100 | 27,0±1,0 ^(b) | 31,0±1,0 |
| 10 ³ | 2 / 2 | 100 | 100 | 22,0±1,0 ^(c) | 28,0±1,0 |
| 10 ⁴ | 2 / 2 | 100 | 100 | 19,0±1,0 ^(d) | 23,0±0,0 |
| 10 ⁵ | 2 / 2 | 100 | 100 | 15,0±1,0 ^(e) | 20,0±0,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

A inoculação de 10¹ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans causou DCA e morte, respectivamente, nos períodos de 36,0±3,0 e 40,0±3,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10² formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 27,0±1,0 e 31,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10³ formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 22,0±1,0 e 28,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10⁴ formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 19,0±1,0 e 23,0±0,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10⁵ formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 15,0±1,0 e 20,0±0,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros (Tabela 11).

Tabela 12. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, com diferentes doses de tripomastigotas (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (área de surto), Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

| Dose | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | % de mortalidade | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|-----------------|----------------------------------|------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 10 ¹ | 2 / 2 | 100 | 100 | 32,0±1,0 ^(a) | 47,0±1,0 |
| 10 ² | 2 / 2 | 100 | 100 | 25,0±1,0 ^(b) | 39,0±1,0 |
| 10 ³ | 2 / 2 | 100 | 100 | 21,0±0,0 ^(c) | 36,0±1,0 |
| 10 ⁴ | 2 / 2 | 100 | 100 | 18,0±1,0 ^(d) | 29,0±2,0 |
| 10 ⁵ | 2 / 2 | 100 | 100 | 15,0±1,0 ^(e) | 20,0±1,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

A inoculação de 10¹ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai causou DCA e morte, respectivamente, nos períodos de 32,0±1,0 e 47,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10² formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 25,0±1,0 e 39,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10³ formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 21,0±0,0 e 36,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10⁴ formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 18,0±1,0 e 29,0±2,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10⁵ formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 15,0±1,0 e 20,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros (Tabela 12).

Tabela 13. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, com diferentes doses de tripomastigotas (Tcl) provenientes de *Philander opossum* da Ilha do Combu, Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

| Dose | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | % de mortalidade | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|-----------------|----------------------------------|------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 10 ¹ | 2 / 2 | 100 | 100 | 42,0±1,0 ^(f) | 50,0±1,0 |
| 10 ² | 2 / 2 | 100 | 100 | 30,0±2,0 ^(g) | 39,0±3,0 |
| 10 ³ | 2 / 2 | 100 | 100 | 25,0±0,0 ^(h) | 32,0±1,0 |
| 10 ⁴ | 2 / 2 | 100 | 100 | 21,0±0,0 ⁽ⁱ⁾ | 30,0±2,0 |
| 10 ⁵ | 2 / 2 | 100 | 100 | 17,0±1,0 ^(j) | 25,0±1,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

A inoculação de 10¹ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tcl) provenientes de *Philander opossum* da Ilha do Combu causou DCA e morte, respectivamente, nos períodos de 42,0±1,0 e 50,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10² formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 30,0±2,0 e 39,0±3,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10³ formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 25,0±0,0 e 32,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10⁴ formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 21,0±0,0 e 30,0±2,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros; para 10⁵ formas tripomastigotas, a DCA e morte ocorreram, respectivamente, nos períodos de 17,0±1,0 e 25,0±1,0 dias após as infecções experimentais em 100% dos hospedeiros (Tabela 13).

4.6. Virulência da cepa Y de *T. cruzi* em polpa *in natura* de açaí na doença de Chagas aguda em B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib

Tabela 14. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, via intraperitoneal, com a mistura de 10⁵ tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (TcII) em polpa *in natura* de açaí. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

| Grupo | Via | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|----------------------------------|------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Controle Negativo (Eluato) | i.p. | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| Controle Positivo | i.p. | 4 / 4 | 100 | 5,0±1,0 ^(k) | 20,0±0,0 |
| Grupo Teste (Eluato) | i.p. | 4 / 4 | 100 | 8,0±1,0 ^(l) | 20,0±1,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

Na análise da virulência da cepa Y de *T. cruzi* (TcII) mantida *in vivo* em camundongos, após contato com a polpa *in natura* de açaí, não houve constatação de DCA e morte no controle negativo. O controle positivo demonstrou que os hospedeiros infectados apresentaram DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 5,0±1,0 e 20,0±0,0 (100% pela via intraperitoneal). No grupo teste, os hospedeiros que receberam o eluato da tamisação forçada apresentaram DCA, com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 8,0±1,0 e 20,0±1,0 (100% pela via intraperitoneal) (Tabela 14).

4.7. Virulência de *T. cruzi* isolados de vetores e reservatório de diversas localizações do Estado do Pará, Brasil, em polpa *in natura* de açaí na doença de Chagas aguda

Tabela 15. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, por diferentes vias de administração, com polpa *in natura* de açaí contaminada com 10⁵ tripomastigotas de *T. cruzi* I, à temperatura ambiente, provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans, Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

| Inóculo | Via | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|----------|---------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Controle | i.p. | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| Negativo | Gavagem | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| (Eluato) | Oral | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| Controle | i.p. | 4 / 4 | 100 | 15,0±1,0 ^(m) | 21,0±1,0 |
| Positivo | Gavagem | 2 / 4 | 50 | 23,0±1,0 ⁽ⁿ⁾ | 31,0±1,0 |
| | Oral | 2 / 4 | 50 | 27,0±2,0 ^(o) | 33,0±3,0 |
| Grupo | i.p. | 4 / 4 | 100 | 18,0±1,0 ^(p) | 24,0±1,0 |
| Teste | Gavagem | 2 / 4 | 50 | 27,0±1,0 ^(q) | 33,0±1,0 |
| (Eluato) | Oral | 2 / 4 | 50 | 32,0±3,0 ^(r) | 40,0±3,0 |

* DCA: doença de Chagas aguda ** d.a.i.: dias após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* (Tcl) proveniente de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans após contato com a polpa *in natura* de açaí, não houve constatação de DCA e morte no controle negativo. O controle positivo demonstrou que os hospedeiros infectados apresentaram DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 15,0±1,0 e 21,0±1,0 (100% pela via intraperitoneal); 23,0±1,0 e 31,0±1,0 (50% por gavagem) e 27,0±2,0 e 33,0±3,0 (50% pela via oral). No grupo teste, os hospedeiros que receberam o eluato da tamisação forçada apresentaram DCA, com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 18,0±1,0 e 24,0±1,0 (100%

pela via intraperitoneal); 27,0±1,0 e 33,0±1,0 (50% por gavagem) e 32,0±3,0 e 40,0±3,0 (50% pela via oral) (Tabela 15).

Tabela 16. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, por diferentes vias de administração, com polpa *in natura* de açaí contaminada com 10⁵ tripomastigotas de *T. cruzi* I, à temperatura ambiente, provenientes de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (área de surto), Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

| Inóculo | Via | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|----------|---------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Controle | i.p. | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| Negativo | Gavagem | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| (Eluato) | Oral | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| Controle | i.p. | 4 / 4 | 100 | 15,0±1,0 ^(m) | 26,0±1,0 |
| Positivo | Gavagem | 2 / 4 | 50 | 27,0±2,0 ^(s) | 37,0±1,0 |
| | Oral | 2 / 4 | 50 | 29,0±2,0 ^(o) | 40,0±1,0 |
| Grupo | i.p. | 4 / 4 | 100 | 18,0±1,0 ^(p) | 25,0±1,0 |
| Teste | Gavagem | 2 / 4 | 50 | 31,0±2,0 ^(t) | 43,0±3,0 |
| (Eluato) | Oral | 2 / 4 | 50 | 35,0±1,0 ^(r) | 49,0±1,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* (Tcl) proveniente de *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai após contato com a polpa *in natura* de açaí, não houve constatação de DCA e morte no controle negativo. O controle positivo demonstrou que os hospedeiros infectados apresentaram DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 15,0±1,0 e 26,0±1,0 (100% pela via intraperitoneal); 27,0±2,0 e 37,0±1,0 (50% por gavagem) e 29,0±2,0 e 40,0±1,0 (50% pela via oral). No grupo teste, os hospedeiros que receberam o eluato da tamisação forçada apresentaram DCA, com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 18,0±1,0 e 25,0±1,0 (100% pela via

intraperitoneal); 31,0±2,0 e 43,0±3,0 (50% por gavagem) e 35,0±1,0 e 49,0±1,0 (50% pela via oral) (Tabela 16).

Tabela 17. Constatação da DCA e mortalidade em camundongos B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib infectados, por diferentes vias de administração, com polpa *in natura* de açaí contaminada com 10⁵ tripomastigotas de *T. cruzi* I, à temperatura ambiente, provenientes de *Philander opossum* da Ilha do Combu, Pará. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

| Inóculo | Via | N° infectados / N° inoculados | % de infecção | Constatação da DCA* (d.a.i.)** | Mortalidade (d.a.i.) |
|----------|---------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Controle | i.p. | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| Negativo | Gavagem | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| (Eluato) | Oral | 0 / 2 | 0 | Negativo | Não |
| Controle | i.p. | 4 / 4 | 100 | 17,0±0,0 ^(u) | 26,0±1,0 |
| Positivo | Gavagem | 2 / 4 | 50 | 29,0±2,0 ^(v) | 39,0±2,0 |
| | Oral | 2 / 4 | 50 | 37,0±5,0 ^(w) | 45,0±4,0 |
| Grupo | i.p. | 4 / 4 | 100 | 20,0±2,0 ^(x) | 34,0±1,0 |
| Teste | Gavagem | 2 / 4 | 50 | 41,0±1,0 ^(y) | 47,0±1,0 |
| (Eluato) | Oral | 2 / 4 | 50 | 45,0±2,0 ^(z) | 51,0±1,0 |

* doença de Chagas aguda ** dia após infecção

Na análise da virulência do *T. cruzi* (Tcl) de *P. opossum* da Ilha do Combu após contato com a polpa *in natura* de açaí, não houve constatação de DCA e morte no controle negativo. O controle positivo demonstrou que os hospedeiros infectados apresentaram DCA, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 17,0±0,0 e 26,0±1,0 (100% via intraperitoneal); 29,0±2,0 e 39,0±2,0 (50% por gavagem) e 37,0±5,0 e 45,0±4,0 (50% via oral). No grupo teste, os hospedeiros que receberam o eluato da tamisação forçada apresentaram DCA, com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 20,0±2,0 e 34,0±1,0 (100% pela via intraperitoneal); 41,0±1,0 e 47,0±1,0 (50% por gavagem) e 45,0±2,0 e 51,0±1,0 (50% pela via oral) (Tabela 17).

5. DISCUSSÃO

Dada a não expressiva disponibilidade de modelos animais isogênicos e imunodeficientes no Brasil comparada a outros países (CHARLES RIVER, 2012; JACKSON LABORATORY, 2014), bem como a limitada infraestrutura necessária à sua manutenção, há na literatura científica escassez de estudos que relacionem o comportamento de *T. cruzi* em diversos modelos imunodeficientes.

Sabe-se que o modelo animal isogênico imunodeficiente B6.129S7Rag1^{-tmMom}/J Unib (Rag) apresenta mutação do gene de atividade de recombinação (RAG) localizado no cromossomo 2 (56cM), órgãos linfóides pequenos, deficiência de células B e T sem possibilidade de reversão da mutação e baixa sensibilidade à radiação (ANNE CROY et al., 2007)

Dessa maneira, em um primeiro momento, tornou-se necessário avaliar a possibilidade dessa interação parasito-hospedeiro, por meio de infecções experimentais com diferentes doses do parasito, de modo a permitir a continuidade e, ao mesmo tempo, ampliar a área dedicada aos estudos experimentais da doença de Chagas aguda.

Para todas as doses testadas (10^1 a 10^5), a curva parasitêmica da cepa Y de *T. cruzi* (TcII) no modelo experimental foi crescente, iniciando-a com a estimativa de 3.10^4 parasitos/mL de sangue na constatação da DCA e finalizando-a com a estimativa de pelo menos $1,2.10^7$ parasitos/mL de sangue na mortalidade, segundo o método de Brener (1962), de acordo com exemplo apresentado na figura 7.

Comparando-se às infecções experimentais no modelo animal isogênico imunodeficiente C.B-17-*Prkdc*^{scid}/Pas Unib (*Scid*), utilizando a mesma cepa de *T. cruzi*, dose e via de administração (ALVES, 1998; LABELLO BARBOSA, 2010), verificou-se que o modelo animal isogênico imunodeficiente B6.129S7Rag1^{-tmMom}/J Unib (Rag) segue um padrão de parasitemia semelhante e que, portanto, mostrou-se também eficiente para o estudo da doença de Chagas aguda, ao expor o parasito a uma condição extrema do ponto de vista do hospedeiro.

Além disso, uma vez que o tempo entre a constatação da infecção e a morte ocorreram em períodos relativamente curtos, entre o 4º e o 26º dias após as infecções, respectivamente para as doses máxima e mínima testadas, o B6.129S7Rag1^{-tmMom}/J Unib desponta como uma alternativa disponível,

ampliará a perspectiva do uso de modelos imunodeficientes na pesquisa em doenças negligenciadas e contribuirá para novos estudos da DCA.

Em um segundo momento, a fim de comprovar-se uma das hipóteses centrais da transmissão oral da DCA na região amazônica brasileira, mediante a ingestão de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* junto à polpa de açaí, a partir da maceração acidental de triatomíneos infectados durante o preparo do alimento, esse estudo optou por utilizar diretamente as formas tripomastigotas metacíclicas, porque são as formas infectantes presentes no ciclo biológico do parasito.

Essa hipótese é muito factível em razão de hábitos culturais e pelo grande consumo da polpa de açaí obtida por meios artesanais. É extremamente frequente a visualização de sistemas artesanais de produção da polpa de açaí no interior de ilhas do Pará, como Combu (comunicação pessoal: Luiz Augusto Corrêa Passos).

Ressalta-se que a maceração experimental de triatomíneos ou de suas fezes contendo parasitos vivos em polpa de açaí também poderá fornecer dados complementares importantes, como as características do processo de produção artesanal, inclusive pela contaminação acidental por outras espécies contendo *T. cruzi* de diferentes DTU's ou localizações, considerando a diversidade genética do parasito e as interações parasito-hospedeiro-ambiente (ZINGALES et al., 2009; ZINGALES, 2011).

Contudo, acredita-se que a estratégia aqui apresentada nos possibilitou utilizar *T. cruzi* proveniente não apenas de triatomíneos, como também de reservatório, dentro de padrões de biossegurança e infraestrutura disponíveis.

Dessa maneira, o estudo dos tripomastigotas tanto de vetores quanto de reservatório permitiu embasar de maneira mais completa uma questão atual e complexa da região Norte, ao ampliar as perspectivas iniciais do estudo.

A partir da avaliação *in vitro* de sobrevivência de *T. cruzi* de diferentes amostras, por meio da observação do movimento flagelar característico e contagem de formas epimastigotas ou tripomastigotas, segundo a metodologia de Brener (1962), verificou-se que 100% das amostras continham doses elevadas de parasitos vivos (Tabela 3).

Esses resultados foram promissores e indicaram que análises da virulência do parasito *in vivo*, por diferentes vias de administração, deveriam ser realizadas.

Com relação a resultados relevantes, convém ressaltar que houve a constatação de casos de DCA em hospedeiros infectados pela via oral anteriores àqueles infectados pela via intraperitoneal com *T. cruzi* de *Rhodnius pictipes*, do Rio Ajuai (Tabela 5) e uma rápida evolução da DCA ocorreu nos hospedeiros infectados com *T. cruzi* de *Rhodnius* sp. da Ilha do Combu, comparada aos demais (Tabela 6).

Fatores como a diversidade genética e a presença de determinadas glicoproteínas na superfície dos *T. cruzi* (Tcl) obtidos de um ciclo silvestre (YOSHIDA, 2008; ZINGALES, 2011) devem ser considerados porque podem ter sido responsáveis por ausência ou DCA de maior gravidade em determinada via.

Assim, os resultados acima descritos demonstraram a preservação da virulência das formas tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes dos triatomíneos e reservatório utilizados.

Dessa forma, os resultados promissores indicaram que a amplificação clonal dos parasitos em hospedeiros imunodeficientes deveria ser realizada. A aplicação da técnica da amplificação clonal *in vivo* se fez necessária devido os *T. cruzi* serem constituídos por diversos clones ou subpopulações com diferentes graus de virulência ou tropismos, os quais poderiam desaparecer da corrente sanguínea de hospedeiros imunocompetentes após a penetração em tecidos específicos e que são importantes na determinação da patogenia da doença de Chagas, de acordo com o modelo histotrópico-clonal proposto por Macedo & Pena (1998).

Dessa maneira, a utilização de parasitos em um hospedeiro vertebrado imunodeficiente, durante o ciclo biológico, foi uma alternativa que permitiu ampla oportunidade para a ocorrência de amplificação e seleção clonal com capacidade infectante e para demonstrar com segurança a real possibilidade de preservação da virulência do parasito, após o contato com a polpa de açaí e infecções experimentais por diferentes vias de administração.

Além disso, repiques *in vivo* sucessivos possibilitaram desconsiderar possíveis fatores de interferência que poderiam ser favoráveis ou desfavoráveis

ao comportamento dos parasitos, como, por exemplo, a sua permanência em nitrogênio líquido à -196°C . Isso permitiu, ainda, atingir uma determinada estabilidade no período da constatação da DCA após o 5º repique *in vivo* para todos os *T. cruzi* utilizados, o que foi demonstrado com os resultados apresentados, estabelecendo um padrão de comparação para os grupos controle positivo em relação aos grupos testes, posteriormente.

Com base nos resultados descritos, a análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ($p < 0,0001$; $F = 80,64$) para a constatação da DCA nos hospedeiros entre *T. cruzi* provenientes de triatomíneos (Tcl), reservatório (Tcl) e a cepa Y de *T. cruzi* (Tcll), sendo observado um retardo de até 12 dias entre eles.

Não houve diferença significativa ($p > 0,0001$) para a constatação da DCA nos hospedeiros entre *T. cruzi* provenientes de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans e do Rio Ajuai (Tcl), ambos do Estado do Pará. Por outro lado, esses resultados diferiram para *T. cruzi* do reservatório *Philander opossum* (Figura 8) e, portanto, sugerem que existe diferença na constatação da DCA dependente da forma de contaminação, seja com formas tripomastigotas metacíclicas presentes nos dejetos de triatomíneos ou de marsupiais.

De acordo com a análise estatística, há uma relação dose-dependência para a constatação da DCA experimental. Esses dados são coerentes com Diaz-Ungría (1968) e sua análise permite afirmar que quanto maior for a dose de parasitos inoculados, menor será o tempo necessário à constatação da DCA, que é o tempo mínimo necessário para o parasito completar seu ciclo biológico no hospedeiro com parasitemia observável, embora todas as doses apresentem parasitos com a virulência preservada e sejam capazes de causar DCA e morte nos hospedeiros imunodeficientes.

Existe um retardo observado para a constatação da DCA no grupo teste em relação ao controle positivo e verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,0001$; $F = 72,14$) para a constatação da DCA entre os grupos experimentais. Apesar disso, a virulência do *T. cruzi*, inclusive após o contato com a polpa *in natura* de açaí, pode ser igualmente preservada como constatado anteriormente no modelo animal isogênico imunodeficiente C.B-17-*Prkdc^{scid}*/Pas Unib (*Scid*) (LABELLO BARBOSA, 2010), o que permite que esse

estudo possa ser realizado no hospedeiro isogênico imunodeficiente B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag) com idêntica qualidade científica.

Assim, verifica-se que as formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* (Tcl) obtidas de diferentes fontes, seja de triatomíneos, seja de reservatório, mantêm a sua virulência preservada, inclusive após a mistura com a polpa *in natura* de açaí, por todas as vias de administração aplicadas.

Esses resultados confirmaram experimentalmente a possibilidade de as localidades aqui tratadas atuarem como áreas de surto de DCA diretamente de transmissão alimentar, caso haja a contaminação acidental, como proposto por Santos (2013) em uma abordagem eco-epidemiológica.

Seu estudo sinalizou fatores de risco associados à maior ocorrência de casos agudos da doença de Chagas no município de Abaetetuba (PA) como a velocidade do vento, o contato com triatomíneos e a proximidade a palmeiras infestadas com *R. pictipes*, tanto em ambientes urbanos sem a necessidade de domiciliação do vetor, como em ambientes de ilhas, geralmente com menor grau de antropização e ciclo enzoótico ativo (SANTOS, 2013).

A partir dos resultados obtidos nas tabelas 14, 15, 16 e 17, em uma análise estatística geral, verificou-se que foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,0001$; $F = 97,16$) para a constatação da DCA, considerando diferentes vias de administração e grupos experimentais, ao comparar as amostras de *T. cruzi* (Tcl e TclI) utilizadas.

Esses resultados estão de acordo o proposto por Labello Barbosa et al. (2012) e Passos et al. (2012) para a cepa Y de *T. cruzi* (TclI) e permitem enfatizar que a polpa de açaí é um meio no qual o parasito é capaz de manter a sua sobrevivência e preservar a sua virulência, como ocorre em diversos outros alimentos (AÑEZ & CRISANTE, 2008).

Embora de grande utilidade, até o presente momento, a detecção da DCA adquirida por meio de transmissão alimentar, na América Latina, é realizada fundamentalmente pela semeadura do agente etiológico em um meio de cultivo adequado para verificar sua sobrevivência *in vitro* (SUÁREZ, 2012) ou por associações eco-epidemiológicas e/ou diagnósticos laboratoriais, os quais permitem correlacionar o paciente suspeito para doença de Chagas pela constatação posterior da parasitemia (SANTOS, 2013).

Cabe enfatizar que realizar avaliação da virulência *in vivo* de *T. cruzi* em polpa *in natura* de açaí não somente torna os estudos mais completos, como também abre perspectivas para a possibilidade de se colocar em rotinas de controle de qualidade ou esclarecimento de surtos, por exemplo, a detecção de contaminação por parasitos em alimentos utilizando modelos de resposta *in vivo*. Essa poderá ser, conseqüentemente, uma maneira eficaz de inviabilizar alimentos contaminados antes do seu contato com o hospedeiro humano.

Embora na Amazônia haja a predominância de TcI, os estudos de transmissão oral com outras DTU's são igualmente importantes, pois sabe-se que os isolados de *T. cruzi* provenientes de pacientes envolvidos no surto de DCA em Navegantes (SC), pela ingestão de caldo de cana contaminado, em 2005, foram genotipados como TcII (STEINDEL et al., 2008).

Santos (2013) afirmou a existência de uma epidemiologia diferenciada da DCA no Estado do Pará e o fator de risco associado ao alimentar-se com açaí, demonstrando por meio de dimensões ambientais, climatológicas, clínicas, demográficas, entomológicas e epidemiológicas. Segundo Santos (2013) e Xavier et al. (2014), há relação significativa entre os ambientes de ilha produtores de açaí e a ocorrência de DCA por transmissão oral na área urbana.

Além disso, o presente trabalho também se encontra em concordância com outros estudos ecológicos e epidemiológicos anteriores, que sugeriram a possibilidade da transmissão alimentar em seres humanos na região amazônica, por meio do diagnóstico clínico e laboratorial da DCA, nas últimas décadas (VALENTE et al., 1999; PINTO et al., 2008; VALENTE, 2008).

É necessário considerar que a data da mortalidade dos hospedeiros, apesar de isogênicos, foi variável (Figura 9). Esse fato se deve não somente à dose de parasitos inoculados e à influência da relação parasito-hospedeiro, mas principalmente às variáveis do meio que influenciam os indivíduos, como o peso e o grau de estresse (PASSOS, 2003).

Os resultados experimentais aqui apresentados reforçam a complexidade da transmissão do *T. cruzi* na Bacia amazônica porque a probabilidade de seres humanos, reservatórios ou animais domésticos infectarem-se com parasitos oriundos de vetores pode sofrer grande variação, inclusive dentro de um mesmo município (ROQUE et al., 2013).

Entretanto, houve diferença significativa na constatação da DCA nos grupos controle positivo ($p<0,0001$; $F=40,25$) em relação aos grupos teste ($p<0,0001$; $F=181,53$), para as vias de administração utilizadas.

Esse fato a princípio pode levar à reflexão de que a polpa *in natura* de açaí parece retardar a constatação da DCA no hospedeiro imunodeficiente, em relação à infecção por tripomastigota sanguíneo apenas. Na realidade, não devemos nos esquecer que o volume da amostra a ser homogeneizada contendo a polpa de açaí torna-se maior, bem como a dificuldade de homogeneização; ela é o veículo inoculado via intraperitoneal e necessita de um período de tempo maior para absorção ou para a digestão, no caso da via gavagem ou oral.

De fato, ela desempenha um papel relevante porque é um meio favorável à sobrevivência e manutenção da virulência do parasito, quando do seu contato e ingestão imediatos pelos hospedeiros, ao simular um grande número de situações reais que ocorrem na região amazônica pelo seu consumo *in natura* e não somente sob condições de estresse térmico ou após períodos de incubação (LABELLO BARBOSA et al., 2012; PASSOS et al., 2012).

Ao se comparar a constatação da DCA, após infecções experimentais, pela via intraperitoneal, verificou-se que houve diferença significativa ($p<0,0001$; $F=122,03$) entre TcI e TcII, sendo expressivo o retardo observado em TcI com relação à TcII. Ainda que seja inquestionável a capacidade de virulência preservada de todas elas, esse fato merece atenção e deve ser aprofundado na tentativa de se explicar a diferença de comportamento dos *T. cruzi* não apenas na Amazônia, mas principalmente nas áreas de surtos, especialmente do Estado do Pará, considerando o seu grau de virulência, a interação do parasito com hospedeiros imunocompetentes e a presença de sintomatologia característica de fase aguda (PINTO et al., 2004).

O retardo na constatação da DCA pela via gavagem em relação à via intraperitoneal, bem como da via oral em relação à via gavagem ou à via intraperitoneal deve ser considerado e isso se deve possivelmente a um conjunto de fatores.

Entre eles, podemos destacar a dose de parasitos que de fato foram inoculados a cada animal, uma vez que a dose contida em cada amostra e o

volume inoculado são conhecidos, mas o inóculo aplicado a cada animal a partir da amostra, ainda que após homogeneização, é uma variável não controlada; as distâncias percorridas desde a cavidade bucal até a penetração do parasito pela mucosa gástrica, pelas porções iniciais do intestino delgado ou até mesmo por lesões existentes na região nasobucofaringeana; as diferentes glicoproteínas de superfície presentes no *T. cruzi* (gp30, gp82 e gp90), responsáveis pela penetração e que apresentam diferença de afinidade pela mucosa gástrica (STEINDEL et al., 2005; YOSHIDA, 2008; YOSHIDA et al., 2011).

Esse fato deve ser mais bem investigado e, do ponto de vista histotrópico-clonal da doença de Chagas, novos estudos podem ser realizados não somente analisando-se a diversidade genética dos parasitos diretamente nos tecidos infectados, como também comparando as glicoproteínas existentes entre diferentes *DTU's* de *T. cruzi* (ZINGALES et al., 2009; ZINGALES, 2011).

Estudos celulares, histológicos e anatomopatológicos em camundongos imunodeficientes ou imunocompetentes permitirão um entendimento mais detalhado de possíveis lesões na DCA e uma comparação da severidade no quadro clínico, patogenia e sintomatologia nos casos agudos de transmissão oral entre o modelo animal e os seres humanos, porque segundo o panorama apresentado por Zingales (2011), *DTU I* (Tcl) não favoreceria a forma digestória da doença de Chagas.

Monteiro et al. (2012) consideraram que a diversidade biológica dos estoques de *T. cruzi* (antigos genótipos Tcl e ZIII) circulantes na região amazônica pode desempenhar importante papel nas características clínico-epidemiológicas peculiares da doença de Chagas naquela área. Uma caracterização biológica e histopatológica demonstrou baixa infectividade e virulência do parasito em hospedeiros imunocompetentes no Amazonas.

Esse perfil foi compatível com estudos anteriores que demonstraram que isolados de *T. cruzi* induzem, em geral, baixa parasitemia e mortalidade nas fases aguda e crônica porque são formados por sub-populações heterogêneas, com características específicas, morfologia e histotropismo distintos, os quais determinarão a morbidade da doença (DEVERA et al., 2003).

Entretanto, Reis et al. (2012) estudaram o comportamento biológico de isolados de *T. cruzi* obtidos de pacientes com DCA, de reservatórios *D.*

marsupialis e de triatomíneos *R. robustus* provenientes do Estado do Amazonas (Tcl e TclV) e também isolados obtidos de pacientes crônicos em casos autóctones do Paraná e alóctone, de Minas Gerais (TclI). Os resultados indicaram que a infectividade foi preservada com ocorrência de mortalidade em hospedeiros imunocompetentes, embora existissem diferenças nos padrões de parasitemia entre *T. cruzi* das diferentes DTU's analisadas.

Os resultados ressaltaram a importância do uso de um hospedeiro isogênico imunodeficiente para demonstrar a presença da virulência de Tcl de diversas regiões do Pará, sua capacidade de causar DCA e morte, após o consumo de polpa de açaí contaminada com o parasito.

Certamente, novos estudos serão de fundamental importância para avaliar manifestações cardíacas e/ou digestórias após o consumo de polpa de açaí contaminada e serão úteis ao desenvolvimento de novos medicamentos, formas mais rápidas e eficazes de prognóstico e tratamento da fase aguda da doença, considerando também fatores associados como a constituição genética, o grau de suscetibilidade variável dos hospedeiros e a interação parasito-hospedeiro-ambiente (COSTA, 1999; PASSOS, 2003).

Até o momento, observações clínicas e laboratoriais como a presença de febre, cefaleia, mialgia, palidez, dispneia, edema de membros inferiores, edema de face, dor abdominal, miocardite, exantema, alterações eletrocardiográficas, alta parasitemia, chagoma de inoculação e/ou sinal de Romaña e óbito nos pacientes caracterizam a DCA. Em muitos casos, sintomatologia inespecífica é associada a um possível consumo da polpa de açaí durante a investigação de surtos de origem alimentar (PINTO et al., 2004; PINTO et al., 2008; PINTO et al., 2009), uma vez que a certificação do parasito ou de seu material genético no alimento, visando seu controle de qualidade e prevenção da doença humana, ainda não é realizada.

A tentativa de se estimar a quantidade de parasitos que de fato foram inoculados a cada animal a partir da amostra com a polpa de açaí pode ser feita utilizando-se os resultados obtidos nas tabelas 2, 11, 12 e 13, para os *T. cruzi*. Ao comparar a constatação da DCA dos grupos teste, via intraperitoneal ou gavagem, com os dados obtidos respectivamente para cada "curva-padrão", podemos fazer uma inferência quanto à dose inoculada de fato, que é uma questão a ser transposta. Já para a via oral, essa tentativa não parece muito

segura, uma vez que há perdas entre o volume administrado e o volume ingerido pelo animal.

Por exemplo, de acordo com a tabela 15, na análise da virulência do *T. cruzi* (Tcl) proveniente de *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans após contato com a polpa *in natura* de açaí, os hospedeiros apresentaram DCA nos dias $18,0 \pm 1,0$ (via intraperitoneal) e $27,0 \pm 1,0$ (via gavagem). Comparando-se esses valores à sua “curva-padrão” correspondente na tabela 11, verifica-se por meio do controle positivo intraperitoneal que esses resultados equivalem a infecções com 10^4 e 10^2 parasitos/mL, respectivamente.

Já na tabela 16, na análise da virulência do *T. cruzi* (Tcl) proveniente de *R. pictipes* do Rio Ajuá após contato com a polpa *in natura* de açaí, os hospedeiros apresentaram DCA nos dias $18,0 \pm 1,0$ (via intraperitoneal) e $31,0 \pm 2,0$ (via gavagem). Comparando-se esses valores à sua “curva-padrão” correspondente na tabela 12, verifica-se por meio do controle positivo intraperitoneal que esses resultados equivalem a infecções com 10^4 e 10^1 parasitos/mL, respectivamente.

Segundo a tabela 17, na análise da virulência do *T. cruzi* (Tcl) proveniente de *Philander opossum* da Ilha do Combu após contato com a polpa *in natura* de açaí, os hospedeiros apresentaram DCA nos dias $20,0 \pm 2,0$ (via intraperitoneal) e $41,0 \pm 1,0$ (via gavagem). Comparando-se esses valores à sua “curva-padrão” correspondente na tabela 13, verifica-se por meio do controle positivo intraperitoneal que esses resultados também equivalem a infecções com 10^4 e 10^1 parasitos/mL, respectivamente.

Essas comparações indicam que embora exista uma relação de dose-dependência (DIAS-UNGRÍA, 1968), a DCA pode inclusive ocorrer com doses variáveis e não apenas com alta carga parasitária. Mais do que isso, é importante ressaltar a eficiência do mecanismo de infecção pela mucosa gástrica e a relevância do tipo de glicoproteína em cada parasito e não apenas a quantidade de *T. cruzi* presente na contaminação (YOSHIDA, 2008; YOSHIDA et al., 2011).

Parte dos resultados obtidos são reflexos da atuação eficiente do Programa de Vigilância da doença de Chagas no Estado do Pará e reforçam a necessidade de estabelecer uma vigilância sob enfoque de risco contínuo e comum a todo o Estado do Pará (SANTOS, 2013).

No entanto, ainda que seja louvável todo o empenho, iniciado nos últimos anos, da Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará em treinamentos teóricos e práticos de milhares de produtores artesanais de açaí, com relação ao branqueamento do fruto (SAMPAIO et al., 2013), é indispensável destacar o papel que a educação básica associada a essa realidade desempenhará a médio e longo prazo para a prevenção.

Portanto, uma educação básica de qualidade, pautada em políticas públicas eficazes e que seja estendida a todo o Estado do Pará, inclusive a ilhas distantes da região metropolitana, servirá de modelo a toda região Norte e facilitará que práticas eficientes de higiene durante toda a cadeia produtiva do açaí sejam estabelecidas de forma contínua à população e aos produtores artesanais da polpa de açaí, para a não ocorrência de DCA de transmissão alimentar nas próximas décadas (OPAS, 2010).

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, concluiu-se que:

1. O modelo isogênico imunodeficiente B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag) foi eficiente para o estudo da DCA, sendo observado um período de tempo relativamente curto desde a constatação da infecção até a morte, entre o 4º e o 26º dia após as infecções experimentais, respectivamente para as doses máxima e mínima testadas;
2. O modelo isogênico imunodeficiente B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag) ampliará a perspectiva do uso de modelos imunodeficientes na pesquisa em doenças negligenciadas e contribuirá para novos estudos da DCA;
3. *Trypanosoma cruzi* obtidos de triatomíneos (vetores) *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans (PA), *R. pictipes* do Rio Ajuai (PA) e *Rhodnius* sp. da Ilha do Combu (PA) foram capazes de preservar sua virulência *in vivo*, causar DCA e morte, em geral, respectivamente entre o 14º e o 46º dias após as infecções experimentais, bem como para *T. cruzi* do reservatório *Philander opossum* da Ilha do Combu (PA), entre os 21º e o 38º dias, em hospedeiros isogênicos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag);
4. Embora todos os *T. cruzi* foram virulentos, houve diferença significativa ($p < 0,0001$; $F = 80,64$) para a constatação da DCA nos hospedeiros (retardo de até 12 dias), entre *T. cruzi* provenientes de triatomíneos (vetores) e reservatório (Tcl) - associados ao ciclo silvestre - em relação à cepa Y de *T. cruzi* (TclI), associada ao ciclo doméstico;
5. Não houve diferença significativa ($p > 0,0001$) para a constatação da DCA via oral nos hospedeiros entre *T. cruzi* provenientes de triatomíneos *Rhodnius pictipes* (Tcl) de distintas localizações no Estado do Pará - Mata do Val-De-Cans e do Rio Ajuai. Portanto, considerando a demonstração experimental da presença da virulência do *T. cruzi*, o risco da ocorrência da DCA de transmissão alimentar é possível em ambas as áreas, caracterizadas anteriormente do ponto de vista eco-epidemiológico como potenciais para transmissão da DCA;

6. *T. cruzi* obtidos de triatomíneos (vetores) *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans (PA) e *Rhodnius pictipes* do Rio Ajuai (PA), bem como do reservatório *Philander opossum* da Ilha do Combu (PA), após o contato com a polpa *in natura* de açaí, por meio das vias intraperitoneal, gavagem e oral, foram capazes de preservar sua virulência *in vivo*, causar DCA e morte, em geral, respectivamente entre o 17º e o 52º dias após as infecções experimentais, em hospedeiros isogênicos imunodeficientes B6.129S7Rag1^{-/-tmMom}/J Unib (Rag);

7. Os resultados experimentais estão de acordo com estudos eco-epidemiológicos anteriores e possibilitam comparações com a sintomatologia e severidade dos casos clínicos em estudos anatomopatológicos posteriores, considerando as diferentes interações parasito-hospedeiro-ambiente;

8. Uma educação básica de qualidade, pautada em políticas públicas eficazes, facilitará que boas práticas de higiene sejam estabelecidas durante toda a cadeia produtiva do açaí e evitará a ocorrência de DCA de transmissão alimentar na região Norte do país.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F.; FERRAZ, G.; CAMPOS, C.; PALOMEQUE, F. S.; GRIJALVA, M. J.; MARCELO AGUILAR, H.; MILES, M. A. ***Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: Infestation of Amazonian palm trees by Triatomine bugs at three spatial scales.*** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4(3), e620, 2010.

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. A. ***Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): Implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions.*** *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102(1), p. 57-70, 2007.

ALBAJAR, P. V.; LAREDO, S. V.; TERRAZAS, M. B.; COURA, J. R. ***Miocardiópatia dilatada em pacientes com infecção chagásica crônica. Relato de dois casos fatais autóctones do Rio Negro, Estado do Amazonas.*** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36(3), p. 401-407, mai-jun, 2003.

ALVES, D. P. ***Trypanosoma cruzi: A influência dos linfócitos T na regulação da infecção experimental em camundongos SCID.*** 1998. 85 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.

ANNE CROY, B.; DI SANTO, J. P.; MANZ, M.; BANKERT, R. B. ***Mouse models of immunodeficiency. In: The mouse in biomedical research***, v. IV, *Immunology*, 2 ed., J. G Fox et al. Eds., Elsevier, p. 275-290, 2007.

AÑEZ, N.; CRISANTE, G. ***Supervivencia de formas de cultivo de Trypanosoma cruzi en alimentos experimentalmente contaminados.*** *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, n. XLVIII(1), p. 91-94, 2008.

ARAÚJO, C. A. C.; WANIEK, P. J.; XAVIER, S. C.; JANSEN, A. M. ***Genotype variation of Trypanosoma cruzi isolates from different Brazilian biomes.*** *Experimental Parasitology*, v. 127(1), p. 308-312, 2011.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; PIRMEZ, C. **Normas de segurança para o trabalho com *Trypanosoma cruzi***. In: Doença de Chagas: Manual para experimentação. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 125-132, 2000.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Imperial Novo Milênio Gráfica e Editora Ltda., Rio de Janeiro, 2008, 63p.

BELÉM. PORTAL DA PREFEITURA MUNICIPAL DE BELÉM. **Belém**. 2014a. Disponível em: <<http://www.belem.pa.gov.br>>. Acesso em: 14 mai. 2014.

BELÉM. PORTAL DA PREFEITURA MUNICIPAL DE BELÉM. **Ilha do Combu**. 2014b. Disponível em: <<http://www.belem.pa.gov.br/app/c2ms/v/?id=10&conteudo=2718>>. Acesso em: 14 mai. 2014.

BEZERRA, V. S. **Açaí congelado**. Coleção Agroindústria Familiar. Embrapa Amapá, 2007, 45p.

BRENER, Z. ***Therapeutic activity an criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi***. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRICEÑO-LEÓN, R. ***Chagas disease and globalization of the Amazon***. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23(1), p. S33-S40, 2007.

BRICEÑO-LEÓN, R. ***La enfermedad de Chagas en las Américas: Una perspectiva de ecosalud***. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25(1), p. S71-S82, 2009.

CAMARGO, M. E.; SILVA, G. R.; CASTILHO, E. A.; SILVEIRA, A. C. **Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 26(4), p. 192-204, jul-ago, 1984.

CHAGAS, C. *Infection naturelle des singes du Para (Chrysomys sciureus L.), par Trypanosoma cruzi*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires de la Société de Biologie et de ses Filiales, v. 90, p. 873-876, 1924.

CHARLES RIVER. **Modelos de imunodeficiência**. USA: Charles River, 2012, 25p.

COLTRYP. COLEÇÃO DE *Trypanosoma* DE MAMÍFEROS SILVESTRES, DOMÉSTICOS E VETORES. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Coleção de Trypanosoma de mamíferos silvestres, domésticos e vetores**. 2014. Disponível em: <<http://coltryp.fiocruz.br>>. Acesso em: 16 mai. 2014.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conjuntura mensal. Açaí (fruto). Período: 01 a 30/06/2010**. 2010. Disponível em: <<http://portal.mda.gov.br/o/7446519>>. Acesso em: 9 mai. 2012.

COSTA, S. C. G. *Mouse as a model for Chagas disease: Does mouse represent a good model for Chagas disease?*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 94(I), p. 269-272, 1999.

COURA, J. R. *Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible?* Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 108(8), p. 962-967, 2013.

COURA, J. R. *Chagas Disease: What is known and what is needed - A background article*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102(1), p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; BARRETT, T. V.; NARANJO, M. A. **Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão chagásica?** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 27(4), p. 251-253, out-dez, 1994a.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. ***Chagas disease. What is know and what should be improved: A systemic review.*** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 45(3), p. 286-296, *may-jun*, 2012.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. ***Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery.*** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104(I), p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V. ***Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region.*** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 107(2), p. 145-154, *mar*, 2012.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A. S.; MILES, M. A. ***Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil.*** Trends in Parasitology, v. 18(4), p. 171-176, 2002.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; GIORDANO, C. M.; FUNATSU, I. R. K. ***Chagas' Disease in the brazilian Amazon. I- A short review.*** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 36(4), p. 363-368, *jul-ago*, 1994b.

COURA, J. R.; WILLCOX, H. P. F.; NARANJO, M. A.; FERNANDES, O.; PAIVA, D. D. ***Chagas' disease in the Brazilian Amazon. III. A cross-sectional study.*** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 37(5), p. 415-420, *set-out*, 1995.

COX, F. E. ***Systematics of the parasitic Protozoa.*** Trends in Parasitology, v. 18(3), p. 108, 2002.

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

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. ***Should Trypanosoma cruzi be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection.*** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98(1), p. 1-12, 2003.

DIAS, J. C. P. **Globalização, iniquidade e doença de Chagas.** Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23(1), p. S13-S22, 2007.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. A. **Mecanismos alternativos de transmissão do Trypanosoma cruzi no Brasil e sugestões para sua prevenção.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 44(3), p. 375-379, mai-jun, 2011.

DIAZ-UNGRÍA, C. **Estudio experimental del Trypanosoma cruzi en el perro y otros vertebrados. El problema de la transmisión.** Kasmera (Venezuela), v. 3, p. 73-88, 1968.

FLORES, D. A.; BARQUEZ, R. M.; DÍAZ, M. M. **A new species of Philander Brisson, 1762 (Didelphomorphia, Didelphidae),** Mammalian Biology, v. 73, p. 14-24, 2008.

FORATTINI, O. P. **Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil.** Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.14, p. 265-299, 1980.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D. S.; JURBERG, J. **A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes.** Zootaxa, v. 202, p. 1-36, 2003.

GOOGLE SATÉLITE. **Abaetetuba.** 2014a. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/Abaetetuba+-+PA/@-1.7292282,-48.8733498,6458m/data=!3m2!1e3!4b1!4m2!3m1!1s0x92a35aaef67525e1:0x5133bd522acf7fdd>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

GOOGLE SATÉLITE. **Ajuaí (Abaetetuba)**. 2014b. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/search/Ajua%C3%AD+Abaetetuba+-+PA/@-1.7292282,-48.8733498,6458m/data=!3m2!1e3!4b1>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

GOOGLE SATÉLITE. **Belém**. 2014c. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/Bel%C3%A9m,+PA/@-1.3446295,-48.4394103,51676m/data=!3m2!1e3!4b1!4m2!3m1!1s0x92a46669f5986e5f:0xe336db2d6ab189cc>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

GOOGLE SATÉLITE. **Ilha do Combu (Belém)**. 2014d. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/@-1.3446295,-48.4394104,51676m/data=!3m1!1e3>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

GOOGLE SATÉLITE. **Pará (Belém)**. 2014e. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/@-1.3446295,-48.4394104,51676m/data=!3m1!1e3>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

GOOGLE SATÉLITE. **Val-De-Cans (Belém)**. 2014f. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/Aeroporto+Internacional+de+Bel%C3%A9m%2FVal-de-Cans+-+J%C3%BAlcio+Cezar+Ribeiro/@-1.382061,-48.477523,12919m/data=!3m1!1e3!4m2!3m1!1s0x92a48a1da3c40c13:0xf038872483a4bbd7>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

GURGEL-GONÇALVES, R. **Filogeografia, morfometria e distribuição geográfica potencial de populações de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) no Brasil**. 2008. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília. Brasília. 2008.

GURGEL-GONÇALVES, R.; GALVÃO, C.; COSTA, J.; PETERSON, A. T. ***Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling***. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2012, p. 1-15, 2012.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades - Abaetetuba**. 2014a. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=150010&search=para|abaetetuba>>. Acesso em: 15 mai. 2014.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades - Belém**. 2014b. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=150140&search=||infográficos:-informações-completas>>. Acesso em: 15 mai. 2014.

INFRAERO. EMPRESA BRASILEIRA DE INFRAESTRUTURA AEROPORTUÁRIA. **Aeroporto Internacional de Belém/Val-De-Cans-Júlio Cezar Ribeiro**. 2014. Disponível em: <<http://www.infraero.gov.br/index.php/aeroportos/para/aeroporto-internacional-de-belem.html>>. Acesso em: 14 mai. 2014.

JACKSON LABORATORY. **International Mouse Strain Resource (IMSR)**. 2014. Disponível em: <www.findmice.org>. Acesso em: 14 mai. 2014.

JANSEN, A. M.; PINHO, A. P. S.; LISBOA, C. V.; CUPOLILLO, E.; MANGIA, R. H.; FERNANDES, O. **The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94(1), p. 203-204, 1999.

KEESING, F.; HOLT, R. D.; OSTFELD, R. S. **Effects of species diversity on disease risk**. *Ecology Letters*, v. 9(4), p. 485-498, 2006.

KRUSE H.; KIRKEMO, A. M.; HANDELAND, K. **Wildlife as source of zoonotic infections**. *Emerging Infectious Diseases*, v. 10(12), p. 2067-2072, 2004.

LABELLO BARBOSA, R. **Transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* pela polpa de açaí em camundongos**. 2010. 134 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.

LABELLO BARBOSA, R.; DIAS, V. L.; PEREIRA, K.S.; SCHMIDT, F. L.; FRANCO, R. M. B.; GUARALDO, A. M. A.; ALVES, D. P.; PASSOS, L. A. C. ***Survival in vitro and virulence of Trypanosoma cruzi in açai pulp in experimental acute Chagas disease.*** *Journal of Food Protection*, v. 75, p. 601-606, 2012.

LENKO, K.; PAPAVERO, N. **Insetos no Folclore.** São Paulo: Conselho Estadual de Artes e Ciências Humanas. Coleções Folclore, 1979, 518p.

LEW, D.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, R.; VENTURA, J. ***Two new species of Philander (Didelphomorphia, Didelphidae) from northern South America.*** *Journal of Mammalogy*, v. 87(2), p. 224-237, 2006.

LISBOA, C. V.; XAVIER, S. C.; HERRERA, H. M.; JANSEN, A. M. ***The ecology of the Trypanosoma cruzi transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts of Brazilian biotopes.*** *Veterinary Parasitology (Print)*, v. 10, p. 19-24, 2009.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. ***Genetic variability of Trypanosoma cruzi: Implications for the pathogenesis of Chagas' disease.*** *Parasitology Today*, v. 14(3), p. 119-124, 1998.

MERUSSE, J. L. B.; LAPICHNIK, V. B. V. **Instalações e equipamentos.** In: Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. São Paulo: EPM, 1996, 259p.

MEZADRI, T. J.; TOMAZ, V. A.; AMARAL, V. L. L. **Animais de Laboratório. Cuidados na iniciação experimental.** Florianópolis: UFSC, 2004, 154p.

MILES, M. A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYE, P. J. ***Isozymic heterogeneity of Trypanosoma cruzi in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil.*** *Nature*, v. 272, p. 819-821, 1978.

MONTEIRO, W. M.; MAGALHÃES, L. K. C.; OLIVEIRA, J. C.; GUERRA, J. A. O.; SILVEIRA, H.; FERREIRA, L. C. L.; TOLEDO, M. J. O.; BARBOSA, M. G. V. ***Biological behavior of Trypanosoma cruzi stocks obtained from the State of Amazonas, Western Brazilian Amazon, in mice.*** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 45(2), p. 209-214, mar-abr, 2012.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Consenso Brasileiro em Doença de Chagas.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38(III), 2005a, 29p.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Doença de Chagas. Informações Técnicas.** 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/646-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doenca-de-chagas/l2-doenca-de-chagas/11114-informacoes-tecnicas-chagas>>. Acesso em: 23 abr. 2014.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** Doença de Chagas. 2005b. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vig_epid_novo2.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2014.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W. N. ***Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brasil.*** Emerging Infectious Diseases, v. 15(4), p. 653-655, 2009.

NOIREAU, F.; CARBAJAL-DE-LA-FUENTE, A. L.; LOPES, C. M.; DIOTAIUTI, L. ***Some considerations about the ecology of Triatominae.*** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 77(3), p. 431-436, 2005.

ONG, F. M. P.; RODRIGUES, L. D. **Seção de Experimentação.** In: NEVES, S. M. P.; MANCINI FILHO, J.; de MENEZES, E. W. (Org.). Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: USP, p. 91-154, 2013.

OPAS. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Estrategia y plan de acción para la prevención, el control y la atención de la enfermedad de Chagas.** 50º Consejo Directivo. 62ª Sesión del Comité Regional, 2010, 26p.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39(5), p. 512-514, 2006.

OSTERMAYER, A. L.; PASSOS, A. D. C.; SILVEIRA, A. C.; FERREIRA, A. W.; MACEDO, V.; PRATA, A. R. **O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008).** História sobre a Doença de Chagas no Brasil, V. 44(II), 2011.

PASSOS, L. A. C. **Análise do determinismo genético da resistência de camundongos infectados experimentalmente com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** 2003. 137 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

PASSOS, L. A. C.; GUARALDO, A. M. A.; LABELLO BARBOSA, R.; DIAS, V. L.; PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; FRANCO, R. M. B.; ALVES, D. P. **Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*.** Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 21(2), p. 213-222, abr-jun, 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(2), p. 441-446, 2009.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; LABELLO BARBOSA, R.; GUARALDO, A. M. A.; FRANCO, R. M. B.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. C. ***Transmission of Chagas' disease (American trypanosomiasis) by foods.*** Foods and American trypanosomiasis, v. 59, p. 63-85, 2010.

PINTO, A. Y. N.; FERREIRA JUNIOR, A. G.; VALENTE, V. C.; HARADA, G. S.; VALENTE S. A. S. **Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole.** *Revista Panamericana de Salud Publica*, v. 25(1), p. 77-83, 2009.

PINTO, A. Y. N.; VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C. **Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement.** *The Brazilian Journal of Infection Disease*, v. 8(6), p. 454-460, 2004.

PINTO, A. Y. N.; VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; FERREIRA JUNIOR, A. G.; COURA, J. R. **Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41(6), p. 602-614, nov-dez, 2008.

PROMED. *INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES.* **Ananás vive surto da doença de Chagas.** 2011a. Disponível em: <<http://surgiu.com.br/noticia/21028/ananas-vive-surto-da-doenca-de-chagas.html>>. Acesso em: 13 dez. 2012.

PROMED. *INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES.* **Registrado surto de doença de Chagas em município do Amazonas.** 2011b. Disponível em: <<http://www.sidneyrezende.com/noticia/117110+registrado+surto+de+doenca+de+chagas+em+municipio+do+amazonas>>. Acesso em: 13 dez. 2012.

REIS, D.; MONTEIRO, W. M.; BOSSOLANI, G. D. P.; TESTON, A. P. M.; GOMES, M. L.; ARAÚJO, S. M.; BARBOSA, M. G. V.; TOLEDO, M. J. O. **Biological behaviour in mice of Trypanosoma cruzi isolates from Amazonas and Paraná, Brazil.** *Experimental Parasitology*, v. 130, p. 321-329, 2012.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação.** Belém: UFPA, 2000, 315p.

ROMAÑA, C. A.; PIZARRO, J. C. N.; RODAS, E.; GUILBERT, E. ***Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease.*** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, p. 594-595, 1999.

ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. C.; DA ROCHA, M. G.; DUARTE, A. C.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. ***Trypanosoma cruzi transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks.*** *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v. 79(5), p. 742-749, 2008.

ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. C.; GERHARDT, M.; SILVA, M. F. O.; LIMA, V. S.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. ***Trypanosoma cruzi among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area.*** *Veterinary Parasitology*, v. 193, p. 71-77, 2013.

SAGRI. SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA. GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ. **A importância do açaí no contexto econômico, social e ambiental do Estado do Pará.** 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fruticultura/27RO/App_A%C3%A7ai.pdf>. Acesso em: 18 mai. 2012.

SAMPAIO, P. B.; PANTOJA, D.; SANTOS, M. G. **Estratégias de treinamento teórico/prático para realização da etapa de branqueamento em frutos de açaí com processadores artesanais do município de Belém/PA.** p. 1140-1143. XVIII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos – ENAAL. IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos. Gestão e Inovação Tecnológica. São Paulo. 15 a 18 de setembro de 2013.

SANTOS, B. F. **Macro e micro ambientes.** *In: Animais de laboratório: Criação e experimentação.* Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002, 388p.

SANTOS, S. O. **Eco-epidemiologia da doença de Chagas aguda em área amazônica. Município de Abaetetuba, Estado do Pará, Brasil, 2008 – 2009.** 2013. 161 f. Tese (Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais. 2013.

SANTOS-MALLET, J. R. **Vetores da doença de Chagas e sua relação com o hospedeiro vertebrado e o parasita.** *In: Doença de Chagas: Manual para experimentação animal.* Tânia C. Araújo-Jorge & Solange L. de Castro (Orgs.), Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz, p. 25-31, 2000.

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

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. **Oral transmission of Chagas disease.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 54(6), p. 845-852, 2012.

SILVEIRA, A. C.; SILVA, G. R.; PRATA, A. **O Inquérito de soroprevalência da infecção chagásica humana (1975-1980).** *História sobre a Doença de Chagas no Brasil*, v. 44(II), 2011.

SOUZA-LIMA, R. C.; BARBOSA, M. G. V.; COURA, J. R.; ARCANJO, A. R. L.; NASCIMENTO, A. S.; FERREIRA, J. M. B. B.; MAGALHÃES, L. K.; ALBUQUERQUE, B. C.; ARAÚJO, G. A. N.; GUERRA, J. A. O. **Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46(4), p. 510-514, jul-ago, 2013.

STEINDEL, M.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J. **Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa.** *Ciência Hoje*, v. 37, p. 32-38, 2005.

STEINDEL, M.; KRAMER, PACHECO, L.; SCHOLL, D.; SOARES, M. D. E.; MORAES, M. H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C.; STOCO, P. H.; MURTA, S. M. D. E.; CARVALHO-PINTO, C. J.; GRISARD, E. C.

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(1), p. 25-32, 2008.

SUÁREZ, D. C.; REY, A. P.; ORDUZ, M. L.; PRADA, R. L.; TARAZONA, Z. ***Supervivencia de Trypanosoma cruzi en bebidas experimentalmente contaminadas***. Biomedica, v. 32, p. 134-138, 2012.

TECHNICAL REPORT. ***2nd Meeting intergovernamental initiative of Chagas' disease surveillance and prevention in the Amazônia***. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39(3), p. 311-317, mai-jun, 2006.

TEIXEIRA, A. R. L.; MONTEIRO, P. S.; REBELO, J. M.; ARGANARAZ, E. R.; VIEIRA, D.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R.; VEXENAT, C. A.; SILVA, A. R.; AULT, S. K.; COSTA, J. M. ***Emerging Chagas disease: Trophic network and cycle of transmission of Trypanosoma cruzi from palm trees in the Amazon***. Emerging Infectious Diseases, v. 7(1), p. 100-112, jan-fev, 2001.

TOSO, A. M.; VIAL, F. U.; GALANTI, N. ***Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral***. Revista Medica de Chile, v. 139(2) p. 258-266, 2011.

VALENTE, S. A. S. ***Estudos dos surtos de doença da Chagas ocorridas no Pará e Amapá: Análise parasitológica, sorológica e molecular***. 2008. 162 f. Tese (Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2008.

VALENTE, S. A. S.; COSTA, V. G.; SOUZA, A. A. A.; LIMA, J. A. N. ***Reservatórios e vetores silvestres de T. cruzi em Barcarena - PA***. XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belém - Pará. Programa e Resumos dos Temas Livres e Pôsteres, n. 82, p. 37, 1992.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; FRAIHA NETO, H. ***Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon***. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94(I), p. 395-398, 1999.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; PINTO, A. Y. N.; CÉSAR, M. J. B.; SANTOS, M. P.; MIRANDA, C. O. S.; CUERVO, P., FERNANDES, O. ***Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites.*** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, p. 291-297, 2009.

VALENTE, V. C. **Estudo genotípico de *Trypanosoma cruzi*: Epidemiologia e caracterização molecular de isolados do homem, triatomíneos e mamíferos silvestres do Pará, Amapá e Maranhão.** 2011. 164 f. Tese (Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Universidade Federal do Pará. Belém. 2011.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. ***Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference.*** Baltimore: Johns Hopkins University Press, 3 ed., v. 1, p. 3-18, 2005.

XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R.; BILAC, D.; ARAÚJO, V. A. L. ; COSTA NETO, S. F. ; LOROSA, E. S. ; SILVA, L. F. C. F.; JANSEN, A. M. ***Distantiae transmission of Trypanosoma cruzi: A new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil.*** *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8(5), p. 1-9, may, 2014.

XAVIER, S. S.; SOUSA, A. S.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V.; BÓIA, M. N.; COURA, J. R. **Cardiopatia chagásica crônica no Rio Negro, Estado do Amazonas. Relato de três novos casos autóctones, comprovados por exames sorológicos, clínicos, radiográficos do tórax, eletro e ecocardiográficos.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39(2), p. 211-216, mar-abr, 2006.

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

YOSHIDA, N.; TYLER, K. M.; LLEWELLYN, M. S. ***Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites.*** *Trends in Parasitology*, v. 27(10), p. 459-466, 2014.

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

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. ***A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI.*** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104(7), p. 1051-1054, 2009.

8. APÊNDICE

8.1. Gráficos comparativos

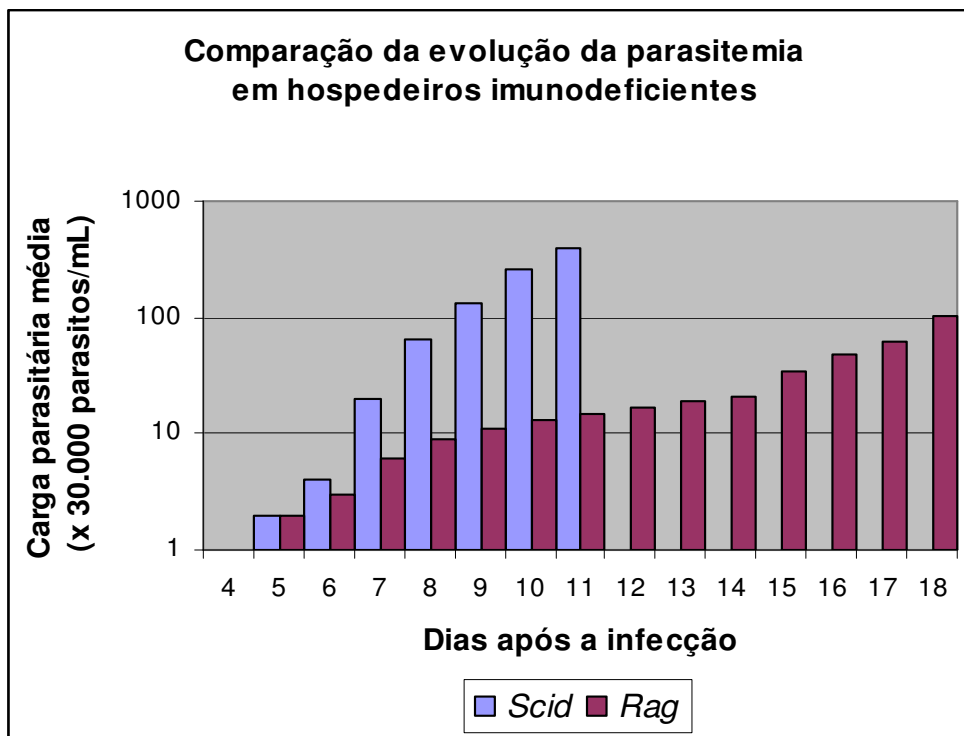


Figura 7. Comparação da evolução da parasitemia entre diferentes modelos animais isogênicos imunodeficientes infectados com 10^5 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

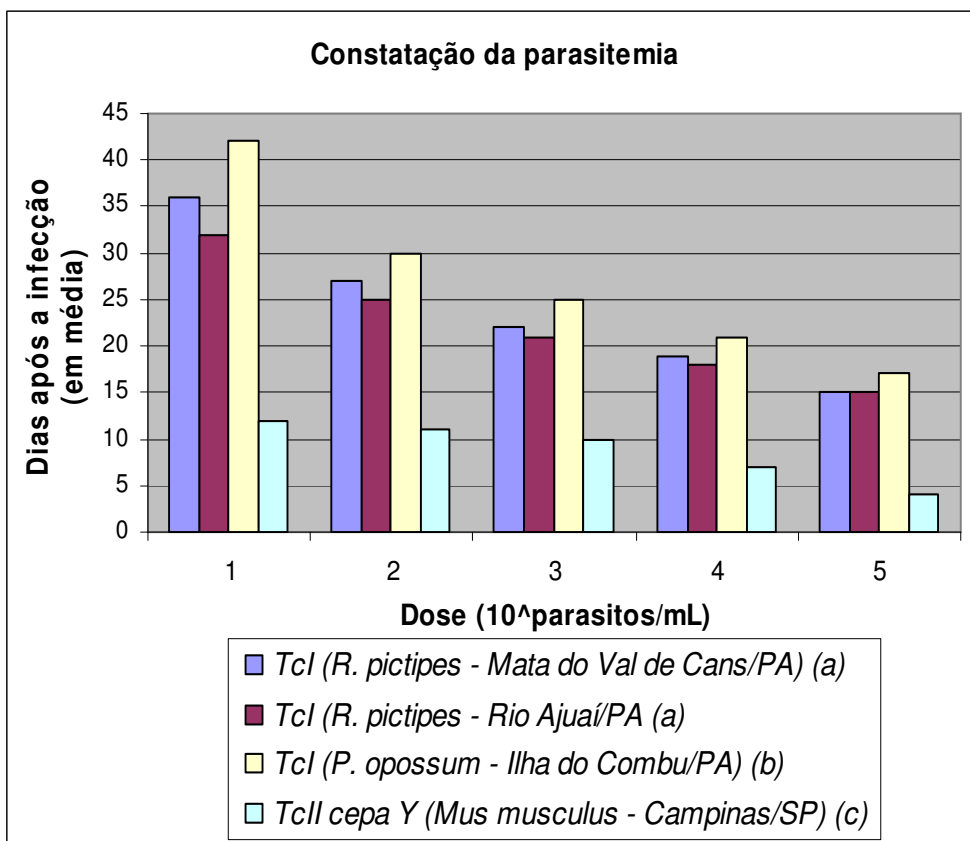


Figura 8. Comparação da constatação da DCA entre diferentes doses de *T. cruzi* (TcI e TcII) de diversas fontes e localizações. Letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

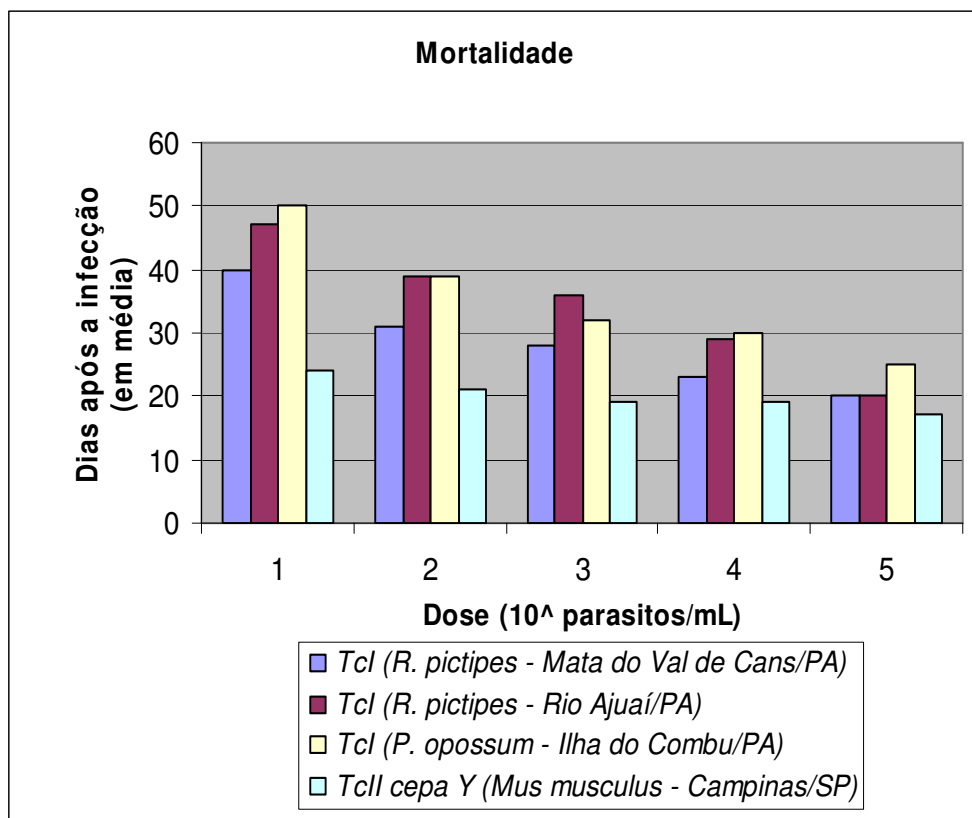


Figura 9. Comparação da mortalidade de hospedeiros isogênicos imunodeficientes entre diferentes doses de *T. cruzi* (Tcl e TcII) de diversas fontes e localizações.

8.2. Datos estadísticos

The SAS System 157
14:23 Thursday, February 27, 2014

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Sample | 4 | 1 2 3 4 |
| Inoc | 2 | PC TG |
| Way | 3 | Gav Oral ip |
| Number of Observations Read | | 56 |
| Number of Observations Used | | 56 |

The SAS System 158
14:23 Thursday, February 27, 2014

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 15 | 5673.130952 | 378.208730 | 97.16 | <.0001 |
| Error | 40 | 155.708333 | 3.892708 | | |
| Corrected Total | 55 | 5828.839286 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.973287 | 8.888794 | 1.972995 | 22.19643 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 2374.089286 | 791.363095 | 203.29 | <.0001 |
| Inoc | 1 | 282.449074 | 282.449074 | 72.56 | <.0001 |
| Way | 2 | 2787.125000 | 1393.562500 | 357.99 | <.0001 |
| Sample*Inoc | 3 | 13.717593 | 4.572531 | 1.17 | 0.3315 |
| Sample*Way | 4 | 171.625000 | 42.906250 | 11.02 | <.0001 |
| Inoc*Way | 2 | 44.125000 | 22.062500 | 5.67 | 0.0068 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 1005.025000 | 335.008333 | 86.06 | <.0001 |
| Inoc | 1 | 266.010314 | 266.010314 | 68.34 | <.0001 |
| Way | 2 | 2787.125000 | 1393.562500 | 357.99 | <.0001 |
| Sample*Inoc | 3 | 14.200000 | 4.733333 | 1.22 | 0.3164 |
| Sample*Way | 4 | 171.625000 | 42.906250 | 11.02 | <.0001 |
| Inoc*Way | 2 | 44.125000 | 22.062500 | 5.67 | 0.0068 |

The SAS System 159
14:23 Thursday, February 27, 2014

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 40 |

Error Mean Square 3.892708
 Harmonic Mean of Cell Sizes 12.8

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
| Critical Range | 1.576 | 1.657 | 1.710 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
|-----------------|---------|----|--------|
| A | 28.1875 | 16 | 3 |
| B | 23.8125 | 16 | 2 |
| C | 22.0000 | 16 | 1 |
| D | 7.3750 | 8 | 4 |

The SAS System 160
 14:23 Thursday, February 27, 2014

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the
 experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 40
 Error Mean Square 3.892708
 Harmonic Mean of Cell Sizes 27.85714

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | |
|-----------------|-------|
| Number of Means | 2 |
| Critical Range | 1.068 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Inoc |
|-----------------|---------|----|------|
| A | 23.2667 | 30 | TG |
| B | 20.9615 | 26 | PC |

The SAS System 161
 14:23 Thursday, February 27, 2014

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the
 experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 40
 Error Mean Square 3.892708
 Harmonic Mean of Cell Sizes 15.15789

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | | |
|-----------------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 |
| Critical Range | 1.448 | 1.523 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Way |
|-----------------|---------|----|------|
| A | 34.3333 | 12 | Oral |
| B | 29.9167 | 12 | Gav |
| C | 14.7500 | 32 | ip |

The SAS System 162
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=1 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-------|--------|-------------|
| Inoc | 2 | PC TG |
| Way | 3 | Gav Oral ip |

Number of Observations Read 16
Number of Observations Used 16

The SAS System 163
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=1 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 5 | 593.0000000 | 118.6000000 | 43.93 | <.0001 |
| Error | 10 | 27.0000000 | 2.7000000 | | |
| Corrected Total | 15 | 620.0000000 | | | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
| 0.956452 | 7.468944 | 1.643168 | 22.00000 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Inoc | 1 | 64.0000000 | 64.0000000 | 23.70 | 0.0007 |
| Way | 2 | 524.5000000 | 262.2500000 | 97.13 | <.0001 |
| Inoc*Way | 2 | 4.5000000 | 2.2500000 | 0.83 | 0.4627 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Inoc | 1 | 67.6000000 | 67.6000000 | 25.04 | 0.0005 |
| Way | 2 | 524.5000000 | 262.2500000 | 97.13 | <.0001 |
| Inoc*Way | 2 | 4.5000000 | 2.2500000 | 0.83 | 0.4627 |

The SAS System 164
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=1 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 10 |
| Error Mean Square | 2.7 |

| | |
|-----------------|-------|
| Number of Means | 2 |
| Critical Range | 1.831 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Inoc |
|-----------------|---------|---|------|
| A | 24.0000 | 8 | TG |
| B | 20.0000 | 8 | PC |

The SAS System 165
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=1 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|-----------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 10 |
| Error Mean Square | 2.7 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 4.8 |

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | | |
|-----------------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 |
| Critical Range | 2.363 | 2.470 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Way |
|-----------------|--------|---|------|
| A | 29.750 | 4 | Oral |
| B | 25.250 | 4 | Gav |
| C | 16.500 | 8 | ip |

The SAS System 166
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=2 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-------|--------|-------------|
| Inoc | 2 | PC TG |
| Way | 3 | Gav Oral ip |

| | |
|-----------------------------|----|
| Number of Observations Read | 16 |
| Number of Observations Used | 16 |

----- Sample=2 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 5 | 857.6875000 | 171.5375000 | 75.40 | <.0001 |
| Error | 10 | 22.7500000 | 2.2750000 | | |
| Corrected Total | 15 | 880.4375000 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.974161 | 6.334112 | 1.508310 | 23.81250 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Inoc | 1 | 60.0625000 | 60.0625000 | 26.40 | 0.0004 |
| Way | 2 | 788.0625000 | 394.0312500 | 173.20 | <.0001 |
| Inoc*Way | 2 | 9.5625000 | 4.7812500 | 2.10 | 0.1730 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Inoc | 1 | 65.0250000 | 65.0250000 | 28.58 | 0.0003 |
| Way | 2 | 788.0625000 | 394.0312500 | 173.20 | <.0001 |
| Inoc*Way | 2 | 9.5625000 | 4.7812500 | 2.10 | 0.1730 |

----- Sample=2 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|-------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 10 |
| Error Mean Square | 2.275 |

| | |
|-----------------|-------|
| Number of Means | 2 |
| Critical Range | 1.680 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Inoc |
|-----------------|---------|---|------|
| A | 25.7500 | 8 | TG |
| B | 21.8750 | 8 | PC |

----- Sample=2 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|-----------------------------|-------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 10 |
| Error Mean Square | 2.275 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 4.8 |

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | | |
|-----------------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 |
| Critical Range | 2.169 | 2.267 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Way |
|-----------------|---------|---|------|
| A | 32.2500 | 4 | Oral |
| B | 29.2500 | 4 | Gav |
| C | 16.8750 | 8 | ip |

The SAS System 170
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=3 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-------|--------|-------------|
| Inoc | 2 | PC TG |
| Way | 3 | Gav Oral ip |

| | |
|-----------------------------|----|
| Number of Observations Read | 16 |
| Number of Observations Used | 16 |

The SAS System 171
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=3 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 5 | 1854.937500 | 370.987500 | 49.14 | <.0001 |
| Error | 10 | 75.500000 | 7.550000 | | |
| Corrected Total | 15 | 1930.437500 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.960890 | 9.748031 | 2.747726 | 28.18750 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Inoc | 1 | 150.062500 | 150.062500 | 19.88 | 0.0012 |
| Way | 2 | 1646.187500 | 823.093750 | 109.02 | <.0001 |
| Inoc*Way | 2 | 58.687500 | 29.343750 | 3.89 | 0.0564 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Inoc | 1 | 193.600000 | 193.600000 | 25.64 | 0.0005 |
| Way | 2 | 1646.187500 | 823.093750 | 109.02 | <.0001 |
| Inoc*Way | 2 | 58.687500 | 29.343750 | 3.89 | 0.0564 |

The SAS System 172
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=3 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 10 |
| Error Mean Square | 7.55 |

| | |
|-----------------|-------|
| Number of Means | 2 |
| Critical Range | 3.061 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Inoc |
|-----------------|--------|---|------|
| A | 31.250 | 8 | TG |
| B | 25.125 | 8 | PC |

The SAS System 173
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=3 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|-----------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 10 |
| Error Mean Square | 7.55 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 4.8 |

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | | |
|-----------------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 |
| Critical Range | 3.952 | 4.130 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Way |
|-----------------|--------|---|------|
| A | 41.000 | 4 | Oral |
| B | 35.250 | 4 | Gav |
| C | 18.250 | 8 | ip |

The SAS System 174
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=4 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-------|--------|--------|
| Inoc | 2 | PC TG |
| Way | 1 | ip |

| | |
|-----------------------------|---|
| Number of Observations Read | 8 |
| Number of Observations Used | 8 |

The SAS System 175
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=4 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 1 | 22.04166667 | 22.04166667 | 72.14 | 0.0001 |
| Error | 6 | 1.83333333 | 0.30555556 | | |
| Corrected Total | 7 | 23.87500000 | | | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
| 0.923211 | 7.495197 | 0.552771 | 7.375000 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Inoc | 1 | 22.04166667 | 22.04166667 | 72.14 | 0.0001 |
| Way | 0 | 0.00000000 | . | . | . |
| Inoc*Way | 0 | 0.00000000 | . | . | . |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Inoc | 1 | 22.04166667 | 22.04166667 | 72.14 | 0.0001 |
| Way | 0 | 0.00000000 | . | . | . |
| Inoc*Way | 0 | 0.00000000 | . | . | . |

The SAS System 176
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=4 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|-----------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 6 |
| Error Mean Square | 0.305556 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 3 |

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | |
|-----------------|---|
| Number of Means | 2 |
|-----------------|---|

Critical Range 1.104

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Inoc |
|-----------------|--------|---|------|
| A | 8.3333 | 6 | TG |
| B | 4.5000 | 2 | PC |

The SAS System 177
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=4 -----

The GLM Procedure

| Level of Way | N | Mean | Std Dev |
|--------------|---|------------|------------|
| ip | 8 | 7.37500000 | 1.84681192 |

The SAS System 178
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Inoc=PC -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|--------|--------|-------------|
| Sample | 4 | 1 2 3 4 |
| Way | 3 | Gav Oral ip |

| | |
|-----------------------------|----|
| Number of Observations Read | 26 |
| Number of Observations Used | 26 |

The SAS System 179
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Inoc=PC -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 9 | 1822.461538 | 202.495726 | 40.25 | <.0001 |
| Error | 16 | 80.500000 | 5.031250 | | |
| Corrected Total | 25 | 1902.961538 | | | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
| 0.957698 | 10.70076 | 2.243045 | 20.96154 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 694.711538 | 231.570513 | 46.03 | <.0001 |
| Way | 2 | 1070.333333 | 535.166667 | 106.37 | <.0001 |
| Sample*Way | 4 | 57.416667 | 14.354167 | 2.85 | 0.0583 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|

| | | | | | |
|------------|---|-------------|------------|--------|--------|
| Sample | 3 | 359.790476 | 119.930159 | 23.84 | <.0001 |
| Way | 2 | 1070.333333 | 535.166667 | 106.37 | <.0001 |
| Sample*Way | 4 | 57.416667 | 14.354167 | 2.85 | 0.0583 |

The SAS System 180
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Inoc=PC -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|-----------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 16 |
| Error Mean Square | 5.03125 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 4.571429 |

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
| Critical Range | 3.145 | 3.298 | 3.394 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
|-----------------|--------|---|--------|
| A | 25.125 | 8 | 3 |
| B | 21.875 | 8 | 2 |
| B | 20.000 | 8 | 1 |
| C | 4.500 | 2 | 4 |

The SAS System 181
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Inoc=PC -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|-----------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 16 |
| Error Mean Square | 5.03125 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 7.411765 |

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | | |
|-----------------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 |
| Critical Range | 2.470 | 2.590 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Way |
|-----------------|--------|----|------|
| A | 31.000 | 6 | Oral |
| B | 26.667 | 6 | Gav |
| C | 14.214 | 14 | ip |

The SAS System 182
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Inoc=TG -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Sample | 4 | 1 2 3 4 |
| Way | 3 | Gav Oral ip |
| Number of Observations Read | | 30 |
| Number of Observations Used | | 30 |

The SAS System 183
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Inoc=TG -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 9 | 3805.283333 | 422.809259 | 181.53 | <.0001 |
| Error | 20 | 46.583333 | 2.329167 | | |
| Corrected Total | 29 | 3851.866667 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.987906 | 6.559430 | 1.526161 | 23.26667 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 1901.533333 | 633.844444 | 272.13 | <.0001 |
| Way | 2 | 1760.916667 | 880.458333 | 378.01 | <.0001 |
| Sample*Way | 4 | 142.833333 | 35.708333 | 15.33 | <.0001 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 748.883333 | 249.627778 | 107.17 | <.0001 |
| Way | 2 | 1760.916667 | 880.458333 | 378.01 | <.0001 |
| Sample*Way | 4 | 142.833333 | 35.708333 | 15.33 | <.0001 |

The SAS System 184
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Inoc=TG -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|-----------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 20 |
| Error Mean Square | 2.329167 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 7.384615 |

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
| Critical Range | 1.657 | 1.739 | 1.791 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
|-----------------|---------|---|--------|
| A | 31.2500 | 8 | 3 |
| B | 25.7500 | 8 | 2 |
| C | 24.0000 | 8 | 1 |
| D | 8.3333 | 6 | 4 |

The SAS System 185
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Inoc=TG -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate.

| | |
|-----------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 20 |
| Error Mean Square | 2.329167 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 7.714286 |

NOTE: Cell sizes are not equal.

| | | |
|-----------------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 |
| Critical Range | 1.621 | 1.701 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Way |
|-----------------|---------|----|------|
| A | 37.6667 | 6 | Oral |
| B | 33.1667 | 6 | Gav |
| C | 15.1667 | 18 | ip |

The SAS System 186
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Way=Gav -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|--------|--------|--------|
| Sample | 3 | 1 2 3 |
| Inoc | 2 | PC TG |

| | |
|-----------------------------|----|
| Number of Observations Read | 12 |
| Number of Observations Used | 12 |

The SAS System 187
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Way=Gav -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 5 | 367.4166667 | 73.4833333 | 20.51 | 0.0010 |
| Error | 6 | 21.5000000 | 3.5833333 | | |
| Corrected Total | 11 | 388.9166667 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.944718 | 6.327474 | 1.892969 | 29.91667 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 2 | 202.6666667 | 101.3333333 | 28.28 | 0.0009 |
| Inoc | 1 | 126.7500000 | 126.7500000 | 35.37 | 0.0010 |
| Sample*Inoc | 2 | 38.0000000 | 19.0000000 | 5.30 | 0.0472 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 2 | 202.6666667 | 101.3333333 | 28.28 | 0.0009 |
| Inoc | 1 | 126.7500000 | 126.7500000 | 35.37 | 0.0010 |
| Sample*Inoc | 2 | 38.0000000 | 19.0000000 | 5.30 | 0.0472 |

The SAS System 188
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Way=Gav -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 6 |
| Error Mean Square | 3.583333 |

| | | |
|-----------------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 |
| Critical Range | 3.275 | 3.395 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
|-----------------|--------|---|--------|
| A | 35.250 | 4 | 3 |
| B | 29.250 | 4 | 2 |
| C | 25.250 | 4 | 1 |

The SAS System 189
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Way=Gav -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the

experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 6 |
| Error Mean Square | 3.583333 |

| | |
|-----------------|-------|
| Number of Means | 2 |
| Critical Range | 2.674 |

Means with the same letter are not significantly different.

| | | | |
|-----------------|--------|---|------|
| Duncan Grouping | Mean | N | Inoc |
| A | 33.167 | 6 | TG |
| B | 26.667 | 6 | PC |

The SAS System 190
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Way=Oral -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| | | |
|--------|--------|--------|
| Class | Levels | Values |
| Sample | 3 | 1 2 3 |
| Inoc | 2 | PC TG |

| | |
|-----------------------------|----|
| Number of Observations Read | 12 |
| Number of Observations Used | 12 |

The SAS System 191
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Way=Oral -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 5 | 415.6666667 | 83.13333333 | 5.73 | 0.0276 |
| Error | 6 | 87.0000000 | 14.5000000 | | |
| Corrected Total | 11 | 502.6666667 | | | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
| 0.826923 | 11.09093 | 3.807887 | 34.33333 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 2 | 279.1666667 | 139.5833333 | 9.63 | 0.0134 |
| Inoc | 1 | 133.3333333 | 133.3333333 | 9.20 | 0.0230 |
| Sample*Inoc | 2 | 3.1666667 | 1.5833333 | 0.11 | 0.8983 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 2 | 279.1666667 | 139.5833333 | 9.63 | 0.0134 |
| Inoc | 1 | 133.3333333 | 133.3333333 | 9.20 | 0.0230 |
| Sample*Inoc | 2 | 3.1666667 | 1.5833333 | 0.11 | 0.8983 |

----- Way=Oral -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 6 |
| Error Mean Square | 14.5 |

| | | |
|-----------------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 |
| Critical Range | 6.589 | 6.828 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
|-----------------|--------|---|--------|
| A | 41.000 | 4 | 3 |
| B | 32.250 | 4 | 2 |
| B | 29.750 | 4 | 1 |

----- Way=Oral -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 6 |
| Error Mean Square | 14.5 |

| | |
|-----------------|-------|
| Number of Means | 2 |
| Critical Range | 5.379 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Inoc |
|-----------------|--------|---|------|
| A | 37.667 | 6 | TG |
| B | 31.000 | 6 | PC |

----- Way=ip -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-------|--------|--------|
|-------|--------|--------|

| | | |
|--------|---|---------|
| Sample | 4 | 1 2 3 4 |
| Inoc | 2 | PC TG |

| | |
|-----------------------------|----|
| Number of Observations Read | 32 |
| Number of Observations Used | 32 |

The SAS System 195
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Way=ip -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 7 | 661.4166667 | 94.4880952 | 122.03 | <.0001 |
| Error | 24 | 18.5833333 | 0.7743056 | | |
| Corrected Total | 31 | 680.0000000 | | | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
| 0.972672 | 5.965738 | 0.879946 | 14.75000 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 593.7500000 | 197.9166667 | 255.61 | <.0001 |
| Inoc | 1 | 66.0083333 | 66.0083333 | 85.25 | <.0001 |
| Sample*Inoc | 3 | 1.6583333 | 0.5527778 | 0.71 | 0.5533 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 572.5916667 | 190.8638889 | 246.50 | <.0001 |
| Inoc | 1 | 67.3878205 | 67.3878205 | 87.03 | <.0001 |
| Sample*Inoc | 3 | 1.6583333 | 0.5527778 | 0.71 | 0.5533 |

The SAS System 196
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Way=ip -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 24 |
| Error Mean Square | 0.774306 |

| | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
| Critical Range | .9081 | .9537 | .9831 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
|-----------------|---------|---|--------|
| A | 18.2500 | 8 | 3 |
| B | 16.8750 | 8 | 2 |
| B | 16.5000 | 8 | 1 |

C 7.3750 8 4

The SAS System 197
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Way=ip -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.774306
Harmonic Mean of Cell Sizes 15.75

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means 2
Critical Range .6472

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Inoc |
|-----------------|---------|----|------|
| A | 15.1667 | 18 | TG |
| B | 14.2143 | 14 | P |

The SAS System 229
14:23 Thursday, February 27, 2014

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|--------|--------|-----------------------------|
| Sample | 4 | 1 2 3 4 |
| Dose | 5 | 1.000 10 10.000 100 100.000 |

Number of Observations Read 40
Number of Observations Used 40

The SAS System 230
14:23 Thursday, February 27, 2014

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 19 | 3715.475000 | 195.551316 | 80.64 | <.0001 |
| Error | 20 | 48.500000 | 2.425000 | | |
| Corrected Total | 39 | 3763.975000 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.987115 | 7.605573 | 1.557241 | 20.47500 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 1976.075000 | 658.691667 | 271.63 | <.0001 |
| Dose | 4 | 1515.350000 | 378.837500 | 156.22 | <.0001 |
| Sample*Dose | 12 | 224.050000 | 18.670833 | 7.70 | <.0001 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 1976.075000 | 658.691667 | 271.63 | <.0001 |
| Dose | 4 | 1515.350000 | 378.837500 | 156.22 | <.0001 |
| Sample*Dose | 12 | 224.050000 | 18.670833 | 7.70 | <.0001 |

The SAS System 231
14:23 Thursday, February 27, 2014

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|-------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 20 |
| Error Mean Square | 2.425 |

| | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
| Critical Range | 1.453 | 1.525 | 1.571 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
|-----------------|---------|----|--------|
| A | 27.2000 | 10 | 3 |
| B | 23.7000 | 10 | 1 |
| B | 22.3000 | 10 | 2 |
| C | 8.7000 | 10 | 4 |

The SAS System 232
14:23 Thursday, February 27, 2014

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|-------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 20 |
| Error Mean Square | 2.425 |

| | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Critical Range | 1.624 | 1.705 | 1.756 | 1.792 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Dose |
|-----------------|---------|---|-------|
| A | 30.7500 | 8 | 10 |
| B | 23.1250 | 8 | 100 |
| C | 19.3750 | 8 | 1.000 |

| | | | |
|---|---------|---|---------|
| D | 16.2500 | 8 | 10.000 |
| E | 12.8750 | 8 | 100.000 |

The SAS System 233
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=1 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-------|--------|-----------------------------|
| Dose | 5 | 1.000 10 10.000 100 100.000 |

| | |
|-----------------------------|----|
| Number of Observations Read | 10 |
| Number of Observations Used | 10 |

The SAS System 234
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=1 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 4 | 529.6000000 | 132.4000000 | 27.02 | 0.0014 |
| Error | 5 | 24.5000000 | 4.9000000 | | |
| Corrected Total | 9 | 554.1000000 | | | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
| 0.955784 | 9.340061 | 2.213594 | 23.70000 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Dose | 4 | 529.6000000 | 132.4000000 | 27.02 | 0.0014 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Dose | 4 | 529.6000000 | 132.4000000 | 27.02 | 0.0014 |

The SAS System 235
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=1 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 5 |
| Error Mean Square | 4.9 |

| | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Critical Range | 5.690 | 5.867 | 5.942 | 5.969 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Dose |
|-----------------|--------|---|---------|
| A | 36.000 | 2 | 10 |
| B | 27.000 | 2 | 100 |
| B | | | |
| C B | 21.500 | 2 | 1.000 |
| C C | | | |
| C D | 19.000 | 2 | 10.000 |
| D | | | |
| D | 15.000 | 2 | 100.000 |

The SAS System 236
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=2 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-------|--------|-----------------------------|
| Dose | 5 | 1.000 10 10.000 100 100.000 |

Number of Observations Read 10
Number of Observations Used 10

The SAS System 237
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=2 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 4 | 369.6000000 | 92.4000000 | 71.08 | 0.0001 |
| Error | 5 | 6.5000000 | 1.3000000 | | |
| Corrected Total | 9 | 376.1000000 | | | |

R-Square Coeff Var Root MSE ACD Mean
0.982717 5.112894 1.140175 22.30000

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Dose | 4 | 369.6000000 | 92.4000000 | 71.08 | 0.0001 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Dose | 4 | 369.6000000 | 92.4000000 | 71.08 | 0.0001 |

The SAS System 238
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=2 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 5 |
| Error Mean Square | 1.3 |

| | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Critical Range | 2.931 | 3.022 | 3.061 | 3.075 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Dose |
|-----------------|--------|---|---------|
| A | 32.500 | 2 | 10 |
| B | 25.000 | 2 | 100 |
| C | 21.000 | 2 | 1.000 |
| D | 18.000 | 2 | 10.000 |
| E | 15.000 | 2 | 100.000 |

The SAS System 239
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=3 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-------|--------|-----------------------------|
| Dose | 5 | 1.000 10 10.000 100 100.000 |

| | |
|-----------------------------|----|
| Number of Observations Read | 10 |
| Number of Observations Used | 10 |

The SAS System 240
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=3 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 4 | 758.6000000 | 189.6500000 | 105.36 | <.0001 |
| Error | 5 | 9.0000000 | 1.8000000 | | |
| Corrected Total | 9 | 767.6000000 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.988275 | 4.932503 | 1.341641 | 27.20000 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Dose | 4 | 758.6000000 | 189.6500000 | 105.36 | <.0001 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Dose | 4 | 758.6000000 | 189.6500000 | 105.36 | <.0001 |

The SAS System 241

14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=3 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 5 |
| Error Mean Square | 1.8 |

| | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Critical Range | 3.449 | 3.556 | 3.602 | 3.618 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Dose |
|-----------------|--------|---|---------|
| A | 42.500 | 2 | 10 |
| B | 30.000 | 2 | 100 |
| C | 25.000 | 2 | 1.000 |
| D | 21.000 | 2 | 10.000 |
| E | 17.500 | 2 | 100.000 |

The SAS System 242
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=4 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-------|--------|-----------------------------|
| Dose | 5 | 1.000 10 10.000 100 100.000 |

| | |
|-----------------------------|----|
| Number of Observations Read | 10 |
| Number of Observations Used | 10 |

The SAS System 243
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=4 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 4 | 81.60000000 | 20.40000000 | 12.00 | 0.0089 |
| Error | 5 | 8.50000000 | 1.70000000 | | |
| Corrected Total | 9 | 90.10000000 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.905660 | 14.98667 | 1.303840 | 8.700000 |

| | | | | | |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| Dose | 4 | 81.60000000 | 20.40000000 | 12.00 | 0.0089 |

| | | | | | |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| Dose | 4 | 81.60000000 | 20.40000000 | 12.00 | 0.0089 |

The SAS System 244
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Sample=4 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 5 |
| Error Mean Square | 1.7 |

| | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Critical Range | 3.352 | 3.456 | 3.500 | 3.516 |

Means with the same letter are not significantly different.

| | | | |
|-----------------|--------|---|---------|
| Duncan Grouping | Mean | N | Dose |
| A | 12.000 | 2 | 10 |
| A | | | |
| A | 10.500 | 2 | 100 |
| A | | | |
| B | 10.000 | 2 | 1.000 |
| B | | | |
| B | 7.000 | 2 | 10.000 |
| C | | | |
| C | 4.000 | 2 | 100.000 |

The SAS System 245
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=1.000 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| | | |
|--------|--------|---------|
| Class | Levels | Values |
| Sample | 4 | 1 2 3 4 |

| | |
|-----------------------------|---|
| Number of Observations Read | 8 |
| Number of Observations Used | 8 |

The SAS System 246
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=1.000 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| | | | | | |
|--------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
| Model | 3 | 253.3750000 | 84.4583333 | 675.67 | <.0001 |

| | | | |
|-----------------|---|-------------|-----------|
| Error | 4 | 0.5000000 | 0.1250000 |
| Corrected Total | 7 | 253.8750000 | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
| 0.998031 | 1.824792 | 0.353553 | 19.37500 |

| | | | | | |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| Sample | 3 | 253.3750000 | 84.4583333 | 675.67 | <.0001 |

| | | | | | |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| Sample | 3 | 253.3750000 | 84.4583333 | 675.67 | <.0001 |

The SAS System 247
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=1.000 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|-------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 4 |
| Error Mean Square | 0.125 |

| | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
| Critical Range | 0.982 | 1.003 | 1.008 |

Means with the same letter are not significantly different.

| | | | |
|-----------------|---------|---|--------|
| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
| A | 25.0000 | 2 | 3 |
| B | 21.5000 | 2 | 1 |
| B | 21.0000 | 2 | 2 |
| C | 10.0000 | 2 | 4 |

The SAS System 248
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=10 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| | | |
|--------|--------|---------|
| Class | Levels | Values |
| Sample | 4 | 1 2 3 4 |

| | |
|-----------------------------|---|
| Number of Observations Read | 8 |
| Number of Observations Used | 8 |

The SAS System 249
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=10 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 3 | 1040.500000 | 346.833333 | 51.38 | 0.0012 |
| Error | 4 | 27.000000 | 6.750000 | | |
| Corrected Total | 7 | 1067.500000 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.974707 | 8.449028 | 2.598076 | 30.75000 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 1040.500000 | 346.833333 | 51.38 | 0.0012 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 1040.500000 | 346.833333 | 51.38 | 0.0012 |

The SAS System 250
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=10 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 4 |
| Error Mean Square | 6.75 |

| | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
| Critical Range | 7.213 | 7.372 | 7.409 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
|-----------------|--------|---|--------|
| A | 42.500 | 2 | 3 |
| A | | | |
| B | 36.000 | 2 | 1 |
| B | | | |
| B | 32.500 | 2 | 2 |
| B | | | |
| C | 12.000 | 2 | 4 |

The SAS System 251
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=10.000 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|--------|--------|---------|
| Sample | 4 | 1 2 3 4 |

Number of Observations Read 8
Number of Observations Used 8

The SAS System 252
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=10.000 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 3 | 237.5000000 | 79.1666667 | 79.17 | 0.0005 |
| Error | 4 | 4.0000000 | 1.0000000 | | |
| Corrected Total | 7 | 241.5000000 | | | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
| 0.983437 | 6.153846 | 1.000000 | 16.25000 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 237.5000000 | 79.1666667 | 79.17 | 0.0005 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 237.5000000 | 79.1666667 | 79.17 | 0.0005 |

The SAS System 253
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=10.000 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 4 |
| Error Mean Square | 1 |

| | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
| Critical Range | 2.776 | 2.837 | 2.852 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
|-----------------|--------|---|--------|
| A | 21.000 | 2 | 3 |
| A | | | |
| B A | 19.000 | 2 | 1 |
| B | | | |
| B | 18.000 | 2 | 2 |
| | | | |
| C | 7.000 | 2 | 4 |

The SAS System 254
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=100 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|--------|--------|---------|
| Sample | 4 | 1 2 3 4 |

| | |
|-----------------------------|---|
| Number of Observations Read | 8 |
| Number of Observations Used | 8 |

The SAS System 255
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=100 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 3 | 450.3750000 | 150.1250000 | 48.04 | 0.0014 |
| Error | 4 | 12.5000000 | 3.1250000 | | |
| Corrected Total | 7 | 462.8750000 | | | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
| 0.972995 | 7.644398 | 1.767767 | 23.12500 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 450.3750000 | 150.1250000 | 48.04 | 0.0014 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 450.3750000 | 150.1250000 | 48.04 | 0.0014 |

The SAS System 256
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=100 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|-------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 4 |
| Error Mean Square | 3.125 |

| | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
| Critical Range | 4.908 | 5.016 | 5.041 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
|-----------------|--------|---|--------|
| A | 30.000 | 2 | 3 |
| A | 27.000 | 2 | 1 |

| | | | |
|---|--------|---|---|
| A | | | |
| A | 25.000 | 2 | 2 |
| B | 10.500 | 2 | 4 |

The SAS System 257
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=100.000 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|--------|--------|---------|
| Sample | 4 | 1 2 3 4 |

| | |
|-----------------------------|---|
| Number of Observations Read | 8 |
| Number of Observations Used | 8 |

The SAS System 258
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=100.000 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: ACD

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 3 | 218.3750000 | 72.7916667 | 64.70 | 0.0008 |
| Error | 4 | 4.5000000 | 1.1250000 | | |
| Corrected Total | 7 | 222.8750000 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | ACD Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.979809 | 8.238137 | 1.060660 | 12.87500 |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 218.3750000 | 72.7916667 | 64.70 | 0.0008 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Sample | 3 | 218.3750000 | 72.7916667 | 64.70 | 0.0008 |

The SAS System 259
14:23 Thursday, February 27, 2014

----- Dose=100.000 -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ACD

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

| | |
|--------------------------|-------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 4 |
| Error Mean Square | 1.125 |

| | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
| Critical Range | 2.945 | 3.009 | 3.025 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Sample |
|-----------------|--------|---|--------|
| A | 17.500 | 2 | 3 |
| A | | | |
| A | 15.000 | 2 | 2 |
| A | | | |
| A | 15.000 | 2 | 1 |
| B | 4.000 | 2 | 4 |

9. ANEXOS

9.1. Certificação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEE/Unicamp)



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

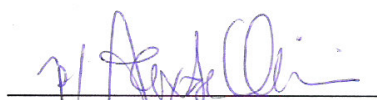
Certificamos que o Protocolo nº **2180-1**, sobre "**Estudo experimental da relação *Trypanosoma cruzi* e polpa de açaí na doença de Chagas aguda**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo / Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos / Rodrigo Labello Barbosa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **29 de julho de 2010**.

CERTIFICATE

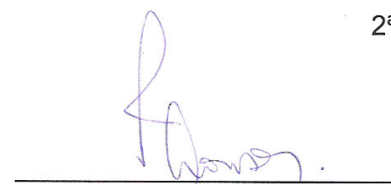
We certify that the protocol nº **2180-1**, entitled "**_____**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **July 29, 2010**.

Campinas, 12 de fevereiro de 2014.

2ª. VIA



Prof. Dr. Stephen Hyslop
Vice-Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada **“Tratamentos de aquecimento, inativação térmica e virulência do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) de vetores e reservatório em polpa *in natura* de açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) na doença de Chagas aguda de transmissão alimentar no Estado do Pará, Brasil”**:

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança, projeto N°. _____, Instituição: _____.

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto N°. 2180-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo N°. _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Aluno: Rodrigo Labello Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

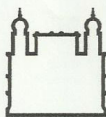
Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:


() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

9.2. Certificação da obtenção de *Trypanosoma cruzi* da Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores da Fundação Oswaldo Cruz (ColTryp - Fiocruz).



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Trypanosoma de Mamíferos Silvestres, Doméstico e Vetores - COLTRYP



ColTryp

| GUIA DE REMESSA DE MATERIAL MICROBIOLÓGICO | | | |
|--|---|---------------------------|--------------|
| Data de emissão: 22/01/2013 | | | |
| Nº DA GUIA DE REMESSA 015 | | | |
| Solicitante: Luiz Augusto Corrêa Instituição: Universidade Estadual de Campinas UF: SP | Autorizado por: <i>[assinatura]</i> Preparado por: <i>[assinatura]</i> Conferido por: <i>[assinatura]</i> | | |
| Encaminho o material abaixo relacionado: | | | |
| Descrição do Material | | | |
| Nº do acesso COLTRYP | Quantidade | Método de preservação | Observação |
| 00065 | 2 tubos com 2mL de cultura cada | Meio de cultura NNN e LIT | Cultura viva |
| 0112 | 2 tubos com 2mL de cultura cada | Meio de cultura NNN e LIT | Cultura viva |
| 0423 | 2 tubos com 2mL de cultura cada | Meio de cultura NNN e LIT | Cultura viva |
| 0462 | 2 tubos com 2mL de cultura cada | Meio de cultura NNN e LIT | Cultura viva |
| 0464 | 2 tubos com 2mL de cultura cada | Meio de cultura NNN e LIT | Cultura viva |
| Total de unidades fornecidas: | | 10 tubos – 20mL | |

| | |
|--------------------------------|----------------|
| Assinatura <i>[assinatura]</i> | Data: 22/01/13 |
|--------------------------------|----------------|

FAVOR ASSINAR E RETORNAR UMA CÓPIA

Av. Brasil, 4365 Manguinhos – Rio de Janeiro, RJ – CEP 21040-360 –Brasil. Pavilhão Rocha Lima, sala 518.
 Tel.: (55xx) (21) 2562-1416 /2562-1616
coltryp@fiocruz.br

1/1

CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados apresentados nesse estudo, concluiu-se que o *Trypanosoma cruzi* foi capaz de preservar a sua virulência em polpa de açaí mantida à 43°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) por até 20 minutos, causar doença de Chagas aguda e morte em até 24 dias após as infecções experimentais, em modelos imunodeficientes.

Além disso, *T. cruzi* obtidos dos vetores *Rhodnius pictipes* da Mata do Val-De-Cans em Belém (PA), *R. pictipes* do Rio Ajuai em Abaetetuba (PA), *Rhodnius* sp. e do reservatório *Philander opossum*, ambos da Ilha do Combu em Belém (PA), foram capazes de preservar sua virulência em contato com a polpa de açaí, causar doença de Chagas aguda e morte em até 52 dias após as infecções experimentais, em modelos imunodeficientes.

Do ponto de vista térmico, apesar de a cocção da polpa de açaí acima de 44°C ser capaz de impedir a transmissão alimentar da doença de Chagas aguda, o perigo da transmissão oral do *T. cruzi* por meio do consumo da polpa *in natura* de açaí continuará elevado quando a manutenção da temperatura adequada de aquecimento e a homogeneização constante não estiverem sob controle durante toda a produção do alimento ou principalmente quando práticas higiênico-sanitárias eficientes não estiverem presentes durante todas as etapas da cadeia produtiva do açaí.

Uma educação básica de qualidade, pautada em políticas públicas eficazes, facilitará que boas práticas de higiene sejam estabelecidas de maneira contínua durante toda a cadeia produtiva do açaí e evitará a ocorrência da doença de Chagas aguda de transmissão alimentar, inclusive em áreas distantes das regiões metropolitanas da região Norte do país.

Assim, os resultados obtidos poderão servir de diretrizes a órgãos governamentais quanto à recomendação sobre o consumo e a comercialização segura da polpa de açaí, produto de suma importância à agricultura e à economia da Bacia amazônica, especialmente do Estado do Pará, no Brasil.