

Determinação da viabilidade de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí e caldo de cana de açúcar experimentalmente contaminados

Determination of the viability of Trypanosoma cruzi in the experimentally contaminated açai pulp and sugar cane juice

Elaine Cristina de Mattos^I, Maria Aparecida Moraes Marciano^{II}, Antonio Roberto de Souza Ferreira^{II}, Vera Lucia Pereira-Chioccola^{III}

^ICentro de Laboratório Regional de Santo André. Laboratório de Microscopia Alimentar. ^{II}Núcleo de Morfologia e Microscopia. ^{III}Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde, órgão da Organização Mundial da Saúde,¹ a doença de Chagas está entre as dezessete doenças tropicais negligenciadas, atingindo cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo. Nos 21 países endêmicos da América Latina há cerca de 5 milhões e, no Brasil, 2 milhões de indivíduos infectados. Anualmente, ocorrem 50.000 novos casos e 12.000 mortes. Os países Argentina, Brasil e México concentram mais de 60% dos casos, seguidos pela Bolívia e Colômbia.¹

Historicamente, a transmissão e morbidade estavam concentradas em áreas rurais da América Latina, onde as condições precárias de moradia favoreciam a infestação pelos vetores. No entanto, nas últimas décadas, o sucesso dos programas de controle vetorial contribuiu substancialmente para a diminuição da transmissão em áreas rurais.² Contudo, nos últimos anos, a manutenção da doença tem ocorrido por surtos endêmicos cuja característica é a transmissão oral. Esta via de transmissão tornou-se um dos casos mais ativos na Venezuela, Brasil e Colômbia. Por ser um meio pouco usual, abriu uma nova área de estudo e análise.³

O documento *Classificação baseada em multicritérios para gestão de risco de parasitas de origem alimentar*, da Organização para a Alimentação e a Agricultura/Organização Mundial da Saúde⁴ incluiu *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas, como um parasita de origem alimentar. Esse documento classificou a importância de diferentes parasitas de transmissão alimentar a partir de uma perspectiva global, utilizando critérios epidemiológicos, clínicos e socioeconômicos. Utilizando esta estratégia, uma lista de 93 parasitas com potencial de transmissão por alimentos foi reduzida para uma lista de 24. Nesta classificação, *T. cruzi* ocupa o 10º lugar, indicando a gravidade da doença de Chagas transmitida por alimentos. Os nove parasitas que se classificam acima de *T. cruzi* são de transmissão hídrica, alimentar, ampla e de distribuição global.

De acordo com o Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), no período de 2007 a 2017 foram notificados 2.330 casos de doença de Chagas aguda confirmados, sendo 1.648 (71%) relacionados com a transmissão via oral. Comumente os surtos são relacionados ao consumo de vegetais e sucos de frutas contaminados. Dentre eles destacam-se o açaí, bacaba, jaci

(coquinho), caldo de cana de açúcar, vinho de palma, suco de laranja, suco de goiaba.⁵

Nos surtos relacionados a consumo de sucos de frutas sugeriu-se que os insetos infectados, que habitam a copa das árvores, poderiam ser transportados da área de colheita das frutas para as máquinas de extração de suco. Os triatomíneos infectados seriam, então, esmagados nas máquinas de extração de suco, devido a uma falta de cuidados sanitários durante a preparação, levando à contaminação e aos casos de doença de Chagas aguda.⁶ Portanto, a contaminação de alimentos à base de vegetais *in natura* por *T. cruzi* é acidental e pode ocorrer durante a colheita, armazenamento, transporte ou até mesmo na etapa de preparação.

No Brasil, os casos de doença de Chagas aguda causados por transmissão oral foram relacionados especialmente ao consumo de polpa de açaí e caldo de cana de açúcar, possivelmente contaminados com *T. cruzi*, com base no histórico das pessoas envolvidas. Ambos os alimentos são de grande produção e aceitação nacional.⁶

Na região Norte do Brasil, o açaí é comercializado diariamente *in natura*, sem qualquer tratamento térmico. Nas demais regiões, o açaí é comumente consumido na forma de polpa pasteurizada e congelada, sobretudo por esportistas. Por ser considerada uma bebida energética, na maior parte das vezes, é misturado ao xarope de guaraná e/ou frutas, cereais e carboidratos de assimilação rápida para compensar sua deficiência em açúcares simples.

O caldo de cana de açúcar *in natura* é utilizado como refresco denominado em

algumas regiões como garapa de cana de açúcar. Este alimento é geralmente consumido imediatamente gelado ou a temperatura ambiente, não podendo ser armazenado por ser susceptível a alterações enzimáticas, que proporcionam alterações sensoriais significativas e indesejáveis.

A partir de 2000, o aumento do número de casos de doença aguda de Chagas, por provável transmissão oral, gerou diversas legislações e documentos para o controle de qualidade dos produtos de frutas. Vários documentos foram redigidos e visavam minimizar os riscos da ocorrência de doenças transmitidas por alimentos. Dentre eles, destaca-se a norma RDC nº 218 de 29/07/2005, publicada pela Anvisa,⁷ que estabelece o regulamento técnico de procedimentos higiênico-sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais. Tal norma enfatiza diversas vezes a importância das boas práticas de produção como ferramenta para evitar a contaminação por insetos vetores.

Os laboratórios de saúde pública, em parceria com as vigilâncias sanitária e epidemiológica, contribuem para o esclarecimento de surtos de doenças transmitidas por alimentos pelo desenvolvimento e implantação de métodos laboratoriais de detecção de patógenos em amostras alimentícias e água. Nos últimos anos, técnicas foram padronizadas em laboratórios de referência para a pesquisa de parasitas em alimentos, como *Toxoplasma gondii* em produtos cárneos,⁸ *T. cruzi* em polpa de açaí e caldo de cana de açúcar,⁹ dentre outros.

Além da detecção de parasitas em alimentos, a determinação da viabilidade dos mesmos é de grande importância. A presença de *T. cruzi* ou suas moléculas (DNA) e a determinação de sua

viabilidade em alimentos suspeitos de contaminação permitem esclarecer surtos de doença de Chagas aguda causados pela transmissão oral. Diante destes dados, o Centro de Parasitologia e Micologia e o Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz divulgam o estudo realizado para análise de parâmetros celulares de *T. cruzi* como morfologia, mobilidade e integridade, após a sua incubação com polpa de açaí e caldo de cana de açúcar.

METODOLOGIA

Obtenção e manutenção de *T. cruzi*

Para a contaminação experimental dos alimentos foi utilizada cepa Y de *T. cruzi*, mantida por passagens seriadas em culturas de células LLC/MK₂. De cada garrafa de cultura de células foram coletadas as formas tripomastigotas no sobrenadante do meio de cultura. A seguir, os parasitas foram quantificados em câmara de Neubauer e acertadas as concentrações para as contaminações dos alimentos.⁹

Amostras de alimentos

As amostras de polpa de açaí *in natura* foram obtidas de um estabelecimento comercial da cidade de Belém (PA). Foi caracterizada como açaí fino ou popular (tipo C) por apresentar aparência pouco densa. As amostras de caldo de cana de açúcar foram obtidas em uma feira livre da cidade de Santo André (SP).

O pH dos alimentos foi medido antes do procedimento de contaminação, que foi para a polpa de açaí, 4.8 e para caldo de cana de açúcar, 5.1.

Contaminação experimental dos alimentos com os tripomastigotas

Os ensaios iniciais foram realizados para padronizar a metodologia. Primeiramente foram realizados testes para definir a quantidade de alimento a ser utilizada. A quantidade ideal para que os parasitas dissolvidos na polpa de açaí e que pudessem ser vistos no microscópio foi de 500 µL do alimento contaminado com cerca de 1×10^6 tripomastigotas.

Cerca de 1×10^6 tripomastigotas foram adicionados a duas alíquotas de 500 µL de polpa de açaí e duas de caldo de cana de açúcar. Uma das alíquotas de cada alimento foi incubada a temperatura ambiente (26°C) e a outra, a 4°C (24 horas). O controle foi constituído da mesma concentração de tripomastigotas em meio de cultura.

Análise morfológica e de mobilidade de tripomastigotas

A análise morfológica dos parasitas foi realizada pela contagem de parasitas vivos. Uma alíquota de 5 µL de amostra contaminada foi colocada em lâmina e coberta com lamínula 22 x 22 mm. As contagens dos parasitas vivos foram realizadas em 50 campos microscópicos em aumento de 400x. Previamente foram feitas as padronizações da metodologia observando os parasitas em diferentes alíquotas dos alimentos contaminados (50 g, 500 µL, 1 mL).

As análises dos tripomastigotas após incubação com as alíquotas de polpa de açaí e caldo de cana de açúcar foram realizadas por microscopia óptica nos tempos 0, 2, 4, 8 e 24 horas pós-contaminação.

Análise da integridade de tripomastigotas

A integridade dos parasitas foi analisada por microscopia após o tratamento das alíquotas dos alimentos contaminados com 10 µL de Dihidroclorato de 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) 1:100 em tampão fosfato tamponado (PBS). As amostras analisadas foram as incubadas a 26°C nos tempos 0, 2, 4, 8 e 24 horas. Foram analisadas a integridade da membrana externa, do núcleo e cinetoplasto por microscopia ótica (Olympus) e fluorescente, em campo escuro (BX60, upright compound microscope, Olympus).

RESULTADOS

Os resultados da análise morfológica e de mobilidade dos tripomastigotas nos diferentes

tempos de incubação estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Os tripomastigotas (maioria) estavam vivos (móveis e ativos) em caldo de cana de açúcar até o final do experimento (24 horas) (Tabela 1). Em contraste, como mostra a Tabela 2, os parasitas incubados por 4 horas a 26°C com polpa de açaí já apresentaram alteração no movimento, tornando-se mais lentos. Após 8 horas de incubação apresentaram total alteração na forma, tornando-se arredondados (amastigota “like”). Após 24 horas 100% dos parasitas estavam lisados, impossibilitando sua detecção.

Em ambos os alimentos, o processo de refrigeração contribuiu para que os parasitas se mantivessem viáveis (móveis e ativos) por mais tempo. Os parasitas se mantiveram vivos

Tabela 1. Análise morfológica e de mobilidade de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* incubados com caldo de cana de açúcar nos períodos indicados, IAL/ESP - 2019

Períodos de incubação (em horas)	Temperatura			
	4°C		26°C	
	Morfologia	Tripomastigotas vivos (%)	Morfologia	Tripomastigotas vivos (%)
2	Normal/ativos	97	Normal/ativos	97
4	Normal/ativos	96	Normal/lentos	95
8	Normal/ativos	95	Normal/ativos	91
24	Normal/ativos	95	Normal/ativos	58

Tabela 2. Análise morfológica e de mobilidade de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* incubados com polpa de açaí nos períodos indicados, IAL/ESP - 2019

Períodos de incubação (em horas)	Temperatura			
	4°C		26°C	
	Morfologia	Tripomastigotas vivos (%)	Morfologia	Tripomastigotas vivos (%)
2	Normal/ativos	98	Normal/ativos	78
4	Normal/ativos	93	Normal/lentos	54
8	Normal/lentos	58	Arredondados/lentos	20
24	Arredondados	0	Arredondados	0

na amostra de caldo de cana de açúcar a 4°C por um período superior a 7 dias e até 48 horas a 26°C (dados não mostrados).

Já na polpa de açaí, não houve detecção de parasitas vivos na leitura de 24 horas, nas duas temperaturas testadas, sendo encerrado o teste para esse alimento nesse período.

As análises microscópicas de fluorescência de tripomastigotas incubados com os alimentos

e corados com o DAPI podem ser vistas na Figura 1. Os tripomastigotas ficam viáveis em caldo de cana de açúcar até o final do experimento (24 horas). Contudo, após 4 horas de incubação com polpa de açaí, os parasitas apresentaram alterações na forma. Embora os núcleos e cinetoplastos se apresentassem com estrutura típica, os parasitas ficaram arredondados. Estes resultados corroboram com os obtidos na análise morfológica e de mobilidade.

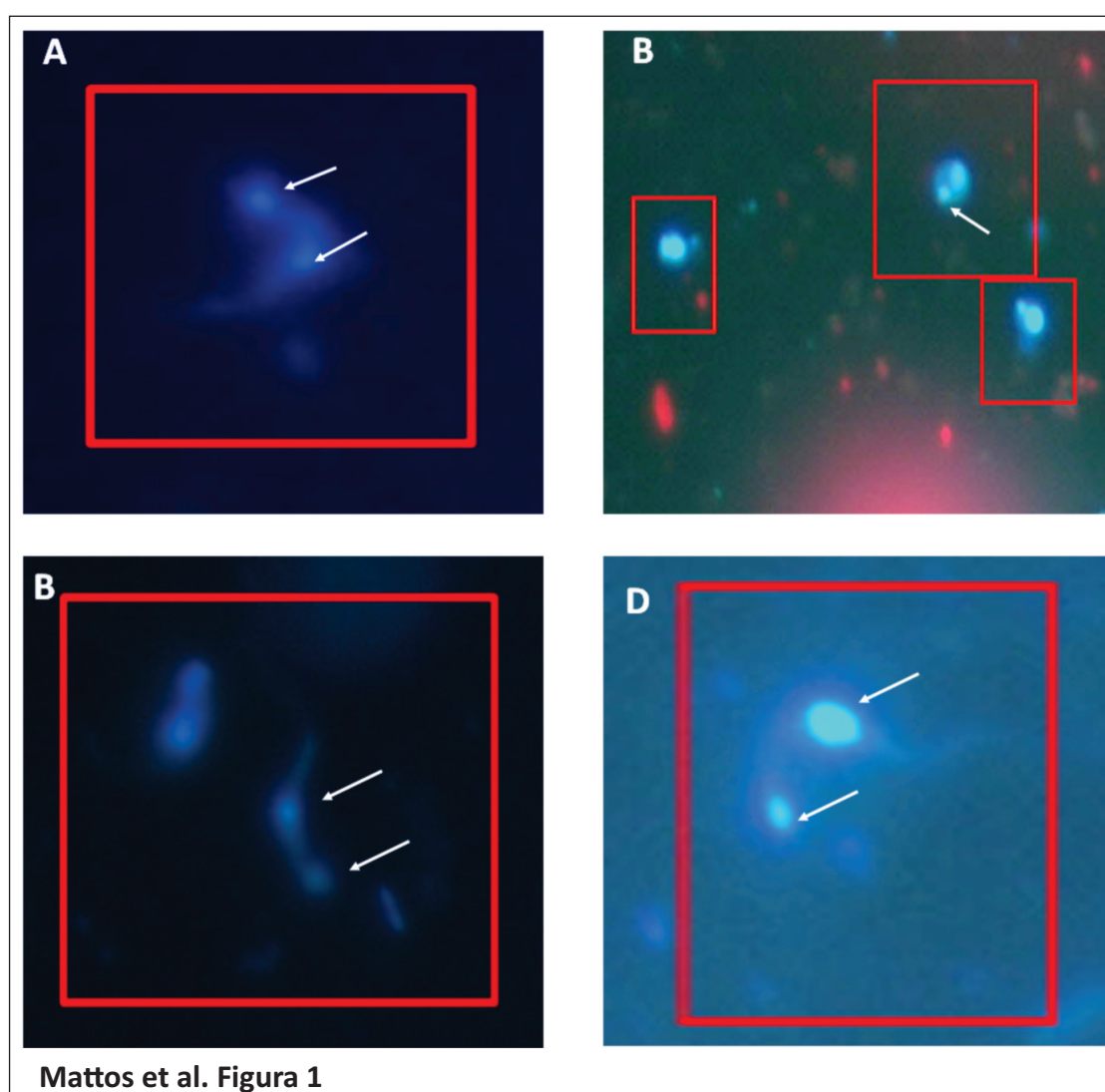


Figura 1. Foto-microscopia de *Trypanosoma cruzi* incubados com polpa de açaí e caldo de cana de açúcar em dois períodos, IAL/ESP - 2019. Painéis A e B: tripomastigotas incubados com polpa de açaí no tempo 0 e após 24 horas respectivamente. Painéis C e D: tripomastigotas incubados com caldo de cana de açúcar no tempo 0 e após 24 horas. Aumento de 400 vezes. As setas indicam o núcleo e o cinetoplasto dos tripomastigotas

DISCUSSÃO

A observação microscópica de *T. cruzi* em amostras de alimentos constitui a evidência real da contaminação. Contudo, nossos resultados mostraram que as análises microscópicas realizadas em alíquotas com volume de 50g de polpa de açaí contaminadas experimentalmente com considerável concentração de parasitas (1×10^6) foram negativas. Os tripomastigotas foram detectados somente quando o volume do alimento foi diminuído (500 μ L) e contaminado com a mesma concentração. A dificuldade de visualização microscópica dos parasitas diretamente na polpa de açaí está associada principalmente à sua coloração escura, dada a grande quantidade de matéria orgânica e antocianinas. Contudo, nossos resultados estão em conformidade com estudos prévios,¹⁰ que determinaram a presença e o potencial de penetração de *T. cruzi* nos tecidos da cana de açúcar e constatou que não foi possível essa observação por microscopia óptica. Ainda em conformidade com estes achados, Barbosa¹¹ verificou que a contaminação de 1×10^5 tripomastigotas diretamente na polpa de açaí também não permitiu a visualização durante a inspeção microscópica, com e sem coloração vital pelo Azul de *Trypan*. Esse mesmo autor testou ainda a visualização de parasitas após a centrifugação da polpa infectada e relatou que foi possível a observação dos parasitas em ensaios com volumes reduzidos da mistura, porém o rendimento dessa técnica foi muito baixo e, por isso, a metodologia em questão não foi eficiente no isolamento dos parasitas. Uma das alternativas seria a metodologia empregada por Barbosa,¹¹ que analisou o sobrenadante da polpa de açaí, pós-centrifugação e verificou a presença dos tripomastigotas com a motilidade característica e que o contato com a polpa não

interferia na viabilidade até os 60 minutos seguintes.

Em razão dos elevados índices de matéria orgânica, especialmente fibras vegetais e das características físico-químicas da polpa de açaí íntegra, Passos e colaboradores¹² desenvolveram uma metodologia para o isolamento e observação de tripomastigotas na polpa, no qual uma tamisação realizada sob pressão resultou em um eluato que permitiu a quantificação exata e visualização da motilidade dos parasitas. A mesma metodologia foi empregada por Mattos e colaboradores⁹ para purificação de DNA para posterior diagnóstico molecular.

Na análise morfológica e mobilidade dos tripomastigotas incubados com caldo de cana de açúcar, os resultados mostraram que quase todos os tripomastigotas ficam íntegros e viáveis por mais de 24 horas. Contudo, tripomastigotas incubados com a polpa de açaí sobreviveram por no máximo 8 horas, tanto a temperatura ambiente como sob refrigeração. Após este período, os parasitas se tornam arredondados até que ocorra a lise. Ressalta-se que *T. cruzi* sobrevive em pH fisiológico (7.2 a 7.3), apesar de ocorrer a morte celular em meios muito ácidos ou alcalinos. Nossos resultados mostraram que os alimentos apresentavam pH ácido (polpa de açaí, 4.8 e caldo de cana de açúcar, 5.1). A possível redução destes valores poderia dificultar a sobrevivência dos parasitas. Estes dados mostram que o caldo de cana de açúcar tem um ambiente mais favorável para o parasita do que a polpa de açaí.

As condições do açaí podem interferir na manutenção dos parasitas na polpa. Sousa e colaboradores,¹³ avaliando polpas de açaí

comercializadas em Manaus, encontraram valores de pH de 5.4, mostrando que especificidades referentes às áreas de produção, como, por exemplo, a temperatura, a umidade relativa, o tipo de solo e a própria composição química dos solos podem influenciar nas características físico-químicas dos frutos e, conseqüentemente, de suas polpas.

Outros estudos corroboram com estes dados. Barbosa¹¹ incubou o eluato de polpa de açaí após a tamisação forçada e verificou sobrevida dos parasitas até 48 horas. Neves e colaboradores¹⁴ verificaram alterações físico-químicas como redução do pH e queda dos níveis de açúcares na polpa de açaí após 5 dias de armazenagem sob refrigeração. Assim, o período de armazenagem torna o ambiente mais hostil para os parasitas.

A comercialização do açaí sofre restrições, por conta da alta perecibilidade do seu suco, que não resiste mais do que 72 horas, mesmo em ambiente refrigerado. Além do mais, como toda fruta tropical, o açaí torna-se escasso no mercado durante a entressafra. O tempo transcorrido entre a colheita e o beneficiamento do açaí, de no máximo 12 horas após colhido, é crucial para garantir a qualidade do produto final. Da mesma forma, a segurança microbiológica é condição de oferta de um alimento saudável ao consumidor. Assim, a comercialização do produto congelado torna-se necessária. O período de 24 horas para a realização dos experimentos foi escolhido uma vez que corresponde ao aspecto cultural relativo ao consumo da polpa na região Norte do Brasil, que é consumida em períodos próximos ou durante o período das refeições e em diferentes horários ao longo

do dia. Convém ressaltar, ainda, a existência de diferentes tipos de percepções ao sabor ácido, que se acentua na polpa quanto maior for a diferença de tempo entre o momento da preparação e o do consumo. Para algumas pessoas, a polpa ainda é palatável e até mais apreciada, enquanto para outras, quando se encontra no mesmo estágio, a polpa já é descartada pelo sabor azedo característico.¹¹

Os estudos de sobrevida e integridade de *T. cruzi* têm importância epidemiológica à medida que mostram que os processos de congelamento e descongelamento podem não ser suficientes para eliminar *T. cruzi* e impedir a sua transmissão para o homem. Contribuem também para a rápida detecção dos parasitas nos alimentos, em casos de esclarecimentos de surtos.¹⁵ Ressaltamos que, além da análise da integridade dos parasitas, os alimentos suspeitos devem ser analisados por métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cuja sensibilidade é superior à análise microscópica.⁹

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo permitem concluir que o tempo ideal para a pesquisa microscópica e de viabilidade de *T. cruzi* em alimentos pode variar de acordo com o produto e sua fabricação. Para polpas de açaí, o ideal é que as amostras sejam encaminhadas ao laboratório no máximo após 24 horas de sua produção, enquanto que, para o caldo de cana de açúcar, o prazo pode ser estendido até 48 horas após uma provável contaminação, tendo em vista que neste último alimento os parasitas ficam viáveis por um período um pouco maior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organização Pan-Americana da Saúde. Enfermedad de Chagas [Internet]. [acesso em 17 out 2016]. Disponível em http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es
2. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Epidemiol. serv. saúde. 2016; 25 (Espec.):7-86.
3. Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. Biomédica. 2014; 34(4):631-41.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization - FAO/WHO. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. 2014. (Microbiological Risk Assessment Series, n. 23).
5. Xavier SCC, Roque ALR, Bilac D, et al. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. PLoS negl. trop. Dis. 2014; 8(5):e2878:1-8.
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 35, de 19 de junho de 2008. Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 218, de 29 de julho de 2005. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Higiénico-Sanitários para Manipulação de Alimentos e Bebidas Preparados com Vegetais. Diário Oficial da União, 1 ago 2005; Seção 1:119.
8. Marciano MAM, Andrade Junior HF, Mireles LR. Avaliação da técnica de ELISA para pesquisa de IgG anti-Toxoplasma gondii em exsudatos de carnes de sol. Braz. j. food technol. 2018; 21, e2017009.
9. Mattos EC, Meira-Strejevitch CDS, Marciano MAM, Faccini CC, Lourenço AM, Pereira-Chioccola VL. Molecular detection of *Trypanosoma cruzi* in acai pulp and sugarcane juice. Acta trop. 2017; 176:311-5.
10. Sousa ESM. Avaliação experimental e revisão sistemática da transmissão de *Trypanosoma cruzi* pela cana de açúcar contaminada. [dissertação]. Goiás: Universidade Federal de Goiás; 2009.
11. Barbosa RL. Transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* pela polpa de açaí em camundongos. [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia; 2010.
12. Passos LAC, Guaraldo AMA, Barbosa RL, Dias VL, Pereira KS, Schmidt FL, et al. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo in vitro e in vivo. Epidemiol. serv. saúde 2012; 21(2):223-32.
13. Sousa MAC, Yuyama LKO, Aguiar JPL, Pantoja L. Suco de açaí (Euterpe oleracea Mart.): avaliação microbiológica, tratamento térmico e vida de prateleira. Acta amaz. 2006; 36(4):483-96.
14. Neves LTBC, Campos DCS, Mendes JKS, Urnhani CO, Araújo KGM. Qualidade de frutos processados artesanalmente de açaí (Euterpe oleracea MART.) e bacaba (Oenocarpus bacaba MART.). Rev. bras. frutic. 2015; 37(3):729-38.
15. Araújo PF. Estudo genético, imunológico e parasitológico das infecções pelo

Trypanosoma cruzi em famílias do
estado do Pará, Brasil. [tese]. Brasília

(DF): Faculdade de Medicina da
Universidade de Brasília; 2012.

Correspondência/Correspondence to:

Elaine Cristina de Mattos
Centro de Laboratório Regional de Santo André, Instituto Adolfo Lutz
Av. Ramiro Colleoni, 240, Vila Dora, Santo André – SP, Brasil, CEP 09040-160
E-mail: nanimattos@hotmail.com