



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**ESCOLA DE NUTRIÇÃO**



**ALINE COELHO DAS MERCÊS**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO CALDO DE CANA NA INFECÇÃO *IN VITRO***  
**PELO *Trypanosoma cruzi***

**Ouro Preto, Minas Gerais**

**Abril de 2021**

ALINE COELHO DAS MERCÊS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO CALDO DE CANA NA INFECÇÃO *IN VITRO*  
PELO *Trypanosoma Cruzi***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Melo de Abreu Vieira

Departamento de Ciências Biológicas - DECBI

**Coorientadora:** Msc. Flávia de Souza Marques

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - NUPEB

**Ouro Preto, Minas Gerais**

**Abril de 2021**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

M554a Mercês, Aline Coelho Das .

Avaliação da influência do caldo de cana na infecção in vitro pelo  
Trypanosoma cruzi. [manuscrito] / Aline Coelho Das Mercês. - 2021.  
36 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira.

Coorientadora: Ma. Flávia de Souza Marques.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.  
Escola de Nutrição. Graduação em Nutrição .

1. Chagas, Doenças de. 2. Cana-de-açúcar. 3. Infecção . I. Marques,  
Flávia de Souza. II. Vieira, Paula Melo de Abreu. III. Universidade Federal  
de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 612.39: 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6/2247



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Aline Coelho das Mêrces**

**“Avaliação da influência do caldo de cana na infecção in vitro pelo *Trypanosoma cruzi*”**

Monografia apresentada ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Nutrição.

Aprovada em 28 de abril de 2021

**Membros da banca**

Dra. Paula Melo de Abreu Vieira - Orientador(a) - DECBI/Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Joana Ferreira do Amaral - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Thaís Vieira de Carvalho - Universidade Federal de Ouro Preto  
Msc. Flávia de Souza Marques - Co-Orientador(a) - Universidade Federal de Ouro Preto

Paula Melo de Abreu Vieira, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 07/06/2021



Documento assinado eletronicamente por **Paula Melo de Abreu Vieira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 07/06/2021, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0179010** e o código CRC **C6BAF4D1**.

**Referência:** Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.005608/2021-51

SEI nº 0179010

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000  
Telefone: 3135591672 - [www.ufop.br](http://www.ufop.br)

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus que me capacitou em todas as áreas para chegar até aqui.

Aos meus pais Adair e Marilene que nunca mediram esforços para que eu seguisse meus sonhos, obrigada por todas as palavras de apoio e incentivo. Amo muito vocês.

Ao Bruno por todo amor, dedicação e apoio. Agora terminam as sessões de choro em todos os finais de período dos últimos 3 anos. Te amo até minha cabeça enroscar.

Obrigada Laura, Isabela e Monik pela amizade e companheirismo, vocês são muito especiais para mim.

Aos que dividiram casa comigo, muito obrigada por todos os momentos alegres Josy, Mila, Numpras, Nitchas, Bia e Baba.

Em especial aos amigos que a UFOP me deu Virgínia, Bica e Poca. Ao Nutrição do Milharal Lara, Úrsula, Victor, Letícia, Karina, Luiza, Jéssica e João Marcos. Conseguimos!

Obrigada aos professores mais especiais da ENUT Tia Sil, Cláudia, Júlia, Renata, Camilo e Fernanda pelo empenho em entregar aulas de qualidade inigualável.

A todos do Laboratório de Imunopatologia pelas contribuições.

Minha imensa gratidão a todos do Laboratório de Morfopatologia pelo aprendizado, conhecimento e crescimento. #TEAMmorfo

À minha mamãe científica Flávia pela paciência e amizade, obrigada por todo conhecimento passado, você é um exemplo para mim.

Gratidão à melhor orientadora, Paula pela oportunidade, por todo conhecimento passado e por me inspirar a seguir o caminho científico.

Obrigada à ENUT e UFOP pelo ensino de qualidade.

## **Epígrafe**

**“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”.**

**Los Hermanos**

## **Resumo**

A forma clássica de transmissão da doença de Chagas caracteriza-se pelo contato com as fezes e urina, contaminadas com o parasito, liberadas pelo hospedeiro invertebrado (triatomíneo). Após a implantação de medidas de controle da transmissão vetorial e transfusional houve um decréscimo substancial na incidência da doença de Chagas na América Latina. Ainda assim, mesmo com intenso controle da vigilância epidemiológica no Brasil, durante o período de 2000-2010 foram notificados mais de 1000 casos de doença de Chagas aguda. A maioria desses casos foi atribuída à ingestão de alimentos e bebidas contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas, caracterizando a transmissão oral da doença. Um dos principais alimentos envolvidos nos surtos de doença de Chagas aguda é o caldo cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Nesse sentido o objetivo desse trabalho foi avaliar a infectividade, desenvolvimento e morfologia de formas tripomastigotas provenientes de cultura acelular nos meios RPMI e caldo de cana-de-açúcar nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção das células. Para cumprir com esses objetivos foram feitas análises quantitativas do número de células infectadas e de formas amastigotas presentes nestas células. Além disso, foi feita uma análise qualitativa morfológica das formas tripomastigotas no sobrenadante dos diferentes meios. Como resultado da análise quantitativa, observou-se um maior número de células infectadas na presença do caldo de cana-de-açúcar, bem como maior número de formas amastigotas. Não foram observadas diferenças morfológicas nas formas tripomastigotas no meio RPMI, mas foi possível observar um aumento na quantidade de parasitos ao longo dos dias. Esses dados nos levam a inferir que o meio no qual o parasito é inserido está relacionado a uma maior interação com as células, resultando em maior infectividade.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas; cana-de-açúcar, infecção oral.

## Abstract

The classic form of transmission of Chagas disease is highlighted by contact with feces and urine, contaminated with the parasite, released by the invertebrate host (triatomine). After the implementation of measures to control vector and transfusion transmission, there was a substantial decrease in the incidence of Chagas disease in Latin America. Even so, despite the intense control of epidemiological surveillance in Brazil, during the period 2000-2010 more than 1000 cases of acute Chagas disease. Most of the cases were attributed to the ingestion of food and beverages contaminated with metacyclic trypomastigote forms, characterizing the oral transmission of the disease. One of the main foods involved in outbreaks of acute Chagas disease is sugarcane juice (*Saccharum officinarum*). In this sense, this work aimed to evaluate the infectivity, development, and morphology of trypomastigote forms from an acellular culture in RPMI and sugarcane juice in the 24, 48, and 72 hours after infection of the cells. To meet these objectives, quantitative analyzes of the number of infected cells and amastigote forms present in the cells were carried out. Also, a qualitative morphological analysis of the trypomastigote forms was made in the supernatant of the different media. As a result of the quantitative analysis, a greater number of infected cells was observed in the presence of sugarcane juice, as well as a greater number of amastigote forms. No morphological differences were observed in the trypomastigote forms in the RPMI medium, but it was possible to observe an increase in the number of parasites over the days. These data lead us to infer that the medium in which the parasite is inserted is related to greater interaction with the cells, available in greater infectivity.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, cana-de-açúcar, oral infection

## SUMÁRIO

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 -INTRODUÇÃO .....                                                                    | 1  |
| 2- REVISÃO DA LITERATURA .....                                                         | 3  |
| 1.1 – A doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                            | 3  |
| 1.2- Manifestações Clínicas da doença de Chagas.....                                   | 4  |
| 1.3 – A Transmissão Oral na doença de Chagas .....                                     | 6  |
| 1.4 – A cana-de-açúcar e sua participação na transmissão oral da doença de Chagas..... | 7  |
| 3 - OBJETIVO .....                                                                     | 9  |
| 3.1 - Objetivo Geral.....                                                              | 9  |
| 3.2 - Objetivos Específicos .....                                                      | 9  |
| 4- MATERIAL E MÉTODOS .....                                                            | 10 |
| 4.1 - Cultura Celular .....                                                            | 10 |
| 4.2 - Obtenção de formas tripomastigotas do <i>T. cruzi</i> .....                      | 10 |
| 4.3 – Obtenção do caldo de cana-de-açúcar .....                                        | 10 |
| 4.4 - Infectividade Celular .....                                                      | 10 |
| 4.5 - Delineamento experimental.....                                                   | 11 |
| 5 - RESULTADOS .....                                                                   | 12 |
| 5.1 - Análise morfológica de formas tripomastigotas metacíclicas no sobrenadante ..... | 12 |
| 5.2 - Avaliação taxa de infectividade e desenvolvimento .....                          | 13 |
| 6 – DISCUSSÃO .....                                                                    | 15 |
| 7- CONCLUSÃO .....                                                                     | 18 |
| 8- REFERÊNCIAS.....                                                                    | 19 |
| 9- ANEXOS.....                                                                         | 24 |
| 9.1. Anexo I - Composição centesimal do caldo de cana-de-açúcar.....                   | 24 |
| 9.2. Anexo II - Composição do meio RPMI.....                                           | 25 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1. Delineamento experimental.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>11</b> |
| <b>Figura 2. Análise do esfregaço do caldo de cana-de-açúcar ou RPMI nos tempos 24, 48 e 72 horas após infecção com formas tripomastigotas derivadas de cultura celular da cepa Y do T. cruzi. Seta vermelha: corpos apoptóticos; seta preta: formas tripomastigotas. .</b>                                                                                                                                                                                                         | <b>12</b> |
| <b>Figura 3: A - Avaliação da porcentagem de células infectas com formas tripomastigotas metacíclicas derivadas de cultura celular da cepa Y do T. cruzi 24 horas após infecção na presença do caldo de cana-de-açúcar ou RPMI. B- Quantificação do número de amastigotas em 100 células nos meios caldo de cana-de-açúcar ou RPMI 24 horas após a infecção. “*” representa diferenças significativas entre os grupos. Os valores foram expressos como média ± erro padrão.....</b> | <b>13</b> |
| <b>Figura 4. Células da linhagem L929 infectadas com formas amastigotas no caldo de cana-de-açúcar ou RPMI 24 horas após a infecção. *: formas amastigotas. Seta preta: formas tripomastigotas. ....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>14</b> |

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1. Composição centesimal do caldo de cana in natura (OLIVEIRA et al. 2007)**

**Adaptado .....24**

**Tabela 2. Composição do meio RPMI-1640. Disponível em:**

**<https://lgcbiotecnologia.com.br/produto/rpmi-1640-com-bicarbonato-de-sodio-e-l>**

**glutamina/#.YIB80uhKjIU .....26**

## LISTA DE ABREVIACES

**DC:** doença de Chagas

**TM:** *Tripomastigota metaclica*

**TS:** *Tripomastigota sanguínea*

**VO:** Via oral

**GP:** Glicoproteína

**DNDi:** *Drugs for Neglected Diseases initiative*

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute*

**°C:** Grau Celsius/centígrado

**rpm:** Rotação por minuto

**L:** Litro

**mL:** Mililitro

**cm:** Centímetro

**mM:** Milimolar

## 1 -INTRODUÇÃO

Mesmo depois de um século de sua descoberta, a doença de Chagas ainda é um problema de saúde pública sendo uma protozoonose endêmica em 21 países da América Latina (DNDi, 2017). Ainda assim, a DC é considerada uma doença negligenciada de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS).

A transmissão clássica da doença é a forma vetorial e ocorre através do contato com as fezes e/ou do triatomíneo infectado durante repasto sanguíneo. Através das estratégias implementadas e focadas na eliminação do inseto vetor (*Triatoma infestans*) para o controle da doença de Chagas no Brasil e em alguns outros países da América Latina como Uruguai e Chile, houve uma significativa redução do risco de transmissão da doença pela via vetorial (FERREIRA e SILVA, 2006; PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003).

Nesse sentido, a transmissão por via oral ganhou notoriedade pelo aumento da incidência dos casos com o consumo de alimentos e bebidas contaminados, entre eles o caldo de cana-de-açúcar (DIAS, 2006). A transmissão oral ocorre quando o triatomíneo infectado, presente nas plantas da cana-de-açúcar, defeca ou é triturado junto ao alimento que não é devidamente higienizado. A infecção da cana-de-açúcar pelo *T. cruzi* assume importância por ser uma das mais importantes culturas agrícolas das regiões tropicais, cujos produtos mais consumidos são o melaço, a rapadura e principalmente o caldo de cana-de-açúcar, sendo este comercializado em barracas nos centros urbanos (PRADO et al., 2010).

A prevenção relacionada ao caldo de cana-de-açúcar ainda não é conhecida uma vez que o alimento não é comercializado industrialmente e a comercialização dele é informal. BASTOS e colaboradores em 2010 descreveram o caso de familiares que consumiram o caldo de cana-de-açúcar e apenas os indivíduos que fizeram o consumo imediatamente após a moagem foram infectados, enquanto os familiares que consumiram após 4 horas ou ferveram o alimento não contraíram a doença.

Diante do exposto, especula-se a contínua comercialização desses alimentos potencialmente infectados, somando-se a ausência de fiscalização, acarretará a manutenção de casos da DC por via oral. Sendo assim é necessário a aplicação de estratégias de controle da infecção por via oral que incluem a Boas Práticas de Higiene, Boas Práticas de Manufatura e

também a aplicação de conceitos de Vigilância Integrada de Doenças Transmitidas por Alimentos. Além disso, a participação da comunidade e um melhor entendimento da doença também é muito importante prevenção e controle da doença (PÉREZ-GUTIÉRREZ et al., 2006).

## 2- REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 – A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

Descoberta em 1909 pelo pesquisador e médico brasileiro Carlos Chagas (1878-1934) no interior do estado de Minas Gerais em Lassance, a doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana tem como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). A transmissão para seres humanos e outros mamíferos ocorre principalmente pelo inseto vetor conhecido como triatomíneo ou barbeiro (CHAGAS, 1909; KROPF; AZEVEDO; FERREIRA, 2000).

Inicialmente a doença possuía caráter enzoótico, restrito a região amazônica, entretanto com a intensificação do ciclo da pecuária e consequente aumento do desmatamento, houve redução dos animais selvagens que antes serviam de alimento para os triatomíneos, e esses passaram a se adaptar aos ambientes de peridomicílio e interior das habitações humanas (COURA E DIAS, 2009). Dessa forma, a DC passa a adquirir caráter de antropozoonose, sendo o homem o novo hospedeiro vertebrado.

De acordo com a **Drugs for Neglected Diseases initiative** (DNDi) a DC é uma protozoonose endêmica em 21 países da América Latina e é considerada uma doença tropical negligenciada ocupando entre a 17ª posição na lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS). Atualmente há aproximadamente 6 milhões de pessoas infectadas e 70 milhões correndo risco de contrair a infecção no mundo. Além disso, nas regiões endêmicas calcula-se 14 mil mortes por ano em decorrência da doença (DNDi, 2017).

O ciclo de vida do parasito se inicia quando o hospedeiro invertebrado conhecido como triatomíneo ou barbeiro (inseto hematófago), ao realizar seu repasto sanguíneo libera concomitantemente em suas fezes e urina as formas tripomastigotas metacíclicas (TM) do *T. cruzi*, que irão penetrar o hospedeiro vertebrado através de micro lesões na pele ou mucosas adjacentes. Essas formas irão infectar inicialmente as células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM). Uma vez fagocitadas se diferenciarão em formas amastigotas, que se replicam através de fissão binária. Após sucessivos ciclos de replicações essas formas se diferenciarão novamente em tripomastigotas causando a lise dessas células. Posteriormente as tripomastigotas serão liberadas na corrente sanguínea do mamífero como formas tripomastigotas sanguíneas (TS). O ciclo é reiniciado quando um novo triatomíneo se infecta

ao ingerir as formas sanguíneas que habitarão seu trato gastrointestinal se diferenciando em epimastigotas na porção inicial e tripomastigotas metacíclicas na porção final. Nesse sentido, o *T. cruzi* possui duas formas infectantes distintas sendo elas: formas TM e TS (TYLER E ENGMAN, 2001; CDC, 2019).

A transmissão da doença ocorre por diversas formas, dentre elas a vetorial, forma clássica de transmissão e que foi descrita no parágrafo anterior (CHAGAS, 1909). Embora essa forma de transmissão esteja relacionada com a qualidade das moradias e acontece principalmente no Brasil, com os avanços tecnológicos e controle sanitário houve uma significativa redução da infecção vetorial (COSTA et al., 2013). Esse decréscimo se deu, no Brasil, nas décadas de 80 e 90, em virtude de programas e ações de controle da doença que visavam a captura do vetor nos domicílios e o controle químico (SILVA et al., 2017).

Outras formas de transmissão da DC incluem a transmissão transfusional, transmissão congênita ou vertical, transmissão acidental e a transmissão oral. A transmissão transfusional ocorre através de transfusões de sangue e doação de órgãos, ocorre principalmente onde não há a fiscalização adequada de bancos de sangue e transplante de órgãos, se tornando um problema de saúde em países não endêmicos onde há a migração de pacientes portadores da DC, como é o caso de países da Europa, Estados Unidos, Japão, Canadá e Austrália (NUNES et al., 2018; COSTA et al., 2013).

Com o controle da transmissão vetorial no Brasil, a transmissão oral passou a ser a principal forma de transmissão da doença, principalmente na região norte do país, apresentando elevadas taxas de morbidade e mortalidade durante a fase aguda da doença, quando comparadas as demais formas de transmissão (PEREZ-GUTIERREZ et al., 2006). A transmissão por via oral (VO) ocorre através da ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com fezes do triatomíneo infectado ou com o próprio vetor triturado, uma vez que o parasito se encontra em seu trato gastrointestinal. Essa via é considerada a mais provável de apresentar os sintomas da infecção, pela maior carga parasitária presente durante o processo inicial de infecção, e também está relacionada com os altos índices de mortalidade (DNDi, 2017; ORTIZ et al., 2019).

## **1.2- Manifestações Clínicas da doença de Chagas**

A DC possui diferentes manifestações clínicas que dependem de fatores do hospedeiro vertebrado como sexo, idade, interação hormonal, genética e status imune prévio, que consiste

na memória imune vinda de infecções passadas. Fatores relacionados ao *T. cruzi*, como a cepa pela qual o indivíduo foi exposto, a virulência, antigenicidade, tropismo e tamanho do inóculo (SILVA et al., 2020; CAVALCANTI et al., 2019; FIOCRUZ, 2017) também influenciam na evolução da doença. Nesse sentido, a DC pode ser dividida em duas fases clinicamente distintas: fase aguda e fase crônica (COSTA et al., 2013).

A fase aguda é caracterizada por apresentar sinais e sintomas inespecíficos tais como: febre, dor de cabeça, náuseas, diarreia e até gânglios linfáticos aumentados, hepatoesplenomegalia e manifestações neurológicas e cardíacas, que se assemelham a outras doenças, dificultando o diagnóstico da doença nessa fase da infecção. Contudo os sintomas dessa fase tendem a desaparecer em até oito semanas. Além disso, em alguns casos é observado sinais de porta de entrada do parasito, como o sinal de Romana e o chagoma de inoculação que são caracterizados por edema bipalpebral unilateral e um nódulo eritematoso, respectivamente. Esta fase é caracterizada ainda pela presença do parasito no sangue periférico e nos tecidos (DNDi, 2017; CAVALCANTE et al., 2019).

Se o paciente não for tratado e sobreviver à fase aguda da DC, a doença evolui para fase crônica, que pode ser subdividida em fase crônica indeterminada, onde 70% dos indivíduos permanecem assintomáticos, e fase crônica determinada, que acomete 30% dos indivíduos infectados. A forma indeterminada é mais comum nas áreas endêmicas sendo caracterizada apenas pela sorologia positiva para *T. cruzi*, não apresentando alterações nos exames de eletrocardiograma, além de esôfago e cólon radiologicamente normais. Além disso os pacientes portadores da forma indeterminada manifestarão algum sintoma após o período de 20 anos aproximadamente (COSTA et al., 2020; DIAS et al., 2016).

A forma determinada ou sintomática é representada pelo aparecimento dos sintomas é dividida em forma crônica cardíaca, forma crônica digestiva, ou ainda forma mista, caracterizada pelo acometimento concomitante do coração e do trato digestório (COSTA et al., 2013). A forma cardíaca é responsável pelo aumento da taxa de morbimortalidade da DC causando complicações que geram a perda de função do órgão, como miocardiopatia aguda, caracterizada pelo alto parasitismo tecidual e a visualização nítida de ninhos da forma amastigota do *T. cruzi*. As células parasitadas são destruídas e há também a presença de infiltrado inflamatório. Na miocardiopatia crônica também é observado presença de infiltrado inflamatório, além da destruição das fibras miocárdicas, áreas com presença de fibrose e baixo

parasitismo tecidual. A insuficiência cardíaca congestiva é então a consequência do prognóstico da forma cardíaca da DC (FIOCRUZ, 2017).

Já a forma crônica digestiva é definida pelo acometimento dos órgãos do trato gastrointestinal onde o *T. cruzi* mais comumente acomete o esôfago e cólon, causando o megaesôfago e o megacólon, respectivamente. Os sinais referentes aos pacientes portadores da forma digestiva, tanto no esôfago quanto no cólon, são caracterizados pela obstrução dos órgãos, há um aumento do lúmen dos órgãos e também hipertrofia da camada muscular, além disso é observado um acentuado infiltrado inflamatório, que aliado ao processo fibroso leva à diminuição ou ausência dos movimentos peristálticos e consequentemente sua obstrução (FIOCRUZ, 2017). Nesse sentido em 92% dos casos há a necessidade cirúrgica para a tentativa de reversão dos sinais (DIAS et al., 2016).

### **1.3 – A Transmissão Oral na doença de Chagas**

Com o controle da transmissão vetorial no Brasil, a transmissão oral se tornou a principal fonte de transmissão da doença. Dentre os casos confirmados da DC no país no período entre 2000 até 2009, 76% deles foram atribuídos a infecção por via oral (GONÇALVES, 2017). De acordo com FERREIRA e colaboradores (2014), a infecção por via oral é mais notável que as outras formas de transmissão por ter uma frequência de casos maior e possuir difícil controle infectivo pela falta de métodos preventivos.

Além disso, a infecção por via oral é mais grave e tem taxas de mortalidade mais elevada, cerca de 8-35%, superando a mortalidade observada pela via vetorial que tem sido estimada em menos de 5-10. Dentre as complicações observa-se que na infecção por via oral os sintomas são mais agudos e apresentados a curto prazo, ou seja, logo após a infecção. Os sintomas mais frequentes são febre, dores no corpo, arritmias cardíacas e hemorragias que se tornam graves podendo levar à óbito (SIMÕES et al. 2018; DE LIMA, 2021).

Os principais alimentos relacionados com a infecção oral no Brasil são o açaí (*Euterpe oleracea*) e o caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e a maioria dos casos da transmissão oral estão concentrados no Norte e Nordeste do Brasil. A infecção por via oral

também já foi descrita em outros países, como Argentina, Colômbia e Bolívia (FERREIRA et al., 2014).

De acordo com YOSHIDA em 2006, na infecção por via oral as formas TM do *T. cruzi* após serem ingeridas pelo hospedeiro vertebrado se apresentam às células hospedeiras da mucosa gástrica a fim de adentrá-las. Esse processo é realizado em várias etapas e envolve as moléculas de superfície do parasito.

A superfície da forma TM é protegida por glicoproteínas (gp) tipo mucinas gp35/50 que são resistentes à ação de proteases impedindo que o parasito seja destruído pelo suco gástrico. A gp82 ou a gp30 auxiliam o parasito na travessia do mucosa e consequente internalização das células epiteliais subjacentes pelo fato de terem uma interação positiva. Essa interação induz então a sinalização de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) da célula hospedeira fazendo com que se abra o receptor para a invasão do parasito. Formas TM deficientes de gp82, interagem fracamente com a célula hospedeira, o que dificulta o processo de internalização do *T. cruzi* (YOSHIDA ,2006).

Após essas etapas, quando a célula é invadida o ciclo da doença é estabelecido e essas formas se diferenciarão para iniciar o processo de replicação já mencionado anteriormente.

#### **1.4 – A cana-de-açúcar e sua participação na transmissão oral da doença de Chagas**

A cana-de-açúcar corresponde a uma das principais atividades econômicas do Brasil, sendo o país o maior exportador da planta no mundo (GILIO. 2015) Além da produção de açúcar e etanol, é muito comum o seu consumo na forma do caldo de cana-de-açúcar.

O caldo de cana é uma bebida energética não alcoólica muito apreciada no Brasil por seu baixo custo e fácil comercialização. No que diz respeito a sua composição centesimal, acordo com em 100mL de caldo da cana há 81,14% de umidade, 18,20% de carboidratos e 17,68% de açúcares, além disso seu pH é 5,28 sendo considerado ácido (OLIVEIRA et al., 2007). Os micronutrientes que compõem a bebida são predominantemente ferro (14,33 mg/100mL) e vitamina C (2,98mg/100mL), além de quantidades menores de fósforo, potássio, cálcio e magnésio (Anexo II).

O preparo do caldo consiste na moagem da planta não sendo necessário tirar sua casca, o que facilita a contaminação por microrganismos quando não higienizada corretamente, além disso, o bagaço retirado após a moagem é usualmente descartado temporariamente próximo ao

local da moagem atraindo insetos e animais e principalmente o triatomíneo vetor da DC (PRADO et al. 2010).

Relatos sobre a viabilidade da transmissão da DC através do consumo do caldo da cana de açúcar são reportados desde 1990, porém apenas em 2005 houve a maior visibilidade para a transmissão, quando houve em Santa Catarina a notificação de vários casos da doença e mortes em virtude do consumo da bebida contaminada com o *T. cruzi*. Houveram pelo menos 6 mortes em decorrência da DC. Um sintoma comum à maioria desses casos é a miocardite intensa que consiste na migração dos parasitos intracelulares para o interior do miocárdio gerando uma inflamação intensa e difusa (PEREIRA, 2010). Esse episódio resultou na criação do Regulamento Técnico de Procedimentos Higiênico-Sanitários para Manipulação de Alimentos e Bebidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (PRADO et al. 2010).

Contudo, como o comércio do caldo de cana se dá principalmente por vendedores ambulantes que não possuem aparato suficiente para realizar a higiene das canas corretamente, casos de doença de Chagas aguda continuam a ocorrer por todo o país (PRADO et al. 2010).

De acordo com FIGUEIRA et al. (2019) o principal determinante para a infecção pela via oral é a higienização correta dos alimentos, sendo assim é possível garantir a desinfecção do alimento contra microrganismos e a retirada do triatomíneo através do uso de sanitizantes.

### **3 - OBJETIVO**

#### **3.1 - Objetivo Geral**

Avaliar a influência do caldo de cana-de-açúcar na infecção *in vitro* de células L929 pelo *Trypanosoma cruzi*.

#### **3.2 - Objetivos Específicos**

- Identificar alterações na morfologia de formas tripomastigotas metacíclicas derivadas de cultura celular após serem expostas diretamente ao caldo de cana-de-açúcar por 24, 48 e 72 horas;
- Avaliar a taxa de infectividade e desenvolvimento *in vitro* do *T. cruzi* em células da linhagem L929 após incubação por 24, 48 e 72 horas com o caldo de cana-de-açúcar.

## **4- MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 - Cultura Celular**

Para a execução deste estudo foi utilizada a linhagem celular L929 (ATCC ® CCL-1™) oriunda de fibroblastos murinos (*Mus musculus*). Essa linhagem foi cultivada em garrafas apropriadas de 175 cm<sup>2</sup> em meio *Roswell Park Memorial Institute* RPMI (R-6504 - Sigma-Aldrich Products - Life Science) suplementado com 10% de soro fetal bovino. As culturas foram incubadas em estufa, contendo 5% de CO<sub>2</sub> e mantidas à temperatura de 37°C.

### **4.2 - Obtenção de formas tripomastigotas do *T. cruzi***

Para que ocorresse a infecção, camundongos *Swiss* foram infectados com a cepa Y do *T. cruzi* (Protocolo CEUA nº 2016/61) e, posteriormente, foi feita a coleta de sangue dos animais no dia do pico de parasitemia (8º dia de infecção) e foi colocado em garrafas de cultura de células L929. Após 48 horas, as células L929 foram lavadas extensivamente com solução salina de fosfato (PBS – 1X = 2,7 mM de KCl, 1,5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) para a retirada do excesso de sangue e adicionado um novo meio de cultura. As culturas foram então mantidas a 37 °C para obtenção das formas tripomastigotas. Foi retirado o sobrenadante contendo as formas tripomastigotas metacíclicas de cultura, centrifugado e ressuspensionado no meio RPMI ou caldo de cana-de-açúcar.

### **4.3 – Obtenção do caldo de cana-de-açúcar**

O caldo de cana utilizado foi obtido em um trailer já moído e armazenado em uma garrafa limpa, logo após sua obtenção foi levado ao laboratório para o experimento.

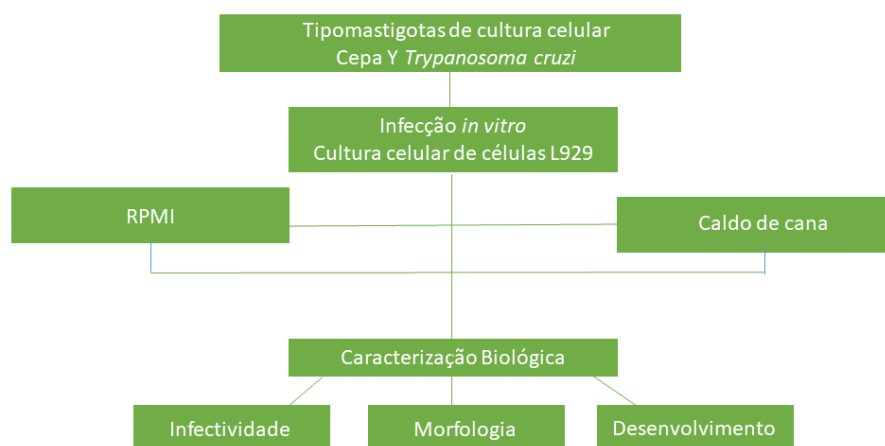
### **4.4 - Infectividade Celular**

Foram adicionadas  $1,0 \times 10^5$  células L929 sobre lamínulas de vidro circulares em placas contendo 24 poços com RPMI. Depois de 24 horas foi observado em microscopia ótica se as células atingiram 80% de confluência, e então foram infectadas com as formas tripomastigotas derivadas de cultura do *T. cruzi* na proporção de 5:1 (parasitos: célula) nos diferentes meios, RPMI e caldo de cana-de-açúcar. A quantidade de meio infectado foi determinada através da contagem em uma câmara de Neubauer, após isso foi feita a infecção e os poços foram

completos com o mesmo meio para somar 1mL em cada poço. Infectou-se as células do meio RPMI e o caldo de cana, após isso a infecção celular foi avaliada em diferentes intervalos de infecção (24, 48 horas e 72 horas). Após os tempos de incubação, foram retirados os sobrenadantes dos poços e foi feito o esfregaço, após isso secaram em temperatura ambiente e foram corados com panótico rápido. As lamínulas foram retiradas dos poços ao seu tempo lavadas com PBS 1 X e colocadas para secar a temperatura ambiente. Logo em seguida foram fixadas em metanol e então, coradas com panótico rápido. Após a coloração, as lamínulas foram montadas sobre as lâminas com Entellan®.

As taxas de infecção e desenvolvimento ou multiplicação foram analisadas por microscopia óptica no aumento de 1000x. A taxa de infecção foi obtida como número de células infectadas em relação a 100 células contadas, enquanto a taxa de desenvolvimento foi avaliada através número de parasitos em relação ao número de células infectadas. Nessas lâminas também foram avaliadas a morfologia das formas tripomastigotas.

#### 4.5 - Delineamento experimental

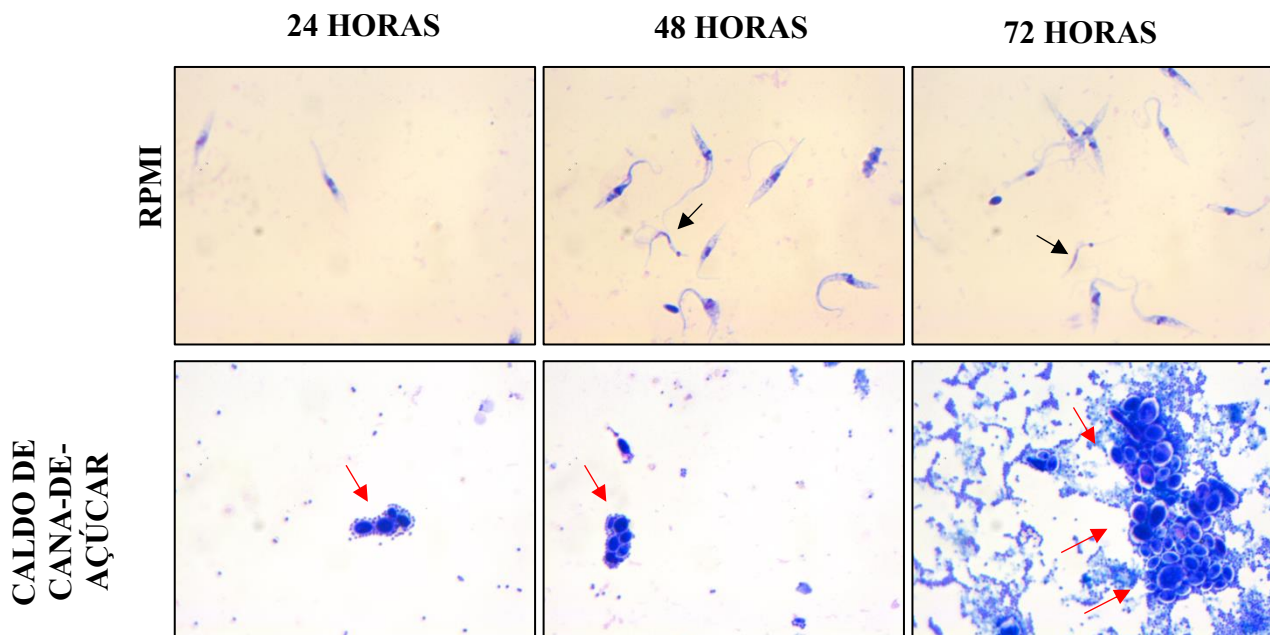


**Figura 1.** Delineamento experimental

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - Análise morfológica de formas tripomastigotas metacíclicas no sobrenadante

No esfregaço do caldo de cana-de-açúcar não foi possível observar formas tripomastigotas metacíclicas em nenhum dos tempos de análise. No entanto, observou-se um aumento qualitativo dos corpos apoptóticos celulares. Já no meio RPMI, não foram observadas alterações morfológicas das formas tripomastigotas metacíclicas nos tempos 24, 48 e 72 horas após a infecção. Entretanto, foi observado um aumento qualitativo na quantidade de formas tripomastigotas metacíclicas, bem como o aparecimento de formas mais delgadas nas horas 48 e 72 após a infecção (Figura 2).

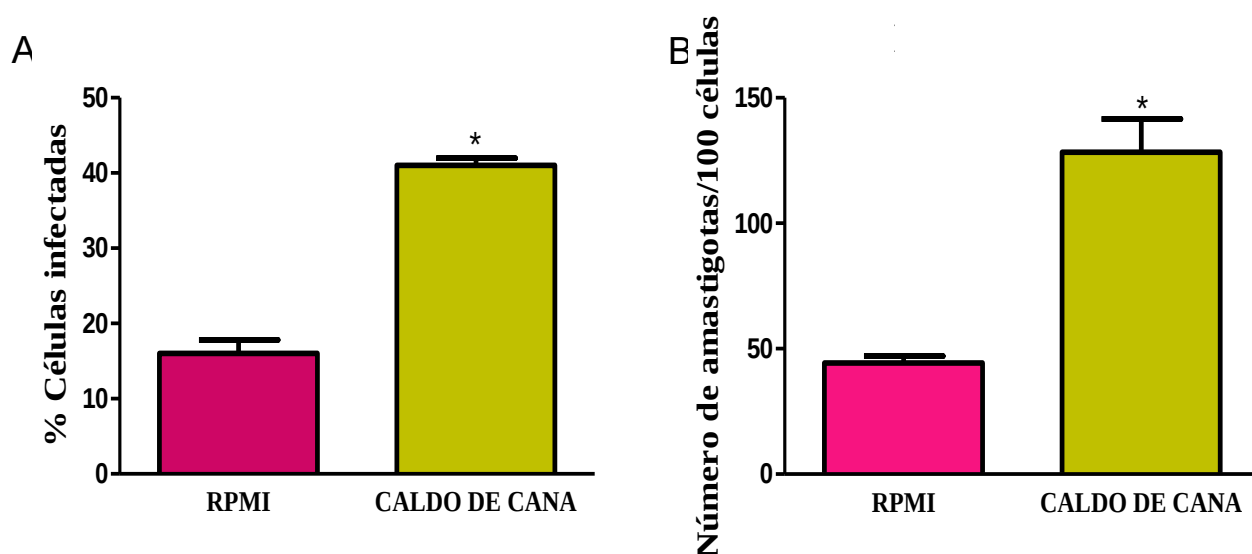


**Figura 2.** Análise do esfregaço do caldo de cana-de-açúcar ou RPMI nos tempos 24, 48 e 72 horas após infecção com formas tripomastigotas derivadas de cultura celular da cepa Y do *T. cruzi*. Seta vermelha: corpos apoptóticos; seta preta: formas tripomastigotas.

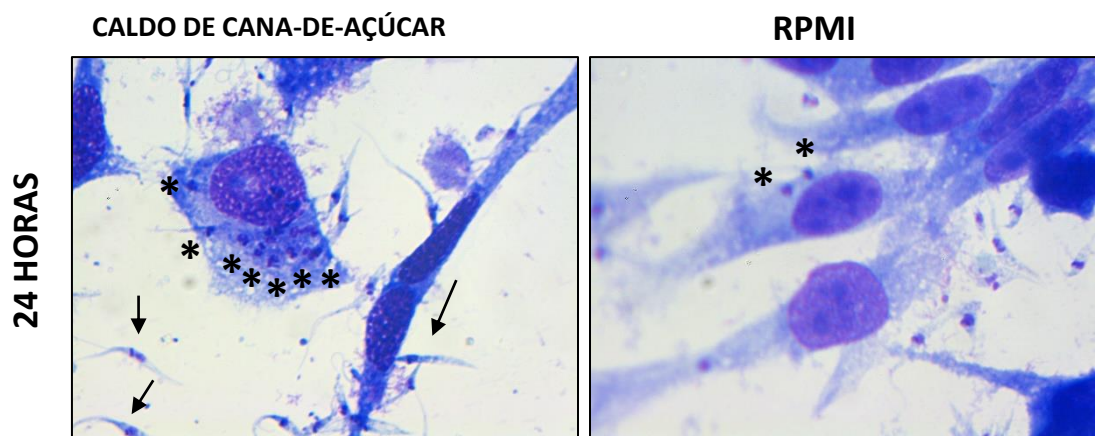
## 5.2 - Avaliação taxa de infectividade e desenvolvimento

Com a avaliação da taxa de infectividade, observou-se que a taxa de infectividade foi maior, após 24h de cultura, nas células mantidas em meio caldo de cana-de-açúcar quando comparada à de células mantidas no meio RPMI. (Figura 3A). Não foram observadas células infectadas no grupo caldo de cana-de-açúcar nos tempos 48 e 72 horas após a infecção.

Analisou-se então o desenvolvimento de formas amastigotas no interior celular. Observou-se um maior número de formas intracelulares do *T. cruzi* nas células infectadas na presença do caldo de cana-de-açúcar quando comparadas às células infectadas no meio RPMI (Figura 2B). Assim como não foram observadas células infectadas no grupo caldo de cana-de-açúcar após 48h e 72h de infecção. Também não foram observadas formas amastigotas nesses tempos de infecção. Na análise de desenvolvimentos de amastigotas também obteve-se fotomicrografias representativas para o tempo de 24h para ambos os meios (Figura 4).



**Figura 3:** **A** - Avaliação da porcentagem de células infectas com formas tripomastigotas metacíclicas derivadas de cultura celular da cepa Y do *T. cruzi* 24 horas após infecção na presença do caldo de cana-de-açúcar ou RPMI. **B**- Quantificação do número de amastigotas em 100 células nos meios caldo de cana-de-açúcar ou RPMI 24 horas após a infecção. “\*” representa diferenças significativas entre os grupos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.



**Figura 4.** Células da linhagem L929 infectadas com formas amastigotas no caldo de cana-de-açúcar ou RPMI 24 horas após a infecção. \*: formas amastigotas. Seta preta: formas tripomastigotas.

## 6 – DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo evidenciar a importância da infecção por transmissão oral da DC, que após o controle da transmissão vetorial, se tornou a principal forma de transmissão da doença. Além de ser a principal forma de transmissão da doença no país, a infecção por via oral é mais grave, apresentando altas taxas de mortalidade (SVS, 2007). A infecção oral ocorre devido à ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, dentre eles está o caldo da cana-de-açúcar.

PINTO e colaboradores (1990) observaram a viabilidade do parasito no caldo de cana garantindo assim a veiculação do agente etiológico da doença de Chagas através da via oral. Além disso, um estudo conduzido por CARDOSO (2006), foram utilizados triatomíneos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* para contaminar pedaços de cana de açúcar. Após a moagem da cana nos tempos de 0, 1, 4, 6, 12, e 24 horas foi analisada a sobrevivência do *Trypanosoma cruzi* no suco. Os resultados mostraram que o *T. cruzi* foi capaz de sobreviver até 12 horas após a contaminação da cana.

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, foi constatada a interiorização de formas tripomastigotas nas células em meio ao caldo de cana quando comparado ao RPMI. O aumento qualitativo de corpos apoptóticos celulares encontrados em nossos ensaios sugere aumento da morte celular devido à infecção. O papel da apoptose celular na infecção pelo *T. cruzi* já foi descrito por ANDRADE (2011), e tem como objetivo controlar a parasitemia e o parasitismo na fase aguda. Como o aumento dos corpos apoptóticos foi observado apenas nas células infectadas no meio caldo de cana-de-açúcar, especula-se que o meio no qual o parasito está inserido apresenta propriedades que levaram à uma maior taxa de infecção celular, culminado em maior mortalidade das mesmas como uma tentativa de eliminar o parasito.

Foi descrito por LESSA (2019) que a proteção da superfície celular do *T. cruzi* é feita por glicoconjugados. Esses glicoconjugados são biosintetizados a partir de nucleotídeos-açúcares. Esses nucleotídeos são estruturados por um açúcar, um nucleotídeo e um grupo fosfato. Para a síntese de nucleotídeos-açúcares uma via utilizada pelo parasito é a captação externa de carboidrato para que ele seja fosforilado por uma quinase e ligado ao nucleotídeo. Sendo o carboidrato o segundo componente em maior quantidade no caldo da cana de açúcar, sugere-se que o parasito utilize esse carboidrato para a produção de seus glicoconjugados e consequentemente, sua proteção.

Além disso, ainda sobre os nucleotídeos-açúcares, apenas o *T. cruzi* produz o nucleotídeo-açúcar UDP Xilose para a síntese de glicoconjugados, como descrito por (YANG&PELED, 2010). A captação da xilose para a biossíntese desse nucleotídeo-açúcar também possui uma via externa, sendo necessários níveis adequados de xilose para o crescimento ótimo do parasito em cultura, uma vez que a xilose é obtida pela hidrólise dos xilanos que compõe a hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar (ROCHA et al. 2011), o que sugere que assim como a utilização de carboidratos, o *T. cruzi* também utiliza a xilose presente no caldo da cana.

Em relação ao desenvolvimento intracelular parasitário, foi observado maior número de amastigotas intracelulares na infecção com o caldo de cana-de-açúcar quando comparado ao RPMI. Como citado por ARANTES (2006), trabalhos relacionados aos receptores presentes no *T. cruzi*, encontraram receptores para a enzima transferrina em formas amastigotas. Isso sugere que essas formas se nutrem do ferro captado pela célula a partir do meio do caldo de cana, que tem o ferro como um dos principais nutrientes, com 14,33mg/100mL. Paralelo a isso o meio RPMI é composto de aminoácidos, sais inorgânicos, glicose e vitaminas, não contendo ferro (R-6504 - Sigma-Aldrich Products - Life Science) (Anexo II). A ausência de ferro no meio RPMI poderia explicar o menor desenvolvimento de amastigotas, quando comparado ao meio do caldo de cana.

Com o controle da doença de Chagas vetorial nos países endêmicos, a doença oral aguda causada pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com o *Trypanosoma cruzi* ganha importância. O preparo de sucos de frutas *in natura* muitas vezes não segue as boas práticas de higienização e manipulação, levando à contaminação desses sucos pelo *T. cruzi*, seja através da trituração dos insetos triatomíneos inteiros, através das fezes desses triatomíneos (contendo formas tripomastigotas metacíclicas altamente infectantes), ou ainda através do contato com secreções das glândulas anais de marsupiais. A contaminação do alimento pode ocorrer nas diversas etapas do processo, desde a colheita das frutas e caule, transporte, armazenamento, até a produção do suco sob condições inadequadas.

Uma característica comum à doença aguda oral é a gravidade da doença, onde a maioria dos pacientes apresenta intensa miocardite e uma alta taxa de mortalidade nas primeiras duas semanas após a infecção. A mortalidade foi estimada em cerca de 8-35%, superando a mortalidade observada pela via vetorial que tem sido estimada em menos de 5-10% (CARVALHO, 2019). Dessa forma, esforços devem ser concentrados na prevenção da contaminação dos alimentos de alto risco (caldo de cana-de-açúcar, açaí, bacaba) através da

implementação de procedimentos operacionais padronizados, manejo integrado de pragas, boas práticas de fabricação e, eventualmente, análise de perigos e controle de pontos críticos. Além disso, é necessário desenvolver uma metodologia detecção do *T. cruzi* diretamente nos alimentos e a implementação de tecnologia para garantir a segurança de alimentos contaminados por protozoários (por exemplo, pasteurização de polpas de frutas e sucos).

## 7- CONCLUSÃO

O meio no qual o *Trypanosoma cruzi* é inserido na célula induz um perfil distinto de infectividade e desenvolvimento, havendo um maior número de células infectadas, bem como maior número de formas amastigotas nas células infectadas com o parasito no caldo de cana-de-açúcar se comparadas às células infectadas com o parasito no meio RPMI.

## 8- REFERÊNCIAS

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

KROPF, Simone Petraglia; AZEVEDO, Nara; FERREIRA, Luiz Otávio. Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. **Ciência & saúde coletiva**, v. 5, p. 347-365, 2000.

DRUGS for Neglected Diseases initiative: DOENÇA DE CHAGAS. [S. l.], 5 fev. 2020. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>.

CDC - DPDx - American Trypanosomiasis. [S. l.], 1 maio 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>.

COSTA, Milce *et al.* CHAGAS DISEASE: A LITERATURE REVIEW. Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres, [s. l.], v. 2, ed. 1, 18 out. 2013.

NUNES, Maria Carmo Pereira *et al.* Chagas cardiomyopathy: an update of current clinical knowledge and management: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 138, n. 12, p. e169-e209, 2018.

GÜRTLER, R. E.; SEGURA, E. L.; COHEN, J. E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerging infectious diseases*, v. 9, n. 1, p. 29, 2003.

CARLIER, Yves; TORRICO, Faustino. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 767-771, 2003.

CAVALCANTI, Luciano Pamplona de Góes *et al.* Microepidemia de doença de Chagas aguda por transmissão oral no Ceará. **Cad. saúde colet., (Rio J.)**, 2009.

FERREIRA, Renata Trotta Barroso *et al.* Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. 2014.

SILVA, Paula Braga Ferreira *et al.* Indicadores entomológicos relacionados ao Programa de Controle dos Triatomíneos Transmissores da Doença de Chagas em uma região endêmica do Brasil. 2017.

PÉREZ-GUTIÉRREZ, Enrique; AGRELO, Roberto Salvatella; FIGUEROA, Ruben. 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, n. 5, p. 512-514, 2006.

GOMES, Giovanna et al. Perfil epidemiológico da Doença de Chagas aguda no Pará entre 2010 e 2017. **Pará Research Medical Journal**, v. 4, p. 0-0, 2020.

CAVALCANTI, Marília Abrantes Fernandes et al. Manifestações e estratégias de enfrentamento da Doença de Chagas que interferem na qualidade de vida do indivíduo: uma revisão sistemática. **Ciência & saúde coletiva**, v. 24, p. 1405-1416, 2019.

CAVALCANTE, Andressa Silva et al. Doença de Chagas e suas complicações: uma revisão de literatura. **Mostra Interdisciplinar do curso de Enfermagem**, 2019.

MENDES, Larissa Lima; SILVA, Mariana Santos da; MARTINS, Ana Luisa Oenning. Tratamento da fase crônica da Doença de Chagas: revisão sistemática. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 49, n. 4, p. 333-8, 2017.

ORTIZ, Jessica Vanina et al. Avaliação cardíaca na fase aguda da Doença de Chagas com evolução pós tratamento em pacientes atendidos no Estado do Amazonas-Brasil. **Arq Bras Cardiol**, v. 112, n. 3, p. 240-246, 2019.

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

LANNES-VIEIRA, Joseli. Propostas para explicar a fisiopatogenia da doença de Chagas. **FIOCRUZ**, [S. l.], 2 jul. 2017.

YOSHIDA, Nobuko. Bases moleculares da invasão celular de mamíferos por *Trypanosoma cruzi*. **A. Acad. Bras. Ciênc.** Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 87-111, março de 2006.

SOUSA, Cleidianne Novais et al. DINÂMICA URBANA E PRODUÇÃO AGROEXTRATIVISTA: uma análise sobre informalidade do trabalho e da economia do açaí na RMB. **Cadernos CEPEC**, v. 3, n. 7-12, 2019.

GONÇALVES, Edivaldo Sapia. **Mosaico de Vulnerabilidade: açaí artesanal e risco da transmissão oral da doença de Chagas**. São Paulo, SP, 2017.

NASCIMENTO, Rhutynéia Joana Silva do et al. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 498-502, 2008.

LIGIO, Leandro. **Análise dos Impactos Socioeconômicos da expansão do setor sucroenergético**. Piracicaba, 2015.

FERREIRA, Israel de Lucena Martins; SILVA, Tiago Pessoa Tabosa. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.

PINTO, Ana Yecê das Neves et al. 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, n. 6, p. 602-614, 2008.

RASSI, Anis; FERREIRA, Humberto de Oliveira. Tentativa de tratamento específico da fase aguda da doença de Chagas com nitrofuranos em esquema de duração prolongada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 5, n. 5, p. 235-262, 1971.

PORTELA-LINDOSO, Ana Angélica Bulcão; SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 107-115, 2003.

RIBEIRO, Antonio Luiz Pinho; ROCHA, Manoel Otávio da Costa. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 301-314, 1998.

PEREIRA, José Borges; WILCOX, Henry Percy Faraco; COURA, José Rodrigues. Evolução da cardiopatia chagásica crônica I-Influência da parasitemia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 2, p. 101-108, 1992.

SANCHEZ-LERMEN, Rafaela de Liz P. et al. Sintomas do trato digestivo superior e distúrbios motores do esôfago em pacientes portadores da forma indeterminada da doença de Chagas crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 197-203, 2007.

MARIN-NETO, José Antonio; SIMÕES, Marcus Vinícius; SARABANDA, Alvaro V. Lima. Cardiopatia chagásica. **Arq Bras Cardiol**, v. 72, n. 3, p. 247-63, 1999.

REZENDE, J. M. Diagnóstico das manifestações digestivas da Doença de Chagas. **Enfermedades emergentes**, v. 9, p. 37-39, 2006.

MAGALHÃES-SANTOS, Ísis Fernandes. Transmissão oral da Doença de Chagas: breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 2, p. 226-235, 2014.

DIAS, João Carlos Pinto et al. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. 2006..

MURRIETA, Rui Sérgio Sereni et al. Consumo alimentar e ecologia de populações ribeirinhas em dois ecossistemas amazônicos: um estudo comparativo. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 123s-133s, 2008.

PRADO, Sonia de Paula Toledo et al. Avaliação do perfil microbiológico e microscópico do caldo de cana in natura comercializado por ambulantes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n. 1, p. 55-61, 2010.

PÉREZ-GUTIÉRREZ, Enrique; AGRELO, Roberto Salvatella; FIGUEROA, Ruben. 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, n. 5, p. 512-514, 2006.

PEREIRA, Letícia et al. Construção social do surto da doença de Chagas em Santa Catarina, 2005. 2010.

BASTOS , Claudilson JC *et al.* Resultados Clínicos de Treze Pacientes com Doença de Chagas Aguda Adquiridos por Transmissão Oral em Dois Surtos Urbanos no Nordeste do Brasil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], 15 jun. 2010.

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

PINTO, Pedro Luiz Silva et al. Observations on the viability of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane juice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 5, p. 325-327, 1990.

ANDRADE, Sonia G. Apoptose e sua importância no curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 32, n. 2, p. 163-174, 2003.

PUCCI, Maíra Mazzoni et al. **Análise proteômica da forma amastigota de populações de *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol**. 2009. Tese de Doutorado.

COURA, José Rodrigues; DIAS, João Carlos Pinto. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

OLIVEIRA, Aline Cristine Garcia de et al. Efeitos do processamento térmico e da radiação gama na conservação de caldo de cana puro e adicionado de suco de frutas. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 863-873, 2007.

SIMÕES, Marcus Vinicius et al. Cardiomiopatia da doença de Chagas. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 2, p. 173-189, 2018..

DE LIMA, José Tayllan Fonteles. DOENÇA DE CHAGAS E A INFECÇÃO POR VIA ORAL. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 1, p. 83-83, 2021.

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

LESSA, Vinícius Lopes et al. **Caracterização funcional dos genes envolvidos na síntese de UDP-Xilose a partir de UDP-Glicose em *Trypanosoma cruzi***. 2019. Tese de Doutorado.

YANG, Ting; BAR-PELED, Maor. Identification of a novel UDP-sugar pyrophosphorylase with a broad substrate specificity in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 429, n. 3, p. 533-543, 2010.

DE MORAES ROCHA, George Jackson et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 663-670, 2011.

CARVALHO, Livia Mendes. Perfil leucocitário sistêmico e lesões no trato gastrointestinal de camundongos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi* por via oral. 2019.

## 9- ANEXOS

### 9.1. Anexo I - Composição centesimal do caldo de cana-de-açúcar

| <b>Componentes em 100mL</b>   | <b>Quantidade</b> |
|-------------------------------|-------------------|
| <b>Umidade (%)</b>            | 81,14             |
| <b>Valor calórico (Kcal)</b>  | 73,80             |
| <b>Carboidratos (%)</b>       | 18,20             |
| <b>Açúcares totais (%)</b>    | 17,68             |
| <b>Açúcares redutores (%)</b> | 0,49              |
| <b>Extrato etéreo (%)</b>     | 0,014             |
| <b>Proteínas (%)</b>          | 0,21              |
| <b>Ácido ascórbico (mg)</b>   | 2,98              |
| <b>Cinza (%)</b>              | 0,41              |
| <b>Fósforo (g/kg)</b>         | 0,10              |
| <b>Potássio (g/kg)</b>        | 0,77              |
| <b>Cálcio (g/kg)</b>          | 0,31              |
| <b>Magnésio (g/kg)</b>        | 0,10              |
| <b>Enxofre (g/kg)</b>         | 0,25              |
| <b>Sódio (g/kg)</b>           | 0,68              |
| <b>Ferro (mg/kg)</b>          | 14,33             |

**Tabela 1.** Composição centesimal do caldo de cana *in natura* (OLIVEIRA et al. 2007)  
Adaptado

## 9.2. Anexo II - Composição do meio RPMI

| <b>Aminoácidos</b>                                   | <b>Mg/L</b> |
|------------------------------------------------------|-------------|
| <b>L-Arginina HCl</b>                                | 200,000     |
| <b>L-Asparagina</b>                                  | 50,000      |
| <b>L- Ácido Aspártico</b>                            | 20,000      |
| <b>L- Cistina 2HCl</b>                               | 65,150      |
| <b>L- Ácido Glutâmico</b>                            | 20,000      |
| <b>L- Glutamina</b>                                  | 300,000     |
| <b>Glicina</b>                                       | 10,000      |
| <b>L- Histidina</b>                                  | 15,000      |
| <b>L- Hidroxiprolina</b>                             | 20,000      |
| <b>L- Isoleucina</b>                                 | 50,000      |
| <b>L- Leucina</b>                                    | 50,000      |
| <b>L- Lisina HCl</b>                                 | 40,000      |
| <b>L- Metionina</b>                                  | 15,000      |
| <b>L- Fenilalanina</b>                               | 15,000      |
| <b>L- Prolina</b>                                    | 20,000      |
| <b>L- Serina</b>                                     | 30,000      |
| <b>L- Treonina</b>                                   | 20,000      |
| <b>L- Triptofano</b>                                 | 5,000       |
| <b>L- Tirosina 2Na2H2O</b>                           | 28,830      |
| <b>L- Valina</b>                                     | 20,000      |
| <b>Sais Inorgânicos</b>                              |             |
| <b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O</b> | 100,000     |
| <b>KCl</b>                                           | 400,000     |
| <b>MgSO<sub>4</sub> (anhidro)</b>                    | 48,840      |
| <b>NaCl</b>                                          | 6.000,000   |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhidro)</b>       | 800,000     |
| <b>Vitaminas</b>                                     |             |
| <b>d-Biotina</b>                                     | 0,200       |
| <b>D-Ca Pantotenato</b>                              | 0,250       |
| <b>Cloreto de Colina</b>                             | 3,000       |
| <b>Ácido Fólico</b>                                  | 1,000       |
| <b>Mio- Inositol</b>                                 | 35,000      |

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| <b>Niacinamida</b>                    | 1,000     |
| <b>Piridoxina HCl</b>                 | 1,000     |
| <b>Riboflavina</b>                    | 0,200     |
| <b>Tiamina HCl</b>                    | 1,00      |
| <b>Vitamina B12</b>                   | 0,005     |
| <b>Outros Componentes</b>             |           |
| <b>D- glicose</b>                     | 2.000,000 |
| <b>Ácido para-Aminoenzôico (PABA)</b> | 1,000     |
| <b>Glutathiona (reduzida)</b>         | 1,000     |
| <b>Vermelho de fenol (sódio)</b>      | 5,300     |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b>              | 2.000,000 |
| <b>HEPES</b>                          | 0,000     |

**Tabela 2.** Composição do meio RPMI-1640. Disponível em: <https://lgcbiotecnologia.com.br/produto/rpmi-1640-com-bicarbonato-de-sodio-e-l-glutamina/#.YIB80uhKjIU>