



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

LARA LIMA SECCADIO

**FATORES DE POSSÍVEL INFLUÊNCIA COMPORTAMENTAL
EM TRIATOMÍNEOS DURANTE A PÓS-COLHEITA DE FRUTOS
DA PALMEIRA *EUTERPE OLERACEA***

**BELÉM
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

LARA LIMA SECCADIO

**FATORES DE POSSÍVEL INFLUÊNCIA COMPORTAMENTAL
EM TRIATOMÍNEOS DURANTE A PÓS-COLHEITA DE FRUTOS
DA PALMEIRA *EUTERPE OLERACEA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez (orientador)

BELÉM
2013

LARA LIMA SECCADIO

**FATORES DE POSSÍVEL INFLUÊNCIA COMPORTAMENTAL
EM TRIATOMÍNEOS DURANTE A PÓS-COLHEITA DE FRUTOS
DA PALMEIRA *EUTERPE OLERACEA***

Avaliado em: ___/___/____
Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA :

Prof.º Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)

Prof.ª Dra. Consuelo Lucia Sousa de Lima
(FEA/ITEC/UFPA – Membro externo)

Prof.º Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro interno)

Prof.º Dr Rosinelson da Sila Pena
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro interno)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao destino, que me proporcionou caminhos para seguir em frente e me trouxe desafios para que eu pudesse ultrapassar e me fortalecer, contando sempre com a ajuda divina.

À minha querida mãe e filha, Marlene Lima, por ser o melhor exemplo de dignidade, coragem e força. E por ter me ensinado, sem palavras, o caminho da decência, do trabalho e do amor incondicional.

À minha mãe ó, por ter me adotado dentro do seu imenso coração, sendo tão solidária e companheira à mim, durante toda vida.

Ao meu pai, Valério Seccadio, pelo apoio e imensa contribuição para minha formação profissional. E, principalmente, por ter me dado cinco amigos e grandes amores.

Ao meu orientador, Hervé Rogez, pela oportunidade, confiança e convivência, que me tornou uma pessoa mais forte e positiva.

Aos meus companheiros do Pépis, Elem Caramês, Helber Salmon e Berny Erlinny pela colaboração (missões) e, principalmente, pela paciência, ao longo desses dois anos. E ao nosso amigo fiel, Aureliano Dias, pela imensa gentileza em nos ajudar.

Ao Jesus, por ter me acolhido no Laboratório Usina de Alimentos. E a toda equipe do laboratório, principalmente a Bianca Scolaro, Caroline Santos, Ana Caroline e Rogério Vieira.

À Elenilde Góes (SESPA), Marcos Obara (UnB), Cleber Galvão (FioCruz) pelas oportunidades, formadoras de conhecimento, sobre “o mundo de Chagas”.

Ao Profº Norberto Peporini, por abrir as portas do NPPNS para mim, de maneira tão gentil, competente e alegre. Foi um prazer imenso conviver com você e a sua equipe durante os seis meses de maior intensidade deste trabalho.

Ao Daniel Pavarini e à Cristina, pelo apoio e pelas contribuições imprescindíveis para a execução deste trabalho. E ainda, ao Dani, pelas discussões sobre os resultados e a vida.

Ao Fagner Aguiar, por introduzir para mim essa nova e desafiante experiência. E, principalmente, por ter sido tão gentil e acessível, escutando as minhas lamentações e encontrando-me sempre.

À minha filha, Dora Seccadio, por tornar mais leve as noites em claro, ao longo de inúmeras fermentações. De fato, não era preciso apenas ter o mesmo sangue, era

preciso ser você, para aguentar tantas horas de sono, como um sorriso no rosto e empolgação.

À Delma e suas meninas, por terem me proporcionado um lar tão caloroso em Ribeirão Preto (SP). E à Dayana Rúbio, por ter me acolhido de maneira tão amável.

Ao Paulo, por tornar as madrugadas mais seguras, e a Daiana por me alimentar carinhosamente.

À Ketty Lee, pela parceira, firmada com muito sucesso, desde 1987. Fundamental da minha na vida!

À Mônica Campos, Taiana Ladeira, Anna Tsukui e Allena Ayana, pela amizade.

À Luana Seccadio e a Daniela Neves por, mesmo distantes fisicamente, serem pessoas tão presentes e verdadeiras, em todos os momentos.

Ao Tiago Brasil, principalmente, pela amizade e paciência ao longo desses seis anos. Os dias, com toda certeza, são melhores ao seu lado. Obrigada por dividir tantos sentimentos e planos comigo.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESPA, pelo financiamento da pesquisa.

A todo o ambiente acadêmico da UFPA, por exigir muito mais de mim do que eu podia esperar. Obrigada por me fazer crescer sozinha, e ao mesmo tempo, tão bem acompanhada.

E a todos aqueles que, em tempos idos, acreditaram em mim, abriram seus espíritos, estenderam-me suas mãos, transmitiram-me otimismo, concederam-me oportunidade, reavivaram-me a força interior, fizeram-me ganhar espaços e acabaram por contribuir de uma forma ou de outra, para que hoje eu esteja aqui.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Entre as diversas vias de transmissão da Doença de Chagas (DC), a forma oral, através da ingestão do suco de açaí, tem ganhado grande destaque. A literatura científica sugere uma atração do inseto vetor da Doença de Chagas, o triatomíneo, pelos frutos de *Euterpe oleracea*, que sofrem fermentação espontânea, de maneira mais pronunciada, em ambientes de microaerobiose. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar os produtos da fermentação natural do açaí, em condições de hipoxia, e relacioná-los com o comportamento dos triatomíneos. Para isso, acompanhou-se o processo de fermentação espontânea do açaí, em sistema fechado, através dos seguintes parâmetros: produção dos compostos orgânicos voláteis, taxa de respiração, temperatura e umidade, nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 horas, pós-colheita. Para a extração dos compostos orgânicos voláteis foi otimizado um método em *Headspace*, por microextração em fase sólida. As variáveis foram estudadas e otimizadas nas seguintes condições: massa da polpa (650 mg); fibra extratora (Carboxen/Polidimetilsiloxano); tempo de exposição da fibra (30 min); temperatura e tempo de banho (50°C/30 min); tempo de desorção (4 min). A identificação dos compostos orgânicos voláteis foi realizada por GC-MS. Observou-se que todas as amostras sofreram fermentação alcoólica e acética, fato este coerente ao condicionamento, microaerófilo, em que foi acompanhado o processo de fermentação natural da polpa. Além disso, outros processos fermentativos foram identificados, como a fermentação malolática e caprótica. A identificação desses produtos metabólicos indicam uma perda na qualidade sensorial da polpa de açaí, assim como podem indicar uma possível atração dos insetos vetores da Doença de Chagas pelo fruto. Dessa maneira, fica evidente a necessidade de aplicação das boas práticas de fabricação na cadeia produtiva deste fruto, afim de minimizar o desenvolvimento microbiano e, por conseguinte, os processos fermentativos.

Palavras chave: Doença de Chagas, pós-colheita, fermentação espontânea, açaí, HS-SPME, GC-MS.

ABSTRACT

Among the routes of transmission of Chagas Disease, the oral form, through the consumption of acai juice, has gained great prominence. The scientific literature suggests an attraction of the insect vector (triatomine) of Chagas Disease, to the *Euterpe oleracea* fruits, under spontaneous fermentation which is more pronounced in microaerobiose environments. Thus, this study was aims to identify the products of natural fermentation of acai in hypoxic conditions, and relate them to the behavior of the insects. For this purpose, the spontaneous fermentation process of acai, in a closed system, was followed up, using the following parameters: volatile organic compounds production, respiration rate, temperature and humidity, at 0, 5, 10, 15, 20 to 25 hours during post-harvest. For the extraction of volatile organic compounds a *headspace* method with solid phase microextraction was optimized. The variables were studied and optimized on the following conditions: pulp mass (650 mg); fiber extractor (CAR/PDMS); fiber exposure time (30 min), temperature and time of the bath (50 °C/30 min); desorption time (4 min). The volatile organic compounds analysis was performed by GC-MS, allowing for their identification. It was observed that all the samples underwent alcoholic and acetic fermentations, which is consistent to the microaerophilic conditios used for the natural fermentation process of the açai pulp. In addition, other fermentation processes were identified as: malolactic caproic acid fermentation. The identification of these metabolic products indicates a loss in sensory quality of acai pulp, and may indicate a possible explanation for the mechanism of attraction of the insect vectors of Chagas Disease to the fruits. Thus, ones can note the necessity of application of good manufacturing practices in the production chain of açai fruit, with the aim to minimize microbial growth and therefore fermentation processes.

Key-words: Chagas disease, triatomine, postharvest, spontaneous fermentation, acai, HS-SPME, GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estados brasileiros com relatos de surtos da Doença de Chagas Aguda por meio de transmissão alimentar.	19
Figura 2: <i>Triatoma infestans</i> e <i>Rhodnius pictipes</i> - fase adulta	20
Figura 3: Representação esquemática de uma sensila olfativa de inseto.	22
Figura 4: Conversão estequiométrica da glicose a etanol e dióxido de carbono (Equação de Gay-Lussac).	28
Figura 5: Formação de ácido acético a partir de etanol por <i>Acetobacter aceti</i>	30
Figura 6: Açazeiro (<i>Euterpe oleracea</i>) - Abaetetuba (PA).	31
Figura 7: Evolução das bactérias mesófilas totais em função do tempo e temperatura de armazenamento dos frutos do açazeiro.....	34
Figura 8: Perda de massa dos frutos do açazeiro em função do tempo e temperatura de armazenamento.	34
Figura 9: Evolução da carga bacteriana fermentativa dos frutos do açazeiro acondicionados em caixas fechadas e as concentrações de O ₂ e CO ₂	35
Figura 10: Representação gráfica do princípio de equilíbrio termodinâmico trifásico.	37
Figura 11: Processo de microextração em fase sólida e dessorção da fibra em cromatógrafo gasoso.....	39
Figura 12: Despulpamento do fruto de <i>E. oleracea</i> para extração dos COVs.	42
Figura 13: Fermentação espontânea de frutos de açaí em recipiente de vidro (A) e em recipiente de PE (B), em condição microaerófila.....	44
Figura 14: Etapas de preparo para obtenção da polpa de <i>E. oleracea</i> fermentada, e extração das substâncias voláteis produzidas durante o processo fermentativo, e posterior análise por GC-MS.....	45
Figura 15: Comparação dos cromatogramas obtidos com as fibras CAR/PDMS (preto), Poliacrilato (azul) e PDMS/DVB (rosa), em CG-MS.	48
Figura 16: Comparação dos cromatogramas obtidos com M1 (650 mg; preta) e M2 (750 mg; rosa), em CG-MS.	49
Figura 17: Comparação dos cromatogramas obtidos no tempo de fermentação da polpa de 15h, em vail, com tempo de exposição da fibra por 5 (preto), 10 (rosa), 20 (azul), 30 min (marrom) a 50°C, em sistema CG-MS.	50

Figura 18: Comparação dos cromatogramas obtidos no tempo de fermentação da polpa de 15h, em vail, com exposição da fibra por 30 min a 50°C (preto) e 60°C (rosa), ambas por 30 minutos, em sistema CG-MS.	50
Figura 19: Concentração de O ₂ e CO ₂ (%) durante fermentação espontânea dos frutos de <i>E. oleracea</i> , provenientes de Benevides (F1) e Abaetetuba (F2).	51
Figura 20: Evolução da temperatura e UR durante fermentação espontânea dos frutos de <i>E. oleracea</i> , provenientes de Benevides (F1) e Abaetetuba (F2).	52
Figura 21: Sinal obtido por IE-MS, identificado como etanol.	53
Figura 22: Sinal IE-MS identificado como ácido acético.	53
Figura 23: Evolução da produção do etanol e ácido acético ao longo da cinética de fermentação espontânea dos frutos de <i>E. oleracea</i>	54
Figura 24: Sinal obtido por IE-MS, identificado como ácido caprótico.	55
Figura 25: Sinal obtido por IE-MS, identificado como ácido isobutírico.	55
Figura 26: Produção dos ácidos carboxílicos durante as 25 horas de concionamento dos frutos de <i>E. oleracea</i>	59
Figura 27: Produção do ácido malônico e CO ₂ , durante fermentação espontânea dos frutos de <i>E. oleracea</i>	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Registro de DCA no estado do Pará, e municípios com maiores notificações da doença.	19
Tabela 2. Mistura de odores sintéticos testados em estudos comportamentais de triatomíneos. L-AL: L-(+) Ácido Láctico; C3-C6: referem-se aos ácidos carboxílicos n-alifáticos.	25
Tabela 3. Exemplos de revestimentos de fibra de SPME disponíveis comercialmente e suas aplicações. Fonte: Supelco (2012).	38
Tabela 4. Condições otimizadas para extração dos COVs.	43
Tabela 5. Parâmetros físicos utilizados na integração dos sinais cromatográficos.	47
Tabela 6. Compostos orgânicos voláteis identificados ao longo das 25 horas da cinética de fermentação espontânea dos frutos de <i>E. oleracea</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS

DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas Aguda
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
SPME	<i>Solid Phase Micro Extraction</i>
HS	<i>Headspace</i>
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
CG-MS	Chromatography–mass Spectrometry
SESPA	Secretaria Estadual de Saúde do Pará
GMs	Glândulas Metasternais
UR	Umidade Relativa
PQQ	Pirroloquinolina Quinona
UFC	Unidade Formadora de Colônia
SPE	Solid Phase Extraction
PDMS	Polidimetilsiloxano
DVB-PDMS	Divinilbenzeno-PDMS
CAR/PDMS	Carboxen/PDMS
CW-DVB	Carbowax-DVB
DIC	Detecção por Ionização em Chama
IR	Detecção Espectrométrica por Absorção no Infra-vermelho
PA	Pará
PE	Polietileno
NPPNS	Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais e Sintéticos
IRR	Índice de Retenção Relativa
M1	650 mg de polpa de açaí
M2	750 mg de polpa de açaí
F1	Fruto fermentado procedente Murinin
F2	Fruto fermentado procedente Ilha do Campumpema
IE	Ionização por Elétrons
°C	Graus-Celsius
TR	Tempo de Retenção
IS	Índice de Similaridade

m/z

Relação massas/carga

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 DOENÇA DE CHAGAS	17
2.1.1 Generalidades	17
2.1.2 Transmissão oral	18
2.1.3 Triatomíneos, mecanismos e fatores de atração	20
2.1.4 Mecanismo termosensitivo.....	25
2.1.5 Mecanismos higrosensitivos.....	26
2.2 FERMENTAÇÃO	27
2.2.1 Fermentação alcoólica.....	28
2.2.2 Fermentação láctica.....	29
2.2.3. Fermentação acética.....	29
2.3 AÇAI	31
2.4 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS .	35
2.4.1 Headspace – Microextração em Fase Sólida (HS-SPME).....	36
2.4.2 Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS).....	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 MATRIZ ALIMENTÍCIA.....	42
3.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO HS-SPME	42
3.3 ETAPA DE FERMENTAÇÃO	44
3.3.1. Frutos de <i>Euterpe oleracea</i>	44
3.3.2 Identificação e quantificação dos produtos voláteis da fermentação	46
3.3.3 Determinação dos percentuais relativos dos analitos.....	47
3.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE HS-SPME.....	48
4.2 FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DOS FRUTOS DE <i>E. OLERACEA</i>	51
4.2.1 Concentração de gases, temperatura e umidade relativa	51
4.2.2 Tipos de fermentação	53

4.2.3 Compostos orgânicos voláteis (COVs).....	55
4.3 IMPLICAÇÕES SOBRE UMA POSSÍVEL ATRAÇÃO DE TRIATOMÍNEOS	61
4.3.1 Concentração de gases, temperatura e umidade relativa	61
4.3.2 Compostos orgânicos voláteis (COVs).....	62
5 CONCLUSÃO.....	66
6 REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

Em decorrência de seu alto grau de impacto socioeconômico, a Doença de Chagas (DC) está entre as mais importantes doenças parasitárias do continente americano, porém ainda configura uma doença negligenciada. Entre as suas vias de transmissão, a forma oral tem contribuído para o surgimento de novos casos e se dá, principalmente, pela ingestão de formas tripomastigotas metacíclicas do protozoário *Trypanosoma cruzi*, presentes em diferentes alimentos (CAMANDAROBÁ et al., 2002; WHO, 2002; BARBOSA, 2010).

A ocorrência de Doença de Chagas Aguda (DCA) relacionada ao consumo de alimentos constituía, até o ano de 2004, um evento pouco conhecido ou investigado, embora notificado pelo Ministério da Saúde do Brasil. Recentemente, microepidemias de DCA, com casos graves e significativa letalidade na região Norte do Brasil, têm sido associadas à transmissão do *T. cruzi* pela polpa de açaí, seja pela contaminação dos frutos ou da própria polpa, por meio dos insetos vetores (triatomíneos, conhecidos como barbeiros) (BARBOSA, 2010), os quais podem ser triturados no momento do despulpamento, ou pelo contato com seus dejetos fecais.

Vários odores emitidos pelos hospedeiros são conhecidos por despertarem a atração dos insetos hematófagos. O dióxido de carbono (CO₂), os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e o ácido láctico têm sido apontados como pistas importantes, de triatomíneos em busca de alimento (BOTTO-MAHAN, et al., 2002; BARROZO; LAZZARI, 2004; GUERENSTEIN; LAZZARI, 2008). Alguns alcóois, aldeídos e cetonas são frequentemente relacionados ao comportamento sexual de triatomíneos (VITTA et al., 2009; PONTES et al., 2008).

Aguiar (2010) sugeriu que entre as possíveis causas de atração dos triatomíneos pelo fruto do açaí, estejam alguns produtos das reações metabólicas que ocorrem neste fruto, tais como: o CO₂ e os ácidos orgânicos. Esses produtos voláteis podem ter sua produção aumentada devido às condições de armazenamento e transporte do açaí, os quais são empilhados nos porões dos navios em paneiros, dificultando a aeração do local, fazendo prevalecer a carga microbiana fermentativa. O autor relatou uma produção intensa dessas substâncias até 27 horas de fermentação espontânea, em sistema fechado.

Dentre as técnicas utilizadas para concentração de compostos voláteis, a microextração em fase sólida (SPME – *Solid Phase Micro Extraction*), no *headspace* (HS), destaca-se pela sua alta sensibilidade e seletividade, permitindo também baixas temperaturas durante a extração, evitando assim a transformação de compostos termolábeis. Por isso, tem sido a técnica mais relatada para definir o perfil químico real de substâncias voláteis em frutas, e, ainda, a mais fidedigna em estudos que correlacionam a interação dessas substâncias com organismos.

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo geral acompanhar o processo de fermentação espontânea, pós-colheita, dos frutos de *E. oleracea*, identificando os compostos orgânicos voláteis (COVs), para posterior correlação dessas substâncias com a atração do inseto vetor da Doença de Chagas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar o processo de fermentação natural dos frutos de *E. oleracea*, de duas procedências, em sistema fechado, durante 25 horas pós-colheita.
- Otimizar um método HS-SPME para extração dos compostos voláteis produzidos durante fermentação natural dos frutos.
- Identificar e quantificar os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos durante o processo fermentativo via CG-MS.
- Correlacionar os produtos do processo fermentativo, com a atração de triatomíneos, de acordo com a literatura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

2.1.1 Generalidades

A DC ou tripanossomíase americana foi descrita pelo médico sanitarista Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas – Carlos Chagas – em 1909. Esse brasileiro descreveu o agente etiológico, protozoário flagelado, *T. cruzi*, o transmissor (babeiro) e os modos de transmissão da doença, assim como comprovou a existência de vertebrados que são reservatórios silvestres e domésticos do parasita, esclarecendo os aspectos básicos da epidemiologia (ARGOLO et al., 2008; BRASIL, 2009).

Atualmente, a DC constitui uma das mais importantes endemias do Brasil e da América Latina. Amplamente distribuída nas Américas Central e do Sul, a doença ocorre do sul dos Estados Unidos até a Argentina (SZAJNMAN et al., 2005; MASSARO et al., 2008), embora a prevalência da infecção no continente americano tenha sido reduzida cerca de 70%, por volta do ano 2000 (MONCAYO, 2003). Em 2009, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009) estimou que cerca de 12 milhões de pessoas estivessem infectadas com DC nas Américas - sendo 2 milhões no Brasil - e que mais de dez mil pessoas morreriam, por ano, em consequência da DC (BRASIL, 2011).

Casos da DC na Região Amazônica, e os riscos de sua transmissão, têm sido motivo de preocupação nos últimos anos, devido à grande dispersão de vetores infectados e à crescente migração humana que, contribuindo para a degradação do habitat natural, implica na redução da oferta de animais dos quais o barbeiro se alimenta; situação que estaria levando esse inseto a procurar outras fontes alimentares, e, ainda, causando a domiciliação de algumas espécies (DIAS; PRATA; SCHOFIELD, 2002; ARGOLO et al., 2008).

Na Amazônia, a DC é transmitida, principalmente, de forma vetorial, através das fezes de triatomíneos infectados e, mais ainda, por via oral, através de alimentos contaminados com o parasita, principalmente a partir de triatomíneos ou de suas dejeções. Na região, a transmissão oral está intimamente relacionada ao consumo da bebida açaí (DIAS, 2006; NÓBREGA et al., 2009; PARÁ, 2009).

2.1.2 Transmissão oral

A transmissão do *T. cruzi*, por via oral, tem caráter habitual no ciclo enzoótico¹ primitivo desse parasita, através da ingestão - por mamíferos suscetíveis - de vetores e reservatórios infectados. No caso do homem, essa transmissão ocorre de maneira esporádica e circunstancial, através de alimentos contaminados com o parasita, principalmente a partir de triatomíneos ou de suas dejeções (DIAS et al., 2000; CARLIER et al., 2002; WHO, 2002).

Embora tenha sido amplamente divulgada pela mídia a partir de 2005, estudos revelam que a via oral na transmissão do *T. cruzi* não é um fato recente. Sua importância é conhecida há muito tempo e a infecção em animais onívoros e insetívoros, susceptíveis, ocorre com a predação ou com a ingestão de um alimento contaminado (PEREIRA et al., 2009).

Do ponto de vista epidemiológico, surtos da doença aguda por via alimentar vêm sendo observados desde o século passado. Porém, o destaque à importância da via oral para a transmissão da DC aconteceu somente na década de 1960, quando Shawet et al. (1969) anteviram a possibilidade da transmissão oral na cidade de Belém (PA). Os autores observaram que quatro pessoas de uma mesma família estavam envolvidas e que três delas encontravam-se na fase aguda da doença, no momento do diagnóstico. Desde então, muitos são os registros de microepidemias (PANAFTOSA, 2006) da DCA por transmissão alimentar em diversos estados brasileiros. A Figura 1 apresenta o mapa do Brasil, com as regiões envolvidas em episódios da DCA pela transmissão oral.

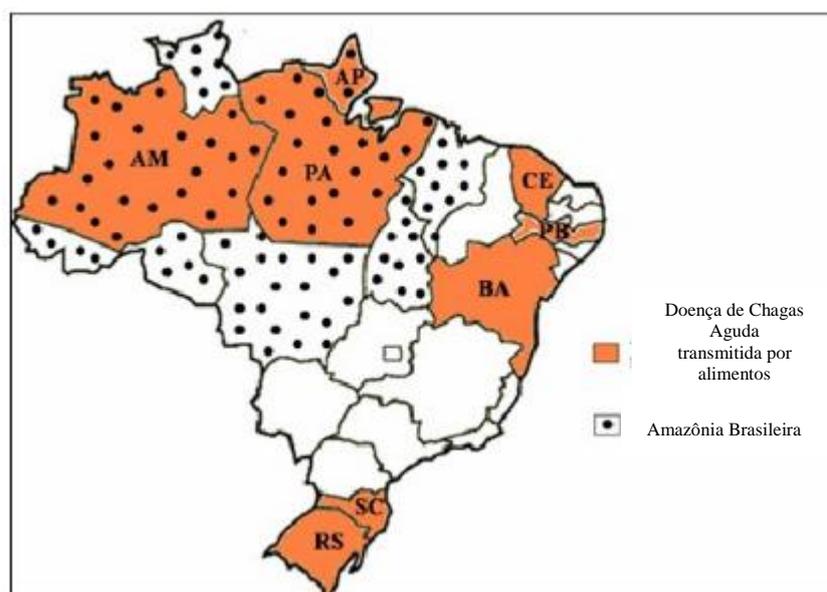
A via oral, com envolvimento do açaí, é a forma de transmissão mais usual da DC na Amazônia Brasileira. O Instituto Evandro Chagas (IEC) (Belém, PA) defende a hipótese de que a transmissão oral ocorra devido aos barbeiros serem atraídos pela luz dos pontos de venda e, conseqüentemente, serem esmagados ao caírem dentro das máquinas despoldadeiras e, ainda, por ocasião do embarque dos frutos, atraídos pela luz das embarcações e caindo nos paneiros (VALENTE et al., 2005).

Em março de 2005, um relatório do IEC esclareceu um surto de doença aguda na comunidade do Igarapé da Fortaleza, área portuária da cidade de Santana (AP), ocorrido em dezembro de 2004. Nesse surto, 27 pacientes, de seis famílias diferentes, foram confirmados com DCA, e o relato comum era o consumo de açaí, possivelmente contaminado com fezes de barbeiro no local de venda (SVS, 2005). Até 2006, apesar de

¹ ciclo de vida de um parasita que se hospeda em espécies diferentes de hospedeiro ao longo da vida.

ser um evento pouco divulgado, foram notificados cerca de 430 casos de DCA relacionados ao consumo de alimentos contaminados, somente na região Amazônica brasileira (SVS, 2007a).

Figura 1: Estados brasileiros com relatos de surtos da Doença de Chagas Aguda por meio de transmissão alimentar.



Fonte: Pereira et al. (2010).

Segundo a Secretaria Estadual de Saúde do Pará (SESPA), foram notificados 941 casos de DCA no estado entre 2006 e março de 2013 (Tabela 1). Em 2011 e 2012 os relatos sobre a DCA concentraram-se, principalmente, na região amazônica, com associação à transmissão oral pelo consumo frequente da polpa de açaí contaminada. Belém foi a campeã de casos. O Pará é responsável por 80% dos registros da doença de Chagas no Brasil (JANSEN et al., 2011).

Tabela 1. Registro de DCA no estado do Pará, e municípios com maiores notificações da doença.

Estado/Município	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013*	Total
Pará	91	131	99	242	81	141	156	8	941
Belém**	13	23	28	45	20	41	24	2	196
Abaetetuba***	13	17	8	58	17	10	64	0	187

* Atualização dos dados em 03 de março de 2013.

** Município com maior número de notificações de DCA.

*** Segundo município com maior número de notificações de DCA. Fonte: SESPA (2013).

2.1.3 Triatomíneos: mecanismos e fatores de atração

Os triatomíneos são insetos da ordem Hemiptera, pertencentes à família Reduviidae e à subfamília Triatominae. Com base em características morfológicas, esse grupo está dividido em 136 espécies, distribuídas em 18 gêneros e estes últimos estão contidos em 6 tribos. Vale ressaltar que 125 espécies de 17 dos gêneros e 4 tribos ocorrem exclusivamente no continente americano (GALVÃO et al., 2003; GALVÃO; ÂNGULO, 2006). Mas, nove figuram na lista de principais vetores da DC: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius robustus* e *Rhodnius Pictipes* (VALENTE et al., 1999; GALVÃO et al., 2003).

A maioria das espécies de triatomíneos ocupa ecótopos silvestres, onde vivem em estreita associação com seus hospedeiros vertebrados. Entretanto, várias espécies também invadem e colonizam o peridomicílio e o domicílio humano, principalmente em áreas onde o habitat natural foi degradado (DIAS et al., 2002; COURA, 2003).

Os triatomíneos são insetos hemimetábolos² que apresentam cinco estádios ninfais seguidos por uma fase adulta (Figura 2) a partir da qual adquirem asas e aparelho reprodutor. Estritamente hematófagos, dedicam suas habilidades sensoriais a detectar sinais físicos e químicos emitidos por seus hospedeiros. Sendo assim, apresentam mecanismos mecanicosensitivos, quimiosensitivos, termosensitivos e higrosensitivos, que lhes permitem ter, como principal pista de uma fonte alimentar, dentre outras, o calor, a umidade e seus odores (GUERENSTEIN; HILDEBRAND, 2008).

Figura 2: *Triatoma infestans* e *Rhodnius pictipes* - fase adulta



Fonte: IEC (2007).

² É um modo de desenvolvimento indireto, com metamorfose, característica de muitos artrópodes. As fases de desenvolvimento de insetos hemimetábolos são: Ovo → Ninfa → Imago.

2.1.3.1 Mecanismos quimiosensitivos

As substâncias químicas, relevantes na obtenção de informações pelos organismos, são denominadas “infoquímicos” (DICKE; SABELIS, 1988). O termo infoquímico pode ser definido como “uma substância química que fornece informação na interação entre dois indivíduos, provocando um comportamento ou resposta fisiológica específica”. Os infoquímicos podem ser classificados com base no tipo de interação. Se a interação é intraespecífica, denominam-se feromônios. Se a interação ocorre entre dois indivíduos de espécies diferentes, os infoquímicos são denominados aleloquímicos (RUTHER et al., 2002).

Em triatomíneos, o uso de infoquímicos pode estar relacionado com o reconhecimento e localização de hospedeiros, com o encontro de possíveis parceiros para o acasalamento, com a defesa e alarme, assim como com o comportamento de agregação e busca de abrigos (SANTOS-MALLET et al., 2005). Esses insetos demonstram uma resposta anemotática positiva, ou seja, orientam-se contra correntes de ar, quando confrontados com correntes que carregam certos odores associados ao hospedeiro (BARROZO et al., 2004).

A antena dos insetos é o principal órgão responsável pela percepção de odores. As moléculas de odor podem ser capturadas por pêlos olfativos ou sensilas. Esses órgãos sensoriais possuem um ou vários neurônios associados a uma estrutura cuticular que contém um grande número de pequenos poros. Através deles, as moléculas a serem detectadas penetram nos poros, passam à linfa³ da sensila e, após serem transportados por proteínas solúveis ligadoras de odor, estimulam receptores na membrana dos dentritos⁴ (NATION, 2002; ROSPARS, 2013). As sensilas olfativas (Figura 3) podem apresentar diferentes formas, mas todas elas têm, em comum, múltiplos poros distribuídos em sua superfície (CHAPMAN, 1998; ROSPARS, 2013).

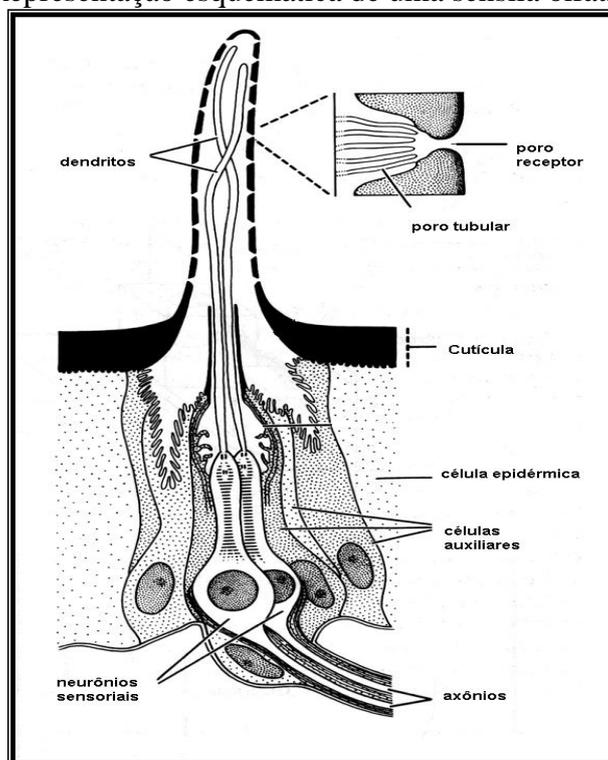
Nas antenas de triatomíneos, 16 diferentes tipos de sensilas foram identificados, 13 sobre a superfície da antena e 3 no pedicelo (INSAUSTI et al., 1999). Esses números incluem 8 tipos mecanosensoriais de sensilas, 5 tipos quimiosensoriais, uma classe mecano-químio-receptor, um tipo de termo-higro-receptor, e um tipo cuja função

³ Fluido transparente, que é produzido quando o sangue atravessa os vasos capilares e vaza para o corpo.

⁴ São numerosos prolongamentos dos neurônios que atuam na recepção de estímulos nervosos do ambiente ou de outros neurônios e na transmissão desses para o corpo da célula

permanece sob especulação. Este conhecimento é o resultado de estudos morfológicos, ultra-estruturais e fisiológicos de diferentes autores (GUERENSTEIN; GUERIN, 2001; DIEHL et al., 2003).

Figura 3: Representação esquemática de uma sensila olfativa de inseto.



Fonte: Chapman (1998).

Receptores antenais que são estimulados por substâncias voláteis, tais como L-ácido láctico, ácido pirúvico, aldeídos, ácidos graxos de cadeia curta, piridinas, furanos, terpenos e aminas foram encontrados em *T. infestans* (GUERENSTEIN; GUERIN, 2001; DIEHL et al., 2003).

2.1.3.1.1 Interação intraespecífica

Quando um sinal químico atrai indivíduos de um dos sexos na espécie, este é chamado feromônio sexual. A produção e liberação do feromônio sexual de um organismo emissor e sua resposta no receptor dependem da idade, período de acasalamento, estado fisiológico e fatores ambientais (LANDOLT; PHILIPS, 1997; FONTAN et al., 2002). Nos insetos, os feromônios são frequentemente misturas multicomponentes (VITTA et al., 2009; VIDAL, 2012) que podem, em certos sistemas, funcionar sinergicamente (BORDEN, 1990). Os feromônios, nos insetos, podem

também variar entre populações da mesma espécie separadas geograficamente (MILLER; ROELOFS, 1980).

O encontro e o reconhecimento entre os sexos, na maioria dos insetos, são mediados por feromônios sexuais que podem ser produzidos pela fêmea ou pelo macho. Os feromônios desencadeiam reações comportamentais no sexo oposto e podem atraí-lo de longas distâncias, reunindo vários indivíduos em torno do emissor (VITTA et al., 2009; ZACHARIAS et al., 2010).

Os triatomíneos apresentam dois pares de glândulas exócrinas produtoras de compostos voláteis: as glândulas metasternais (GMs), localizadas no metatoráx ventral, e as glândulas de Brindley, metatórax dorsolateral. Manrique et al. (2006) e Pontes et al. (2008), a partir de experimentos de comportamento e de identificação química dos produtos das GMs de *T. infestans* e *R. prolixus*, sugeriram que essas glândulas estariam envolvidas na comunicação entre sexos. Os autores mostraram que as substâncias produzidas por essas glândulas são emitidas espontaneamente durante a cópula, sendo que, as fêmeas de *R. prolixus*, emitem a secreção das GMs com maior frequência que os machos, tendo maior intensidade dessa atividade na fase escura do ciclo diário. Adicionalmente, foi demonstrado que a ocorrência de cópula em algumas espécies de triatomíneos requer a presença das substâncias emitidas pelas GMs (CRESPO; MANRIQUE, 2007).

Nas glândulas metasternais de *T. infestans* e *R. prolixus* já foram identificadas mais de 20 substâncias, incluindo, principalmente, cetonas e alcoóis, que são utilizadas para o reconhecimento sexual entre esses insetos (MANRIQUE et al., 2006; CRESPO; MANRIQUE, 2007; PONTES et al., 2008).

2.1.3.1.2 Interação interespecífica

Durante as horas do dia, os triatomíneos desenvolvem pouca atividade e são comumente encontrados em um estado de imobilidade ou em *akinesis*⁵, no interior dos abrigos. Sabe-se que o ritmo circadiano de atividade locomotora em *T. infestans* apresenta um padrão bimodal com um pico de atividade ocorrendo no anoitecer, chamado de escotofase, e outro no amanhecer (LAZZARI, 1992; LORENZO; LAZZARI, 1998).

⁵ Ausência do movimento voluntário.

A atividade de saída do abrigo nas primeiras horas da escotofase está relacionada com a busca de alimento (LORENZO; LAZZARI, 1998; GUERENSTEIN; LAZZARI, 2008). Uma vez fora dos abrigos, sabe-se que odores do hospedeiro modulam o processo de localização das fontes de alimento (BARROZO et al., 2004). Barrozo et al. (2004) e Bodin et al. (2008) demonstraram em *T. infestans* e *R. prolixus* que o ritmo de resposta comportamental aos odores provenientes do hospedeiro é controlado por um relógio endógeno circadiano e que esta resposta ocorre com maior intensidade somente durante as primeiras horas da escotofase.

A detecção dos odores ativa os triatomíneos, os quais tendem a aumentar sua atividade locomotora (GUERENSTEIN; GUERIN, 2001). Em habitats domésticos, o aumento dessa atividade, espontânea ou induzida por odores (ativação) pode fazer com que os insetos deixem seu refúgio em direção aos odores mesmo que encontrem-se a longas distâncias (atração). Ambas as respostas comportamentais, ativação e atração, podem ser evocadas pelas misturas de odores naturais dos hospedeiros ou por um só constituinte dessa mistura (GUERENSTEIN; LAZZARI, 2008).

É conhecido que o gás carbônico (CO₂) exerce um efeito positivo sobre insetos hematófagos, (GUERENSTEIN; HILDEBRAND, 2008). Esta é uma das consequências da adaptação dos triatomíneos ao habitat humano, o qual oferece abundante alimento (sangue), bem como ao seu peridomicílio (habitat de aves, mamíferos e répteis) (BARROZO; LAZZARANI, 2004b).

Gás carbônico tem sido testado com outros odores, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e o ácido láctico, os quais são comumente encontrados na transpiração de hospedeiros vertebrados, por exemplo, roedores, aves, humanos, coelhos, entre outros (GUERENSTEIN; LAZZARI, 2008). Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 2.

Aguiar (2010) evidenciou que os frutos de açaí, durante as primeiras 24 horas pós-colheita, dissiparam uma quantidade relevante de energia, na forma de calor, apresentando uma alta taxa respiratória. Nesse período, os frutos do açaizeiro passam por três tipos de fermentação espontânea: a alcóolica, a láctica e a acética, sendo mais evidentes em condição microaeróbia.

Tabela 2. Mistura de odores sintéticos testados em estudos comportamentais de triatomíneos. L-AL: L-(+) Ácido Láctico; C3-C6: referem-se aos ácidos carboxílicos n-alifáticos.

Misturas Testadas	Aumento da ativação	Aumento da atração
L-AL + CO ₂ ^a	Não	Sim ^b
L-AL + C ₃	Sem dados	Sim ^b
L-AL + C ₄	Sem dados	Sim ^b
L-AL + C ₅	Sem dados	Sim ^b
L-AL + C ₃ + C ₄ + C ₅	Sem dados	Sim ^b
L-AL + C ₆	Sem dados	Não
C ₃ + C ₄ + C ₅	Sem dados	Não
C ₃ + C ₄ + C ₅ + CO ₂	Sem dados	Não
CO ₂ + Amônia ^{a,d}	Sim	Sim ^{b,c}
Ácido Isobutírico + Nonanal	Não	Sim
Ácido Isobutírico + Amônia	Não	Não
Ácido Isobutírico + CO ₂	Não	Não
1-octen-3-ol + CO ₂	Não	Não

^a Teste com ninfas de *R. prolixus*.

^b Efeito sinérgico.

^c Atração similar ao evocado por odores de ratos.

^d Não houve resposta clara quando estes compostos foram testados isoladamente.

Fonte: Guerenstein e Lazzari (2008).

2.1.4 Mecanismo termosensitivo

A sensibilidade dos triatomíneos ao calor é extremamente alta. Eles reagem mesmo com detecções mínimas de energia. Nos experimentos de Lazzari e Nuñez (1989) foram obtidas respostas significativas quando utilizadas pequenas fontes de calor, apenas alguns $\mu\text{Watt}/\text{cm}^2$, sensibilizando o inseto. Em termos de intervalos de detecção, isto significa dizer que eles seriam capazes de perceber um rosto humano numa distância de 2 metros e um cachorro a vários metros de distância.

Triatomíneos permanecem sendo o único grupo de insetos sugadores de sangue, cuja capacidade de perceber a radiação infravermelha emitida pelo corpo do hospedeiro tem sido demonstrada (LAZZARI; NUÑES, 1989; SCHIMITZ et al., 2000). Mas o que isso significa em termos de localizar um hospedeiro? Para a resposta, alguns conceitos

termodinâmicos são necessários. A transferência de calor entre dois corpos pode ocorrer por três diferentes processos físicos: condução, convecção e irradiação.

Quando um calor de condução energiza átomos, aumenta vibração dos mesmos, que por sua vez, se propaga através do material. No caso em interesse o material é o ar e o resultado é a formação de um gradiente de temperatura ao redor do corpo do hospedeiro, que pode ser usado como orientação pelos insetos (GUERENSTEIN; LAZZARI, 2008).

Na convecção, dá-se a transferência de calor através da movimentação do fluido. Quando o fluido é aquecido por condução a partir de um corpo, sua temperatura aumenta e isto o torna menos denso. Subsequentemente, inicia-se um caminho ascendente a partir da fonte de calor. Quando a temperatura do fluido diminui, a densidade aumenta, iniciando um caminho descendente. Para alguns insetos hematófagos, a convecção não é apenas uma questão de transferência de calor, mas também de produção de correntes de ar ascendentes que transportam os odores dos hospedeiros. Mosquitos, por exemplo, parecem fazer uso de correntes de convecção numa abordagem vertical, de cima para baixo, a um hospedeiro (LEHANE, 2005).

O terceiro mecanismo, a radiação, envolve a emissão e absorção de energia radiante de comprimentos de onda correspondentes à região do infravermelho do espectro eletromagnético. Isso não requer condução em material e nem convecção de fluidos. Qualquer objeto em temperatura acima de zero absoluto emite radiação infravermelha em comprimento de onda que varia com sua temperatura (GUERENSTEIN; LAZZARI, 2008).

Schofield et al. (1992), em um experimento de campo natural, sugeriram que o efeito combinado do CO₂ com a emissão de infravermelho, foi responsável pela atração de *T. infestans* a cerca de 800 m de distância do ponto de abrigo do inseto.

2.1.5 Mecanismos higróscopivos

A umidade relativa (UR) do ar afeta o desenvolvimento e a sobrevivência de insetos, por ajudar a manter o conteúdo de água no corpo, através da permeabilidade cuticular (RAGHU et al., 2004). Por ser um fator ambiental, é comumente estudada junto com a temperatura, em trabalhos que avaliam o comportamento de triatomíneos, como na pesquisa de Rocha et al. (2011), que investigaram o efeito desse binômio sob a atividade de vôo da espécie *Rhodnius brethesi*.

O vapor d'água tem sido reportado como boa pista de localização de hospedeiros vertebrados por insetos hematófagos; entretanto, muitos estudos mostram-se restritivos quanto às propriedades eletrofisiológicas das células sensoriais (BARROZO, MANRIQUE; LAZZARI, 2003).

Roca e Lazzari (1994), estudando a influência da UR sobre *T. infestans*, verificaram que tanto adultos quanto ninfas permaneceram indiferentes, em relação ao alimento, em UR próximas de zero. Essa mesma espécie prefere abrigos com baixa UR, de acordo com Lorenzo e Lazzari (1999). Em temperatura ambiente, fontes úmidas de calor foram atrativas à *T. infestans* nos estudos de Barrozo, Manrique e Lazzari (2003), porém tal efeito foi limitado a curtas distâncias entre o inseto e a fonte de umidade. Em contrapartida, fontes dinâmicas, como correntes de ar carreando vapor d'água, não afetaram o comportamento espontâneo dessa espécie.

Gomez-Nuñez (1964), num estudo sobre criação de *R. prolixus*, percebeu que a UR exerceu maior impacto comportamental sobre o inseto, quando associada a elevadas temperaturas ambientais ($> 30^{\circ}\text{C}$).

2.2 FERMENTAÇÃO

O uso de processos fermentativos é bastante remoto. Sabe-se que desde a antiguidade, o homem já fazia uso de micro-organismos responsáveis pela fermentação de forma inconsciente, como um método de conservação de alimentos ou preparo de bebidas. Entretanto, os processos fermentativos tornaram-se objeto de intenso estudo após a descoberta de seus agentes causadores (micro-organismos).

Louis Pasteur, após investigação detalhada sobre as leveduras da cerveja e do vinho, concluiu que a causa das fermentações era a ação dos seres minúsculos, os micro-organismos, caindo por fim a definição antiga de que fermentação era um processo puramente químico (AMORIM, 2005; HUTKINS, 2006).

A fermentação é um processo de obtenção de energia utilizado por algumas bactérias e outros organismos, podendo ser espontânea, resultante de matérias-primas propícias à proliferação de micro-organismos, ou induzida por meio de culturas starter. Ela ocorre na maioria dos casos com a hidrólise oxidativa da glicose (ou outros monossacarídeos) em piruvato, que, depois, é transformado em algum outro produto, como o etanol (no caso da fermentação alcoólica) e o lactato (na fermentação láctica) (FRANCO, 1996; HUTKINS, 2006).

De uma maneira geral, os vegetais possuem uma composição total e pH muito favoráveis ao crescimento de várias espécies microbianas, quando há umidade adequada, tornando-se, assim, um meio bastante favorável a fermentações (MONTET; LOISEAU; ZAKHIA, 2004).

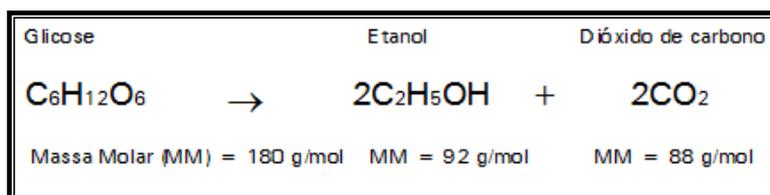
Em frutas a biota é predominantemente composta por fungos, e as leveduras, frequentemente, colonizam-se primeiro que os bolores, devido ao seu crescimento rápido. A contagem de leveduras pode variar entre 2,0 e 6,0 log UFC.g⁻¹ (ROSINI et al., 1982; NYANGA et al., 2007; DI CAGNO et al., 2008a,b).

2.2.1 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo exotérmico que resulta da transformação de açúcares simples em etanol e CO₂, como produtos principais, pela ação das leveduras, em concentrações baixas de oxigênio. Para adaptação em baixas concentrações de oxigênio, há necessidade de reciclar o NADH gerado na glicólise pelos micro-organismos, os quais não poderiam fazer fosforilação oxidativa, devido às condições anaeróbicas. Essa transformação de glicose em duas moléculas de etanol e duas de gás carbônico (oxidação incompleta) é possível pela presença de enzimas produzidas pelas leveduras (CHANDRARAJ; GUNASEKARAN, 2004).

Na fermentação alcoólica de açúcares, por ação de leveduras, os principais produtos obtidos, em proporções equimolares, são o etanol e o dióxido de carbono (Figura 4). Esse mecanismo foi quantificado pela primeira vez por Gay-Lussac, onde 100 kg de glicose rendem 51,1 kg de etanol e 48,9 kg de dióxido de carbono. O rendimento teórico de 51,1% em massa é conhecido como coeficiente de Gay-Lussac e é o dado básico na eficiência de conversão (JACKMAN, 1991).

Figura 4: Conversão estequiométrica da glicose a etanol e dióxido de carbono (Equação de Gay-Lussac).



Fonte: Ilha et al. (2008).

Não se pode prever, com precisão, a natureza e a quantidade de subprodutos que advêm de uma fermentação alcoólica. Entretanto, pesquisas recentes revelaram que os açúcares são transformados de 2,5% a 3% em glicerol, 0,2 a 0,4% em ácido láctico, 0,02 a 0,10% em ácido succínico, 0,2 a 0,7% em ácido acético, 0,05 a 0,10% em butilenoglicol, e de 1 a 2% são utilizados no crescimento e respiração da levedura (HASHIZUME, 2008).

2.2.2 Fermentação láctica

Durante a fermentação láctica, três grupos de microrganismos são encontrados: as bactérias lácticas, as enterobactérias e as leveduras, com as duas últimas crescendo mais, em detrimento das bactérias lácticas. Estas podem ser homofermentativas ou heterofermentativas. As homofermentativas produzem principalmente ácido láctico pela via glicolítica Embden-Meyerhof. As heterofermentativas produzem ácido láctico, mais quantidades apreciáveis de etanol, acetato e CO₂ pela via da 6-fosfogluconato/fosfocetolase (SABATINI et al., 2008).

As bactérias lácticas são uma pequena parte (2,0-4,0 log UFC.g) da microbiota autóctone de vegetais crus e frutas (BUCKENHÜSKES, 1997). Espécies heterofermentativa e homofermentativa, pertencentes aos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Enterococcus* e *Pediococcus*, foram identificadas em diversos vegetais, sendo *Lactobacillus plantarum* a espécie mais frequente (DI CAGNO et al. 2013).

Durante a fermentação láctica a redução do piruvato é catalisada pela enzima lactato-desidrogenase. O equilíbrio global dessa reação favorece fortemente a formação de lactato. Microrganismos fermentadores regeneram continuamente o NAD⁺ pela transferência dos elétrons do NADH, para formar um produto final reduzido, como são o lactato e o etanol; este último podendo ser produzido, também, na fermentação alcoólica pelas leveduras (LEHNINGER, 2011).

2.2.3. Fermentação acética

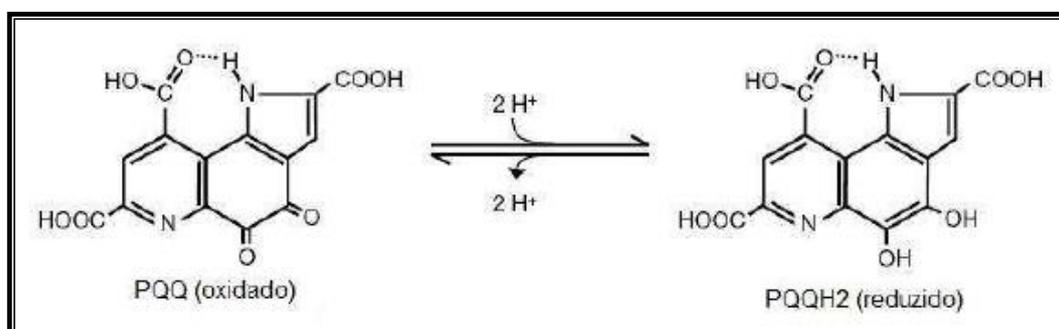
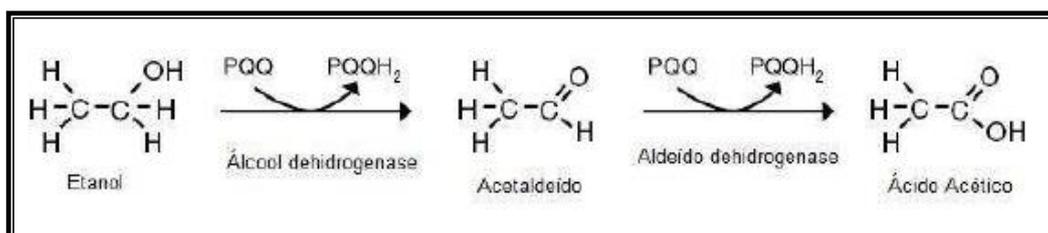
A fermentação acética é uma metabolização que consiste na oxidação parcial e rápida, aeróbica, e microaeróbica, de substratos de carbono, especialmente açúcares e álcool, com produção de ácido acético (GULLO; GIUDICI, 2008; AGUIAR et al., 2013). Desenvolve-se também na deterioração de bebidas de baixo teor alcoólico e de

certos alimentos. É realizada por bactérias denominadas acetobactérias, produzindo, além de ácido acético, dióxido de carbono e vários compostos como acetaldeído, etil acetato e outros ésteres, e álcoois superiores, como o metil butanol (FELLOWS, 2000).

Em um processo de fermentação espontânea, bactérias acéticas terão sua atividade metabólica favorecida após a fermentação alcoólica pelas leveduras, disponibilizando o principal substrato para esse tipo de bactéria, o etanol, além do oxigênio, uma vez que bactérias acéticas são aeróbicas, mas também suportam ambientes com hipóxia (SOLIERO; GIUDICI, 2009).

Segundo Hutkins (2006), a oxidação do etanol em ácido acético envolve duas reações enzimáticas. Na primeira reação, o etanol é oxidado a acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase; o oxigênio é requerido comoceptor final de elétrons. Em seguida, a aldeído desidrogenase oxida mais acetaldeído e ácido acético. Uma reação intermediária de hidratação também pode ocorrer em que hidratado de acetaldeído é formado. Ambas as enzimas exigem Pirroloquinolina Quinona (PQQ) como co-fator, que serve como umceptor final de elétrons. Em seguida, a aldeído desidrogenase oxida mais acetaldeído e ácido acético. Uma reação intermediária de hidratação também pode ocorrer em que hidratado de acetaldeído é formado. Ambas as enzimas exigem PQQ como co-fator, que serve como umceptor de elétrons (Figura 5).

Figura 5: Formação de ácido acético a partir de etanol por *Acetobacter aceti*.



Fonte: Hutkins (2006).

Em meio fermentativo controlado, a conversão do etanol em ácido acético ocorre em base equimolar e, após as reações serem completadas, a concentração final de ácido acético será igual ao do etanol em matéria-prima (assumindo que há perda insignificante por evaporação) (HUTKINS, 2006). Essas reações catabólicas acontecem com uma grande diminuição na energia livre, a qual junto com a subsequente hidrólise do ATP durante as reações de biossíntese, transporte e manutenção, resulta na produção de calor. A liberação de calor é uma propriedade geral do crescimento de microorganismos independentemente da natureza da fonte de carbono, ou se o processo é aeróbico ou anaeróbico (VOLPE, 1996).

2.3 AÇAÍ

A região amazônica apresenta inúmeras espécies frutíferas, dentre elas o açazeiro (*Euterpe oleracea* e *E. precatoria*), Figura 6, com potencial agrônômico, tecnológico, nutricional e econômico (MIRANDA et al., 2001; BICHARA; ROGEZ, 2011).

Figura 6: Açazeiro (*Euterpe oleracea*) - Abaetetuba (PA).



Fonte: Arquivo pessoal.

Atualmente, o açáí vem ganhando espaço no mercado internacional, por ser um alimento exótico e rico em compostos fenólicos e antocianinas, substâncias com elevada capacidade antioxidante e de comprovados efeitos benéficos à saúde, quando presentes na dieta humana (DUAILIBI, 2007; BICHARA; ROGEZ, 2011; KANG et al., 2012). Além disso, estudos demonstram que o suco de açáí é essencialmente energético, com elevada concentração de fibra alimentar. Dessa maneira, a polpa de açáí tornou-se um

alimento muito consumido no Brasil e em diversos outros países (BICHARA; ROGEZ, 2011).

De acordo com os valores de ingestão diária (BRASIL, 2005), o consumo de um litro de açaí tipo médio com 12,5% de matéria seca, contém 65,8 g de lipídios, 31,58 g de fibras e 12,6 g de proteínas, que correspondem, respectivamente, a 66%, 90% e de 25 a 30% da quantidade nutricional diária recomendada (BICHARA; ROGEZ, 2011).

Na região amazônica, especialmente no estado do Pará, o açaí é o principal suplemento da dieta alimentar da população. Em virtude de sua alta produtividade, a comercialização de açaí representa uma importante fonte de renda, o que o torna imprescindível à economia regional (ROGEZ, 2000). Liderando o mercado da fruticultura nacional, a exportação do suco de açaí chega a 500 mil toneladas/ano (ANDRADE et al., 2008; SAGRI et al., 2010).

Contudo, na maioria dos estabelecimentos paraenses, a produção artesanal não atende a quesitos necessários para garantir a segurança alimentar do consumidor. Há uma perda gradativa de qualidade dos frutos após a colheita, relacionada à contaminação do açaí nos procedimentos e à própria carga microbiana natural contida no fruto, a qual é elevada nos estabelecimentos de produção e comercialização do produto. Deste modo, as etapas de comercialização do açaí são realizadas, ainda, de maneira higiênico-sanitária insatisfatória, pois a cadeia produtiva do açaí é executada informalmente (na grande maioria dos casos), sem cuidados e conhecimentos tecnológicos adequados, não garantindo uma etapa que elimine de maneira segura a contaminação microbiológica, proveniente, principalmente, das etapas de colheita, armazenamento, transporte do fruto ou até mesmo na etapa de preparação do suco (NOGUEIRA et al., 1995; LIMA et al., 2008).

Um ponto crítico de controle está ainda nas etapas iniciais, onde os frutos após colhidos, são deixados nos cachos em contato direto com o solo e, após debulhados, ficam expostos e empilhados nos trapiches das casas ribeirinhas, permitindo também a contaminação pelo *T. cruzi*, oriundo dos triatomíneos. Esta é a etapa da cadeia de comercialização, onde há maior proximidade com o ecótopo natural dos triatomíneos (AGUIAR, 2010).

Os casos da DC registrados através da ingestão do suco de açaí estão associados ao processamento artesanal dos frutos, assim como suas etapas de armazenamento e transporte pós-colheita inadequados, onde o barbeiro, inseto vetor do *T. cruzi*, seria atraído e esmagado junto com os frutos no despoldamento ou então contaminaria os

frutos com suas fezes. A transmissão da DC através do açaí tem ocasionado, também, problemas socioeconômicos na região, tendo em vista que constitui-se, muitas vezes, como o principal e único alimento da camada mais pobre da população. O açaí pasteurizado está livre dessa contaminação, devido à não sobrevivência do parasita a temperaturas acima de 60°C (REIS, 2007; PASSOS, 2010; AGUIAR et al., 2013).

O recorrente manuseio, durante a cadeia de comercialização dos frutos do açaizeiro, e o acondicionamento desses frutos em paneiros que permitem o contato direto do fruto com superfícies contaminadas, como o trapiche e o chão dos barcos, elevam a perecibilidade dessa matriz. Quando a mesma não é submetida a processos de conservação, tem a vida de prateleira muito curta, no máximo 12 horas, mesmo sob refrigeração (ROGEZ, 2000; POMPEU et al., 2009).

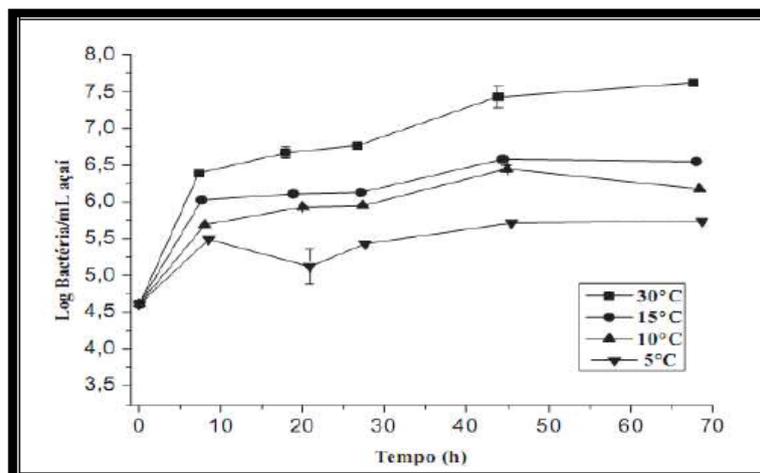
Em meios tropicais muito úmidos e quentes, em que a palmeira do açaí cresce, há uma contribuição para o crescimento de microrganismos e de insetos. Os bolores e as leveduras estão presentes, naturalmente, na superfície dos frutos, enquanto as contaminações por coliformes fecais, salmonelas e outros micro-organismos patogênicos, correm em função do manuseio inadequado (ROGEZ, 2000).

Segundo Rogez et al. (2012), os frutos do açaizeiro apresentam uma carga microbiana inicial alta, tanto em bactérias mesófilas totais ($\approx 10^5$ UFC/g de polpa seca) quanto em bolores e leveduras ($\approx 10^4$ UFC/g de polpa seca). Em 48 horas de armazenagem, à temperatura ambiente da região ($\approx 30^\circ\text{C}$), esses microrganismos aumentam de dois ciclos logarítmicos, enquanto 40% das antocianinas presentes são oxidadas (média de 660 mg / kg de frutos na coleta contra 380 mg após 48 horas). Concomitantemente, há o ressecamento dos frutos, e a polpa se adere mais ao caroço, provocando uma perda de rendimento no despulpamento.

Vários trabalhos relatam a contaminação microbiológica do açaí comercializado na cidade de Belém – PA (VELOSO; SANTOS, 1994; COROA et al., 1995; BUXANT et al., 1997). Segundo Rogez (2000) o branqueamento do fruto, associado a outras etapas do processamento, diminui consideravelmente a carga microbiana do açaí.

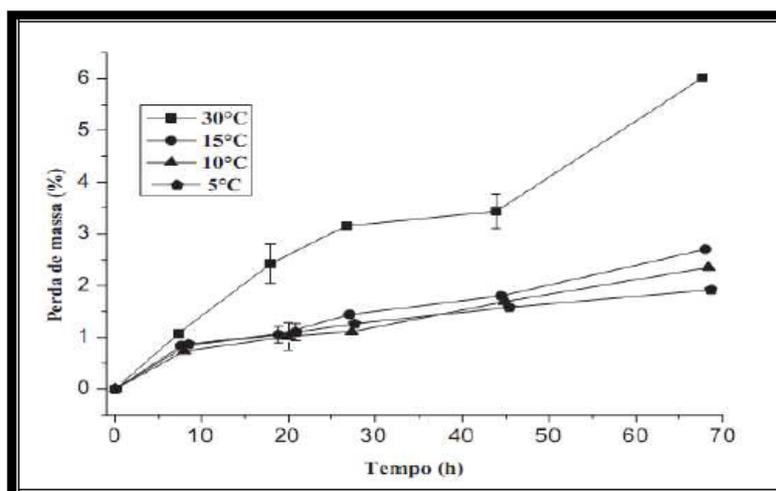
Pompeu et al., (2009) constataram uma influência direta ($p < 0,001$) do tempo e da temperatura de armazenamento sobre o crescimento de bactérias mesófilas e a perda de massa dos frutos, como mostram as Figuras 7 e 8.

Figura 7: Evolução das bactérias mesófilas totais em função do tempo e temperatura de armazenamento dos frutos do açaizeiro.



Fonte: Pompeu et al. (2009).

Figura 8: Perda de massa dos frutos do açaizeiro em função do tempo e temperatura de armazenamento.



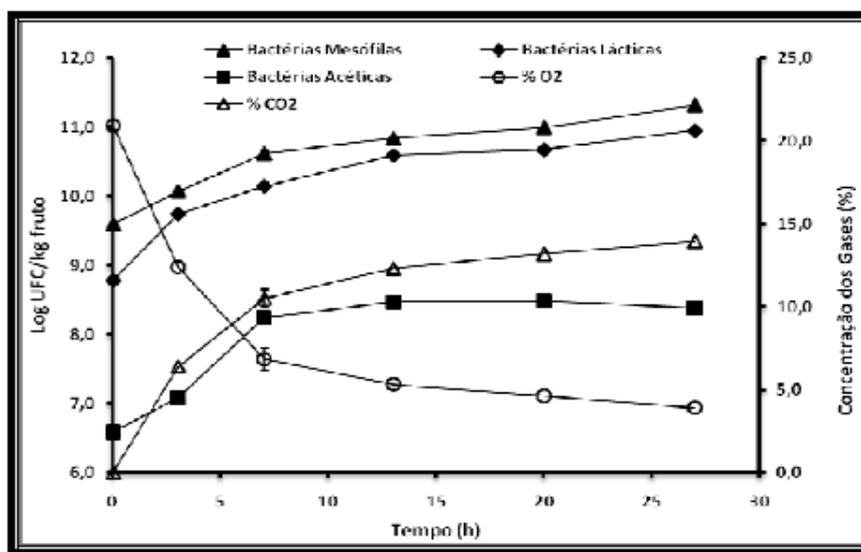
Fonte: Pompeu et al. (2009).

O transporte do fruto até os municípios que o processam, pode ser, em determinadas situações, hidroviário e rodoviário. Porém, geralmente, o transporte hidroviário é o mais habitual. O tempo máximo desse ciclo pode chegar a 27 horas. O acondicionamento e o tempo durante essa etapa de transporte estão diretamente ligados à qualidade nutricional e sensorial dos frutos de *E. oleracea*, se acordo os com estudos de Aguiar et al. (2013).

Aguiar (2010) quantificou, para frutos de Abaetetuba-Pará, o crescimento de bactérias mesófilas, lácticas e acéticas, quando simulava as condições de transporte do

fruto, em caixas abertas (na proa das embarcações) e em ambientes fechados (no porão dos barcos). O autor relata um processo de fermentação espontânea em ambas as condições, porém, no condicionamento em microaerobiose, há um favorecimento para a proliferação de bactérias lácticas, como mostra a Figura 9.

Figura 9: Evolução da carga bacteriana fermentativa dos frutos do açaizeiro acondicionados em caixas fechadas e as concentrações de O₂ e CO₂.



Fonte: Aguiar (2010).

2.4 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

No que diz respeito as análises dos compostos orgânicos voláteis (COVs) pode-se, de forma geral, dizer que o procedimento para análise e/ou obtenção de óleos essenciais, aromas e frações voláteis, envolve duas etapas: a extração e a análise. A composição da fração volátil pode ser diferente, dependendo do método de extração selecionado, sendo ideais para o estudo de ecologia química, técnicas de extração que se aproximem do real perfil químico encontrado no vegetal (STASHENKO et al., 2004).

O isolamento das substâncias voláteis de uma matriz complexa é uma fase crucial na pesquisa de compostos voláteis, a fim de eliminar interferentes e ajustar a concentração acima do limite detectável pelos instrumentos (FRANCO; JANZANTTI, 2004). Neste contexto, diversos trabalhos abordaram o desenvolvimento de métodos para extração desses compostos em alimentos (PARLAMENT, 1997; VARMINING et al., 2004; KAFKAS et al., 2005).

As principais técnicas aplicadas para esse fim dividem-se em dois grupos. O grupo das análises totais, que envolve a análise de todas as substâncias presentes na matriz alimentícia, e o grupo das análises do *headspace* (HS) da amostra, que compreende a análise das substâncias presentes na fase gasosa em equilíbrio sobre a amostra. Ao primeiro grupo pertencem as técnicas de extração líquido-líquido, extração em fase sólida (SPE), destilação por vapor e destilação seguida pela SPE. A outra abordagem, que envolve as análises do HS “estático” ou “dinâmico”, tem sido aplicada com maior frequência por possibilitar uma representação mais fidedigna da percepção do olfato (FRANCO; JANZANTTI, 2004).

Técnicas de isolamento de voláteis em alimentos que careçam de vácuo, aquecimento, destilação ou uso de solventes, como o caso das análises totais, são problemáticas por possibilitarem a degradação dos compostos voláteis e a existência de artefatos, bem como podem sofrer influência da composição da matriz, principalmente água, lipídios e proteína (REINECCIUS, 2006).

Varming et al. (2004) e Kafkas et al. (2005) realizaram a comparação entre métodos de extração com solventes e análise do HS, e relataram vantagens do último com relação ao primeiro método, indicando o uso do HS para o isolamento de compostos voláteis de frutas, já que esse propicia a extração de ésteres com notas frutais.

2.4.1 Headspace – Microextração em Fase Sólida (HS-SPME)

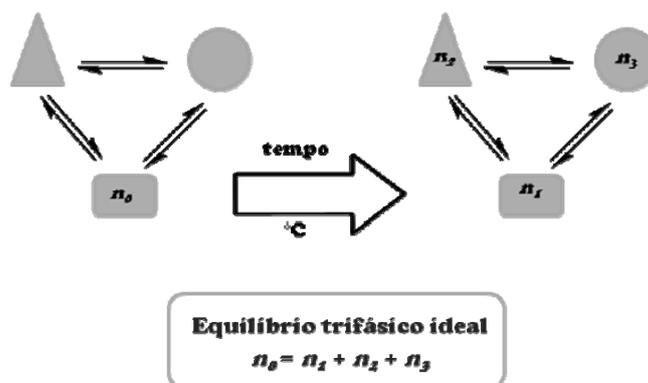
Existem dois tipos de HS: estático e dinâmico. O primeiro pode realizar a análise diretamente no HS da matriz, por injeção direta do ar confinado ou por técnicas de concentração dos voláteis em sorventes, como a microextração em fase sólida (SPME) (PAWLISZYN, 1990; KOLB, 1999). Já no HS dinâmico os sistemas confinados são varridos com um gás inerte ou succionados para dentro de uma “armadilha” com polímeros sorventes (THOMAZINI; FRANCO, 2000).

Dentre as diferentes técnicas de extração dos compostos voláteis, a que envolve SPME apresenta algumas vantagens, como: a facilidade de extração de compostos voláteis, rapidez, a dispensa o uso de solventes, utilização pequeno volume de amostra, além de apresentar alta sensibilidade e baixo custo (PAWLISZYN et al., 1992; KATAOKA et al., 2000). A análise dos voláteis por SPME no HS baseia-se na sorção dos analitos presentes no HS da amostra, por uma fase extratora imobilizada na

superfície de uma fibra de sílica fundida e posterior, dessorção no cromatógrafo a gás (AUGUSTO; VALENTE, 2002).

A técnica é baseada no fenômeno de partição (ou ainda a adsorção, em caso de uso de sólidos adsorventes como, por exemplo, o Carboxen) do analito entre a sua matriz, e esta última matriz sintética sendo denominada “fibra” (VALENTE; AUGUSTO, 2000). A teoria se baseia na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve a partição entre elas (Figura 10). Em um sistema HS-SPME, tem-se a extração viabilizada por um equilíbrio trifásico, estabelecido numa microescala: *matriz-headspace-fibra*.

Figura 10: Representação gráfica do princípio de equilíbrio termodinâmico trifásico.



Fonte: Pavarini (2011).

As fibras de SPME imobilizam uma fase extratora. Essa fase deve ser constituída de um polímero de polaridade compatível ao do analito em estudo. Estes polímeros que recobrem as fibras de sílica fundida resolvem um problema corriqueiro, que ocorre na extração em micro escala, que é a recuperação da fase extratora de dentro do seio da matriz. Com os polímeros imobilizados na fibra de sílica fundida, a recuperação da fase extratora ocorre sem grandes problemas e com a possibilidade de utilizar a fase repetidas vezes (PAVARINI, 2011).

As fibras são recobertas com fase polimérica líquida ou com uma fase sólida porosa (mais exatamente, polímeros sólidos dispersos em uma matriz líquida). Para fases poliméricas líquidas, assim como o polidimetilsiloxano (PDMS) e o poliacrilato, o mecanismo físico-químico responsável pela extração é a partição. Quando sólidos porosos recobrem a fase líquida, as fibras são chamadas mistas, assim como Divinilbenzeno-PDMS (DVB-PDMS), Carboxen/PDMS (CAR/PDMS) e Carbowax-

DVB (CW-DVB). Neste caso o processo também envolve, principalmente, a adsorção dos analitos (AUGUSTO; VALENTE, 2002). A Tabela 3 apresenta os revestimentos de fibra de SPME disponíveis comercialmente e algumas aplicações.

Tabela 3. Exemplos de revestimentos de fibra de SPME disponíveis comercialmente e suas aplicações. Fonte: Supelco (2012).

Revestimento	Espessura (μL)	Aplicação
PDMS*	7, 30 e 100	Compostos apolares
Poliacrilato	85	Compostos de média e alta polaridade (fenóis, cetonas, álcoois)
PDMS/ DVB**	60 e 65	Compostos de baixa e alta polaridade (aminas e compostos nitroaromáticos)
CAR/PDMS***	75	Hidrocarbonetos, Compostos orgânicos voláteis (COVs)
CW/DVB	65	Compostos de alta e média polaridade (fenóis, cetonas e álcoois)
DVB/CAR/ PDMS****	30 e 50	Compostos de aromas

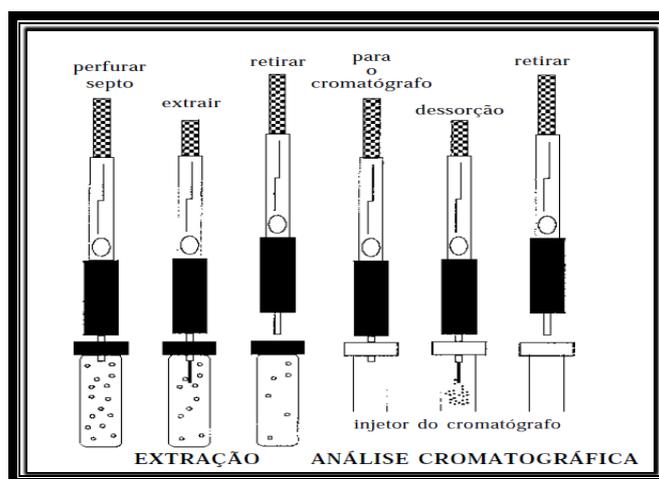
*Polidimetilsiloxano; **Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno; ***Carboxen/Polidimetilsiloxano; ****Divinilbenzeno/ Carboxen/ Polidimetilsiloxano. Fonte: Shirey (2012).

A gama de polaridades dos revestimentos disponíveis oferece vantagens como seletividade, possibilidade de maior recuperação de analitos específicos e redução da extração de interferentes. As fibras mistas, por apresentarem subcamadas com diferentes polaridades, têm papel importante na seletividade no que se refere à extração de analitos com pequenas diferenças de polaridades. Além da polaridade, os revestimentos das fibras ainda podem ser classificados como polímeros puros homogêneos, tais como as fibras de PDMS e poliácrlato ou como polímeros sólidos dispersos em uma matriz polimérica líquida (fibras mistas), que são os de dupla ou tripla camada, tais como: CAR-DVB, PDMS-DVB, CW-DVB e DVB-PDMS (DEMYTTENAERE et al., 2004;

CEVA-ANTUNES, 2006; SEERAM et al., 2006). Os polímeros heterogêneos apresentam menor estabilidade mecânica que as fases poliméricas homogêneas, mas ganham em seletividade, embora essas mesmas fases na nova versão (StableFlex) tenham aprimorado suas propriedades mecânicas (SIGMA-ALDRICH, 2005).

A SPME e a posterior dessorção da fibra no GC estão ilustradas na Figura 11. Nela pode ser visualizado que o processo de extração inicia-se quando a agulha do suporte de SPME (*holder*), com a fibra retraída, perfura o septo do frasco que contém a amostra. Posteriormente, a fibra é exposta no HS da amostra para que ocorra a extração. Percorrido o tempo de extração, a fibra é recolhida na agulha e, imediatamente, inserida no injetor do GC, onde a fibra é exposta para a dessorção térmica. Terminada a dessorção, a fibra é novamente retraída e retira-se o *holder* (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Figura 11: Processo de microextração em fase sólida e dessorção da fibra em cromatógrafo gasoso.



Fonte: Valente e Augusto (2000).

Vários fatores influenciam a SPME, sendo fundamental o estudo das melhores condições de extração para cada tipo de amostra e análise desejada. Entre esses fatores pode-se citar: volume da amostra e do frasco de extração, tipo de amostra e de fibra, força iônica do meio, agitação, tempo e temperatura de extração (OLIVEIRA et al., 2007; PINO; QUERIS, 2011; RIU-AUMATELL et al., 2011; PINO; BENT, 2013).

A microextração em fase sólida está sendo cada vez mais utilizada no isolamento e concentração dos COVs em estudos que visam a determinação do perfil volátil em frutas. Isto se deve, não só às vantagens da técnica, como também ao

aumento da disponibilidade e variedade de fibras comerciais de SPME (APREA, et al., 2011; PINO; BENT, 2013).

2.4.2 Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)

A análise dos COVs tem sido realizada principalmente através da técnica de GC acoplada a detectores que utilizam detecção por ionização em chama (DIC), espectrometria de massa (MS) e detecção espectrométrica por absorção no infravermelho (IR) e outros (BONATO, 2006). Esses instrumentos são os mais requeridos para análise desses compostos por possuírem alta resolução e eficiência, possibilitando obter informações quanti e qualitativas (FRANCO; JANZANTTI, 2004).

A escolha das condições cromatográficas deve ser criteriosamente analisada, pois deve ser considerada as particularidades de cada amostra e suprir as necessidades específicas do objetivo do estudo. Uma escolha bastante importante se refere ao detector a ser utilizado, quando deve ser levado em consideração o tipo de resultado que se deseja (qualitativo ou quantitativo) e o tipo de analito que se quer analisar, podendo o detector ser específico para um determinado composto ou englobar um maior número de substâncias (GARRUTI et al. 2003; REID, 2003; WAGNER, 2008).

O MS atua como detector universal, sendo amplamente utilizado na pesquisa qualitativa de voláteis como a mais importante ferramenta de identificação desses compostos, pois, além de fornecer ótima resposta, é considerado um instrumento mais barato e mais rápido que os demais utilizados para este fim, como o de infravermelho próximo e de ressonância magnética nuclear (GARRUTI, 2001). Além disso, o espectrômetro de massas oferece a opção de escolha entre o modo operacional de varredura SCAN, que coleta espectros para todos os compostos eluídos da coluna, e o sistema operacional em modo SIM, que possibilita o aumento da sensibilidade e especificidade da análise quando o composto a ser determinado já é conhecido (REID, 2003).

A identificação dos compostos voláteis por MS é realizada pela análise do espectro de massas que representa o conteúdo de espécies iônicas característico de cada substância. Essas espécies são formadas quando as moléculas eluídas da coluna cromatográfica são ionizadas (geralmente por impacto eletrônico a 70 eV), produzindo íons e fragmentos íons em uma região de alto vácuo (10^{-8} atm). Estes passam por um

analisador de massa/carga (m/z) e, então, chegam ao detector gerando um sinal expresso em forma de espectro (GARRUTI, 2001).

Para a devida identificação dos compostos voláteis presentes na amostra, além da comparação dos espectros de massas do analito com uma biblioteca usando um programa de computador, também se utiliza a comparação dos Índices de Kovatz calculados para as substâncias detectadas com os de padrões ou dados da literatura para a mesma fase estacionária (JENNINGS; SHIBAMOTO, 1980).

Na literatura encontram-se vários trabalhos que empregaram, com sucesso, a combinação das técnicas de HS-SPME e análise com GC-MS para caracterizar adequadamente os compostos voláteis presentes em diversos alimentos, incluindo as frutas e derivados (REZENDE, et al. 2003; RIU-AUMATELL et al., 2004; YANG et al, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATRIZ ALIMENTÍCIA

Frutos maduros de *E. oleracea* provenientes da Ilha do Combú (Belém, PA), Murinin (Benevides, PA), e da Ilha do Campumpema (Abaetetuba, PA), foram utilizados. Os mesmos foram transportados, a temperatura ambiente, até o Laboratório de Compostos Bioativos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, onde foram submetidos à fermentação espontânea e/ou armazenados, de acordo com as necessidades do estudo. O tempo total entre a colheita e a chegada ao laboratório variou de 3 horas (Combú e Benevides) a 12 horas (Abaetetuba).

3.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO HS-SPME

Na etapa de otimização do método HS-SPME foram utilizados os frutos provenientes da Ilha do Combú. Para o desenvolvimento do método de extração foi realizada otimização univariada em função do tempo de exposição da fibra (30, 40 ou 50 min) e do tipo de fibra híbrida (CAR/PDMS ou PDMS/DVB). A temperatura do banho foi fixada em 33°C, o tempo em 10 min e a massa da polpa de açaí (Figura 12) em 500 mg. O volume do vail utilizado foi de 10 mL. Para ser vedado de maneira eficiente, utilizou-se um Crimp magnético de 8 mm de furo central, e septo preto Niton com 22 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. O tempo de dessorção da fibra, no equipamento, foi de 4 min, de acordo com Pavarini (2011).

Figura 12: Despulpamento do fruto de *E. oleracea* para extração dos COVs.



Fonte: Arquivo pessoal.

A fibra CAR/PDMS apresentou comportamento mais adequado às necessidades do estudo, porém, alguns sinais de detecção, como do ácido acético, produto da fermentação espontânea do fruto, foi pouco intenso. Dessa maneira, aumentou-se a massa da polpa de açaí em 30% (650 mg) e 50% (750 mg) em relação ao valor inicial fixado, com o objetivo de aumentar a intensidade desses sinais. A massa de 650 mg apresentou melhor comportamento, e ficou definida para o método.

Diante do perfil de maior polaridade dos compostos observados até esta etapa, foi necessário analisar o comportamento da fibra poliacrilato, para a extração dos analitos, nas mesmas condições de análise da CAR/PDMS, fixadas até o momento. Contudo, a CAR/PDMS prevaleceu como a melhor extratora dos COVs produzidos durante o condicionamento da polpa dos frutos de açaizeiro.

Em busca de sinais mais intensos, e o alcance do equilíbrio termodinâmico no HS sendo favorecido em temperaturas mais elevadas, foi avaliado o comportamento da CAR/PDMS segundo as variáveis tempo (5, 10, 20 e 30 min) e temperatura (50 e 60 °C) de condicionamento. Além disso, foi adicionado à amostra 10% de água ultrapura, em relação à sua massa, para que a mesma pudesse funcionar como um homogenato para o meio, e que ainda favorecesse a proliferação dos micro-organismos. Enfim, a temperatura do banho foi fixada em 50°C, por 30 min. Dessa maneira, o processo de extração foi otimização com os dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Condições otimizadas para extração dos COVs.

Variáveis	
Massa da polpa	650mg
Fibra extratora	CAR/PDMS*
Tempo de exposição da fibra	30 min
Temperatura e tempo de banho	50°C/30 min
Tempo de dessorção da fibra	4 min

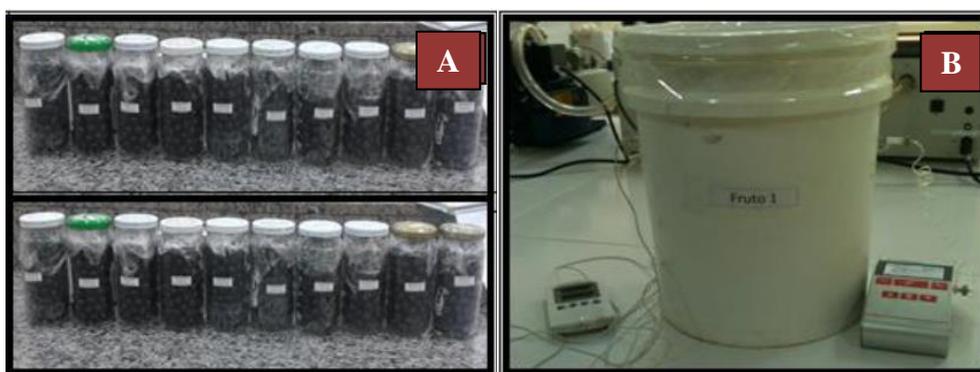
* Carboxen/ Polidimetilsiloxano.

3.3 ETAPA DE FERMENTAÇÃO

3.3.1. Frutos de *Euterpe oleracea*

O processo de fermentação espontânea foi acompanhado em recipientes de vidro, com 200 g de frutos (Figura 18A), e em recipiente de polietileno (PE), com 18 kg de frutos, em condições microaerófilas (Figura 18B), no Laboratório de Compostos Bioativos. Os frutos analisados foram procedentes do Murinin e da Ilha do Campumpema, com o objetivo de analisar os COVs produzidos na fermentação, de acordo com a procedência. Ambos foram analisados nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 horas de acondicionamento no recipiente de vidro, com duplicatas nos tempos 0 e 20, e triplicata no tempo 10. Durante a cinética de fermentação, temperatura, umidade e taxa respiratória do material foram determinados, através do Termo-Higrometro Digital (Paulínia, Brasil) e do analisador de gases - CheckPoint II, O₂/CO₂ (PBI Dansensor, Dinamarca), respectivamente, no recipiente de PE.

Figura 13: Fermentação espontânea de frutos de açaí em recipiente de vidro (A) e em recipiente de PE (B), em condição microaerófila.



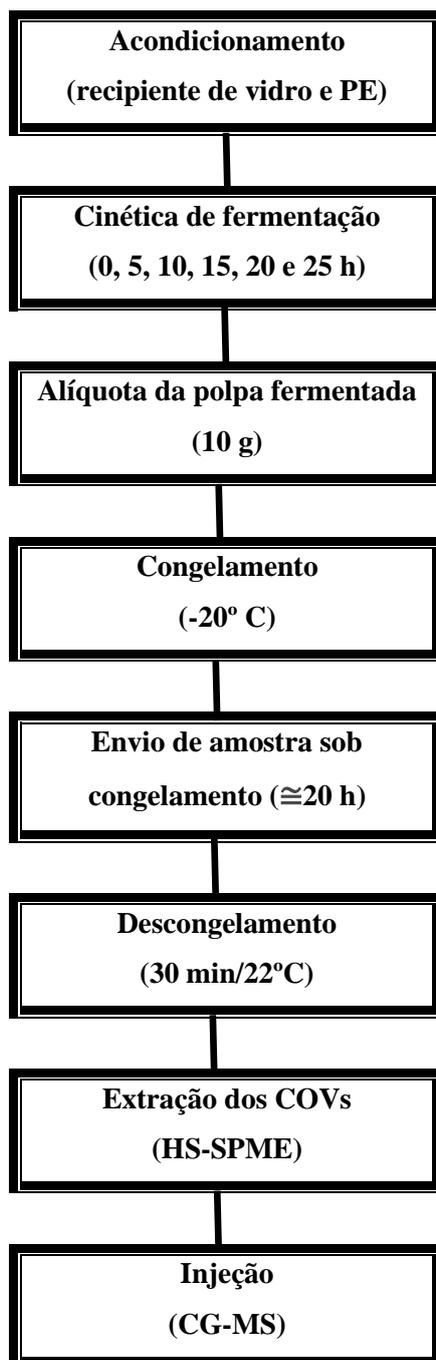
Fonte: Arquivo pessoal.

Em cada ponto da cinética, alíquotas de 10g de frutos foram retiradas do recipiente de vidro, e congelados a -20°C. Os frutos coletados foram enviados, por transporte aéreo, sob congelamento, para o Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. O tempo médio do deslocamento foi de 20h.

Para análise dos COVs, os frutos foram mantidos por 30 min a 22°C, para que a microbiota presente pudesse voltar as suas atividades metabólicas normais. Após o

descongelamento da amostra, os frutos foram despolpados, e a polpa foi submetida às condições de extração descritas na Tabela 5, com o método HS-SPME otimizado. As etapas de preparo, extração e injeção das amostras estão descritas na Figura 13.

Figura 14: Etapas de preparo da polpa de *E. oleracea* fermentada, e extração das substâncias voláteis produzidas durante o processo fermentativo, para posterior análise por GC-MS.



3.3.2 Identificação e quantificação dos produtos voláteis da fermentação

O perfil dos compostos voláteis produzidos durante a etapa de fermentação espontânea do açaí foi determinado segundo metodologia descrita por Aguiar et al. 2013, com adaptações, para um Sistema de Cromatografia Gasosa acoplada em Espectrômetro de Massas (CG-EM) Shimadzu QP2010. O sistema operou em Ionização por Elétrons (IE) (250°C; 70 eV), equipado com injetor no modo *scan* (240°C) com razão 1:10 e 1:100, de acordo com o limite de detecção das substâncias em cada amostra. A coluna utilizada foi a ZB-Wax (60m x 0,25mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme de polietileno glicol), empregando Hélio (99,999% de pureza, Linde Gás LTDA) como gás de arraste, com fluxo na coluna de 1,33 mL/min, pressão de 81,5kPa e aquecimento com rampa de temperatura de 120 à 160 °C, com taxa de 6°C/min, seguindo até 220°C com taxa de 10°C/min e mantida por esta temperatura por 2 min. Os espectros de massa foram obtidos através da aquisição no intervalo de tempo 0,30 scan/s de m/z 25 a 200 a partir de 2,5 até 28 min.

A identificação dos sinais apresentados nos cromatogramas foi realizada inicialmente por comparação dos espectros de massas obtidos por IE, com os espectros do banco de dados espectrais Willey 7, NIST 62 e FFNSC ver. 1.3. Os dados forneceram informações indicativas para a maioria dos compostos, sendo conclusivas para as demais. A identidade apontada neste primeiro passo foi comparada com o índice de retenção relativa (IRR), determinado pela equação de Kovatz (Equação 1) a partir dos tempos de retenção de cada *n*-alcano da série homóloga, que foi injetada no cromatógrafo gasoso, por via úmida, utilizando o mesmo método de operação das amostras. Os IRR foram comparados com os descritos por Inczedy et al. (1998), Audino et al. (2007) e IUPAC (2013). Baseando-se em dados que se confirmaram entre estes dois procedimentos foi estabelecida a identificação de compostos com espectros de massas que constam nas bibliotecas.

$$IRR = 100n + 100n \left(\frac{\log t_{Rx} - \log t_{Rz}}{\log t_{R(z+1)} - \log t_{Rz}} \right) \quad \text{Eq. (1)}$$

Na equação de Kovatz, “*n*” é o número de carbonos do *n*-alcano com o tempo de retenção (t_{Rz}) invariavelmente anterior ao do analito (t_{Rx}), enquanto t_{Rz+1} é o tempo de retenção do *n*-alcano eluído da coluna invariavelmente logo após o analito.

3.3.3 Determinação dos percentuais relativos dos analitos

A área de cada sinal nos cromatogramas gerados durante as análises por GC-MS foi determinada através do software LabSolution GC-MS (Tokyo, Japão). A integração dos sinais foi estabelecida seguindo os parâmetros físicos descritos na Tabela 5. Essa operação foi realizada através do software do cromatógrafo visando à edição dos sinais relativos aos compostos de interesse. Estas condições foram estabelecidas de forma empírica a partir da avaliação dos efeitos de sua manipulação sobre os dados qualitativos. Elas representam o ponto de corte (*cut off*) ideal para análise qualitativa dos níveis de metabólitos de interesse do estudo, em detrimento dos componentes denominados “traços”.

Tabela 5. Parâmetros físicos utilizados na integração dos sinais cromatográficos.

Slope	10000/min
Width	2s
Drift	0/min
T. dbl	1000 min
Min area-height	200.000

3.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados apresentados através de médias, e seu respectivo desvio padrão, foram analisados pelo software Microsoft Office Excel sob Windows Vista 2010.

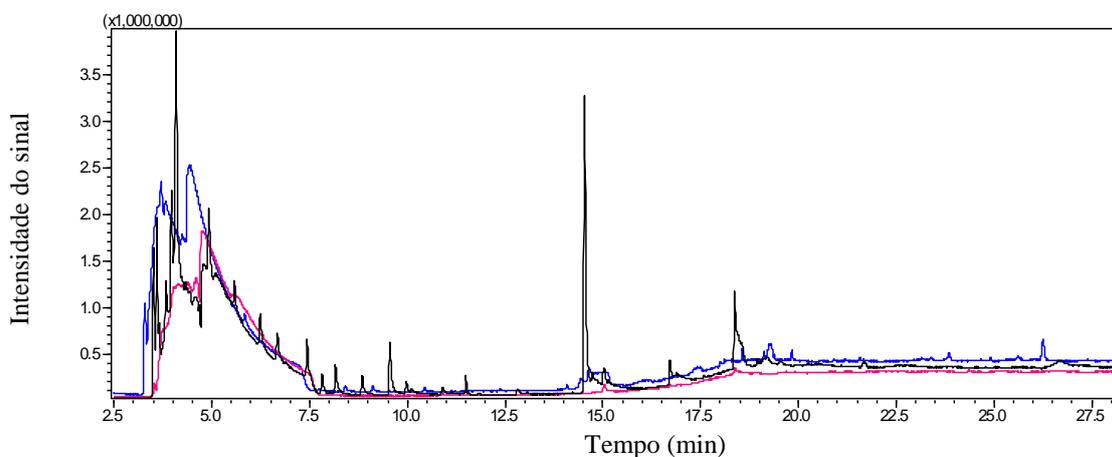
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE HS-SPME

O primeiro cromatograma obtido durante a análise univariável dos parâmetros de extração por HS-SPME foi determinante para escolha da fibra a ser utilizada no método de extração dos COVs, como mostra a Figura 15. Apesar de não apresentar um delineamento ideal, a comparação entre os cromatogramas apresenta a fibra híbrida CAR-PDMS tendo melhor afinidade com as substâncias em HS, adsorvendo um maior número de substâncias, inerentes à fermentação espontânea da polpa de açaí. O tempo de exposição da fibra, no HS, para adsorção dos compostos, foi mais satisfatório em 30 min, do que nos tempos 10 e 20 min. Ou seja, o equilíbrio trifásico termodinâmico, entre matriz-headspace-fibra, aconteceu a partir desse tempo de exposição da fibra.

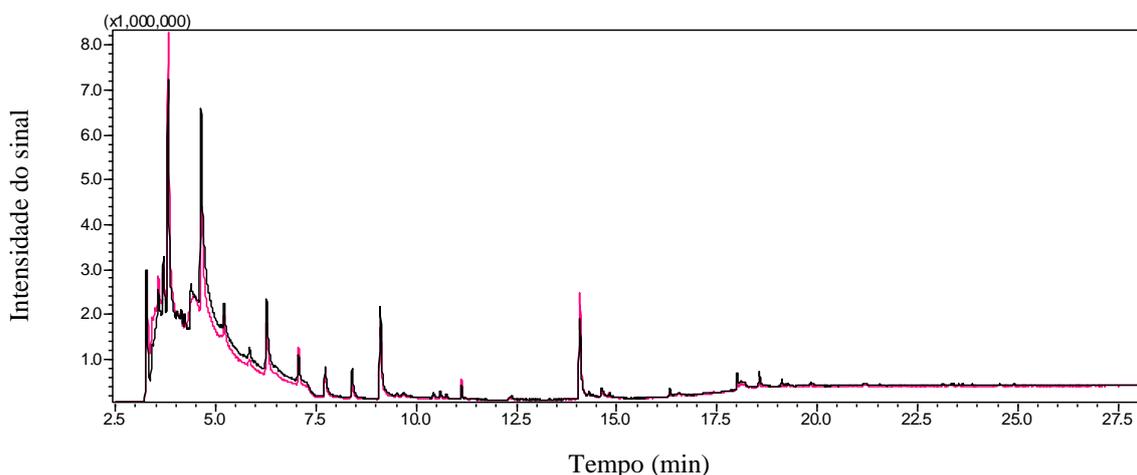
A literatura demonstra que o tipo de fibra utilizado determina diferenças qualitativas e quantitativas nos perfis de voláteis obtidos via SPME. No trabalho realizado por Pinho et al. (2006) foram comparadas as fibras poliacrilato, PDMS e CAR-PDMS, sendo que esta última fibra extraiu o maior número de compostos com a maior intensidade de sinal, totalizando 103 compostos extraídos, frente a 62 da fibra de poliacrilato e 77 pela PDMS. A melhor performance da fibra CAR-PDMS é atribuída ao efeito mútuo de adsorção e distribuição de sua fase estacionária.

Figura 15: Comparação dos cromatogramas obtidos com as fibras CAR/PDMS (preto), Poliacrilato (azul) e PDMS/DVB (rosa), em CG-MS.



Após a definição da fibra e do seu tempo de exposição para a extração dos COVs, foi realizado um ensaio com o aumento de massa da polpa de açaí (M1 - 650 mg e M2 - 750 mg), no HS, ansiando sinais mais intensos para alguns compostos que caracterizam a fermentação espontânea do fruto, como o ácido acético, relatada por Aguiar et al. (2013). A massa foi determinada em função da quantidade máxima possível de material a ser analisado sem comprometer o limite de detecção do espectrômetro de massas, e que fornecesse a melhor resolução dos sinais. Dessa maneira, manteve-se a massa de 650mg, como a mais adequada para análise dos COVs, neste trabalho (Figura 16).

Figura 16: Comparação dos cromatogramas obtidos com M1 (650 mg; preta) e M2 (750 mg; rosa), em CG-MS.



No que diz respeito à viabilização da extração por um equilíbrio termodinâmico trifásico estabelecido entre matriz-*headspace*-fibra, e o seu equilíbrio sendo favorecido em temperaturas mais elevadas, a adsorção dos COVs foi satisfatória na condição de 50°C/30 min para exposição da fibra (Figura 17), não diferenciando muito do perfil de compostos apresentados pela extração na condição de 30 min à 60°C (Figura 18). Dessa maneira, levando-se em consideração custos inferiores de análise em temperaturas mais baixas, assim como a termolabilidade de alguns compostos de interesse, optou-se por trabalhar com o binômio 50°C/30 min.

Figura 17: Comparação dos cromatogramas obtidos no tempo de fermentação da polpa de 15h, em vail, com tempo de exposição da fibra por 5 (preto), 10 (rosa), 20 (azul), 30 min (marrom) a 50°C, em sistema CG-MS.

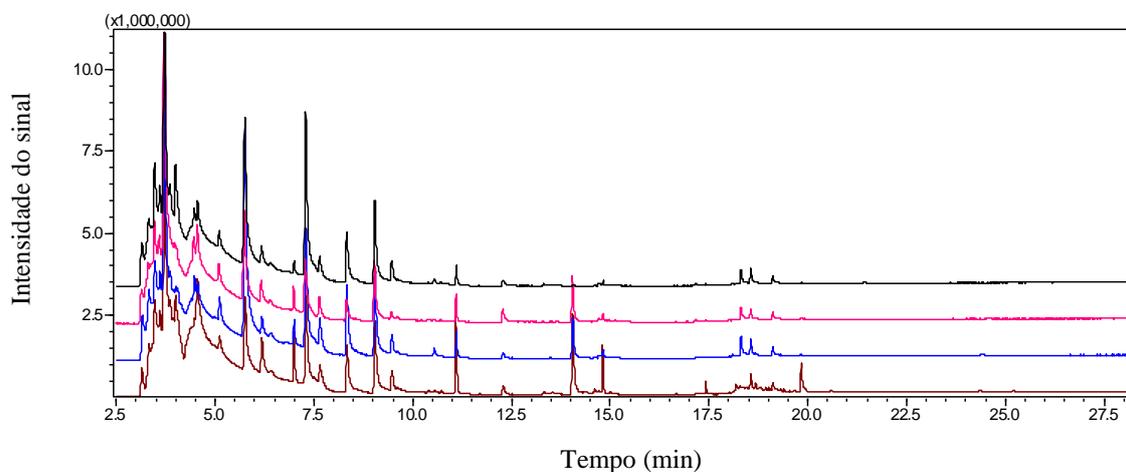
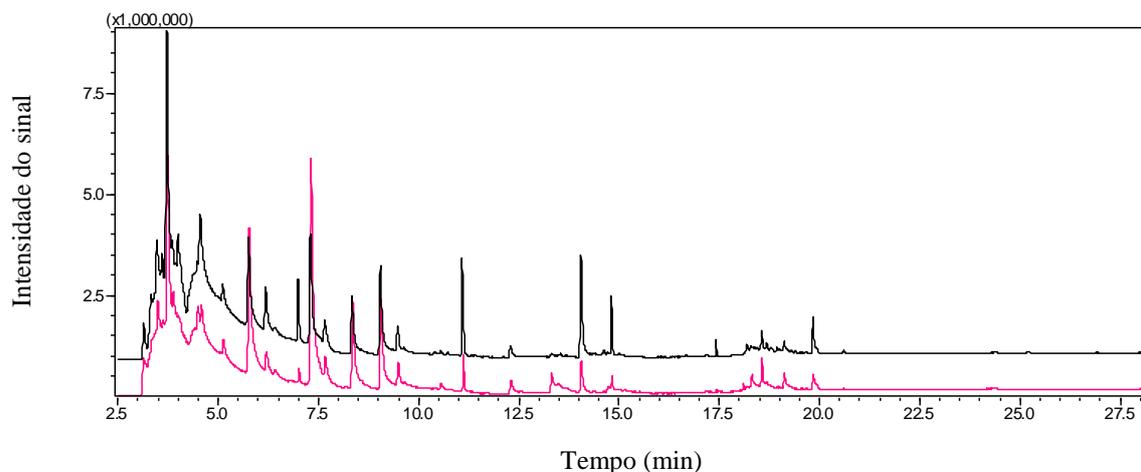


Figura 18: Comparação dos cromatogramas obtidos no tempo de fermentação da polpa de 15h, em vail, com exposição da fibra por 30 min a 50°C (preto) e 60°C (rosa), ambas por 30 minutos, em sistema CG-MS.



Manrique et al. (2006), investigando compostos voláteis de média e alta polaridade, produzidos pelas glândulas masternas de *Triatoma infestans*, analisou o comportamento de diversas fibras de SPME, e o perfil apresentado pela CAR/PDMS foi o mais adequado para os compostos em estudo.

Kolahgar et al. (2002) e Pinho et al. (2006) identificaram compostos entre ésteres, alcoois, ácidos e aromáticos carboxílicos, através de extração por HS-SPME, com a fibra CAR/PDMS e identificação por CG-MS, durante processo fermentativo da cerveja.

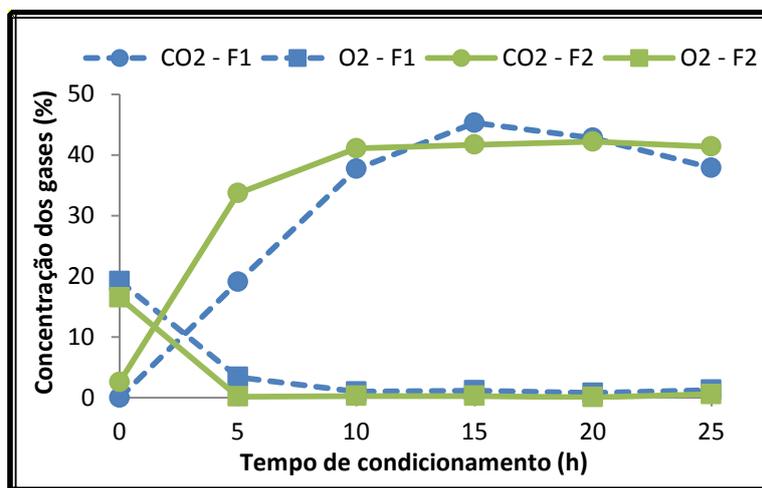
4.2 FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DOS FRUTOS DE *E. OLERACEA*

4.2.1 Concentração de gases, temperatura e umidade relativa

O processo de respiração é primordialmente um processo oxidativo, que aumenta os níveis de CO₂ e água, com a liberação de energia, principalmente na forma de ATP, sendo essa energia química requerida para a realização dos vários processos anabólicos e catabólicos dos frutos. Após a colheita este processo não é tão eficiente, uma vez que não é suprido pelo processo fotossintético. Então, o vegetal utiliza as matérias orgânicas acumuladas (carboidratos, proteínas, lipídeos) para obtenção de energia através do processo respiratório (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Durante o condicionamento dos frutos de açaí, foi possível constatar, a partir do ponto zero, um aumento nos níveis de CO₂ até 15 horas (Figura 19), e da UR até 10 horas, para F1, e até 5 horas para F2 (Figura 20). O aumento desses parâmetros, juntamente com o maior consumo de O₂ nesse mesmo intervalo de tempo, caracterizam o processo de respiração do fruto.

Figura 19: Concentração de O₂ e CO₂ (%) durante fermentação espontânea dos frutos de *E. oleracea*, provenientes de Benevides (F1) e Abaetetuba (F2).

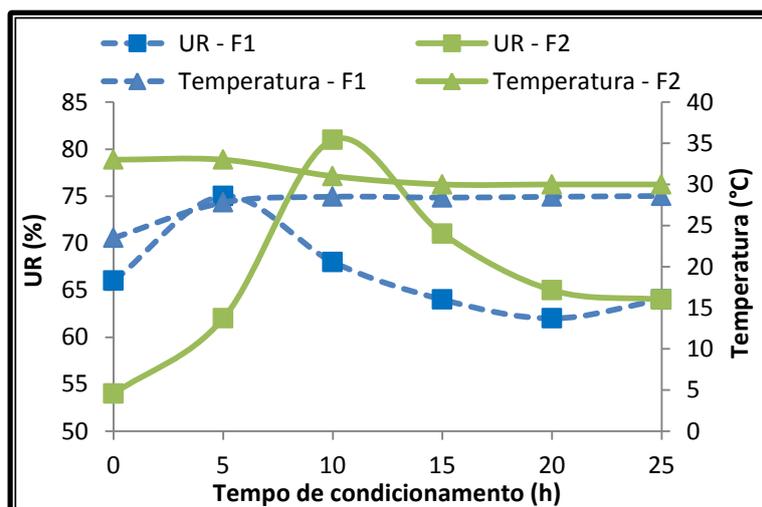


O teor de O₂ diminuiu drasticamente do ponto 0 até as 5 horas, permanecendo praticamente constante depois das 10 horas, para ambas as procedências, em função do processo de respiração estar concluído. Dessa forma, o ambiente microaeróbio ($\leq 10\%$ de O₂), com a produção de CO₂ pelos frutos, favorece o catabolismo dos açúcares pela via fermentativa das bactérias, produzindo compostos orgânicos característicos da

fermentação, como por exemplo, o etanol e os ácidos orgânicos (HASHIZUME, 2008). O acúmulo desses produtos ocorre, principalmente, em períodos prolongados de deficiência de O_2 (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os valores médios de temperatura e UR no ambiente de acondicionamento dos frutos foram de $27,7 \pm 2^\circ\text{C}$ e $66,6 \pm 5\%$, para F1, e $31,2 \pm 1^\circ\text{C}$ e $66,2 \pm 9\%$, para F2. Percebe-se uma tendência dos frutos a uma temperatura de equilíbrio em torno de 30°C (Figura 20). Nessas condições, torna-se viável o crescimento de bactérias psicrotróficas e mesófilas, que possuem temperatura ótima de crescimento entre $20\text{-}35^\circ\text{C}$ e $30\text{-}45^\circ\text{C}$, respectivamente. Leveduras têm um ótimo crescimento na faixa desses dois grupos de bactérias (JAY, 2005). Dessa maneira, o meio microaerófilo, de acondicionamento dos frutos, possuía fatores intrínsecos suficientes para proliferação microbiana.

Figura 20: Evolução da temperatura e da UR durante fermentação espontânea dos frutos de *E. oleracea*, provenientes de Benevides (F1) e Abaetetuba (F2).



Durante o processo fermentativo há liberação de energia através do metabolismo dos micro-organismos, e consequentemente, um aumento da temperatura do meio (JAY, 2005). Dessa maneira, o aumento da temperatura foi um dos parâmetros que caracterizou o meio fermentativo em F1. No entanto, em F2, observa-se um efeito contrário (Figura 20). Isso ocorreu, provavelmente, em função do tempo entre a colheita e início do experimento ter sido de, aproximadamente, 3 horas para F1 e 12 horas para F2. O maior tempo em F2 pode ter proporcionado o início do processo fermentativo antes dos frutos chegarem ao laboratório. Isso justifica também o fato da temperatura

inicial em F2 ser, aproximadamente, 10 °C mais elevada, que a temperatura inicial em F1.

4.2.2 Tipos de fermentação

Os tipos de processos fermentativos encontrados nesse trabalho foram caracterizados de acordo com os COVs encontrados no HS. As fermentações alcoólica e acética ocorreram em todas as polpas analisadas neste trabalho, fato este coerente com o acondicionamento, microaerófilo, em que foi acompanhado o processo de fermentação da polpa. Os espectros de massas que caracterizam esses dois processos fermentativos, apresentaram índice de similaridade de 98% com o espectro do etanol (Figura 21) e o do ácido acético (Figura 22). Aguiar et al. (2013) identificaram ambos os processos fermentativos, durante a fermentação espontânea de frutos de açaí, em caixas fechadas.

Figura 21: Sinal obtido por IE-MS, identificado como etanol.

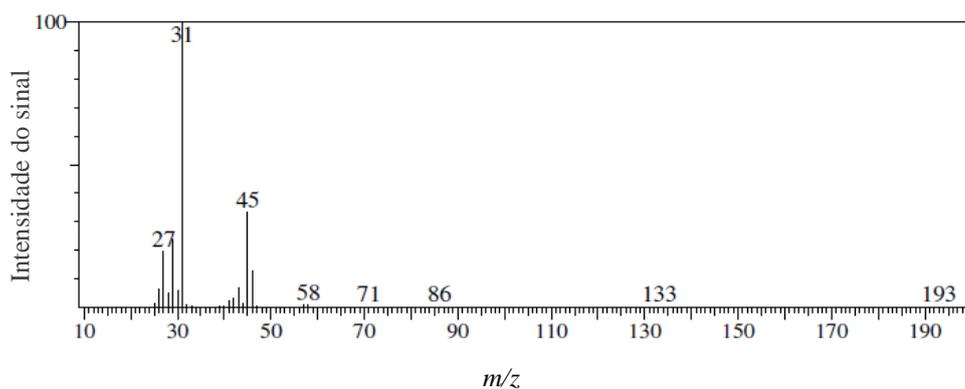
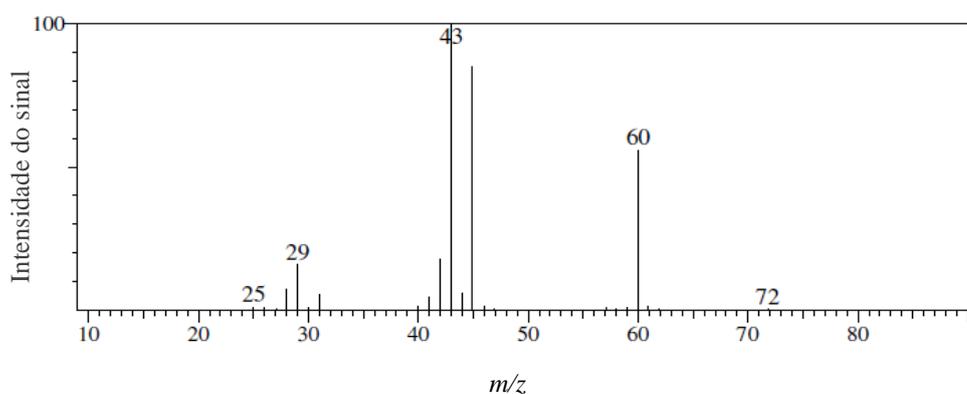
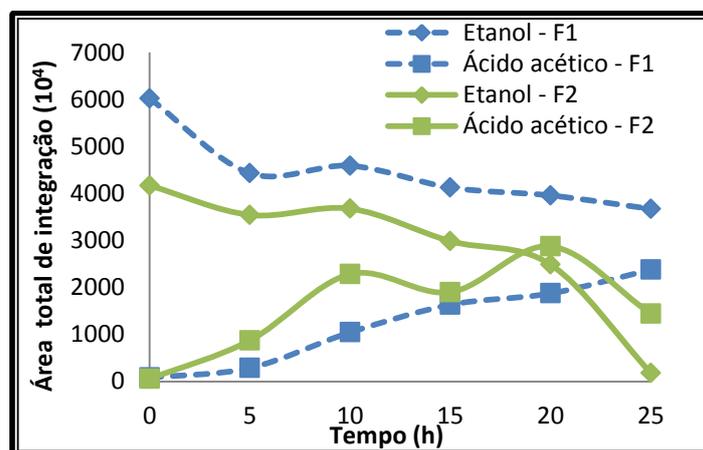


Figura 22: Sinal IE-MS identificado como ácido acético.



A produção de etanol foi a mais acentuada pela microbiota natural dos frutos, de ambas as procedências. Porém, ao longo do tempo, esse produto foi sendo consumido. A produção de ácido acético foi acumulativa no decorrer da cinética fermentativa, para F1, e mais intensa, às 20 horas, para F2, conforme ilustra a Figura 23. A relação inversamente proporcional desses dois produtos, ao longo do tempo, pode ser explicada em função da fermentação acética ser uma reação química que consiste na oxidação parcial de substratos de carbono, como o etanol. O resultado apresentado é coerente a um processo de fermentação espontânea, onde as bactérias acéticas terão sua atividade metabólica favorecida após a fermentação alcoólica pelas leveduras, disponibilizando o principal substrato para esse tipo de bactéria, o etanol (SOLEIRO; GIUDICI, 2009).

Figura 23: Evolução da produção do etanol e ácido acético ao longo da cinética de fermentação espontânea dos frutos de *E. oleracea*.



O ambiente microaerófilo, e a faixa de temperatura, entre 23,5 a 33°C, em que as amostras estavam durante o processo fermentativo, favoreceram a produção de etanol, pelas leveduras, as quais se encontram em grande quantidade nos frutos do açázeiro, conforme relata Rogez (2000). Esses micro-organismos possuem uma faixa ótima de desenvolvimento entre 15-35°C, sendo a temperatura mais importante do que a própria composição do alimento para o crescimento fúngico (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Além das leveduras, há contribuição das bactérias lácticas heterofermentativas e acéticas, na produção de pequenas quantidades de etanol, a partir da glicose e frutose, que estão presentes nos frutos de açaí (MASSAGUER, 2005; SABATINI et al., 2008; AGUIAR et al., 2013).

A identificação de outras substâncias, como o ácido capróico (hexanóico) e ácido isobutírico (2-metil propanóico), através dos espectros de massas apresentados

nas Figuras 24 e 25, apontam a ocorrência de outros processos fermentativos da polpa de açaí, como as fermentações capróica e malolática. Ácidos graxos de cadeia curta, ácido acético, propanóico, butírico, são subprodutos da fermentação por leveduras, embora a presença de ácido propanóico e butírico esteja associada com a intervenção de bactérias (RIBÉREAU-GAYON, 1998), que segundo Pompeu et al. (2009) e Aguiar et al. (2013) estão presentes naturalmente no açaí.

Figura 24: Sinal obtido por IE-MS, identificado como ácido capróico.

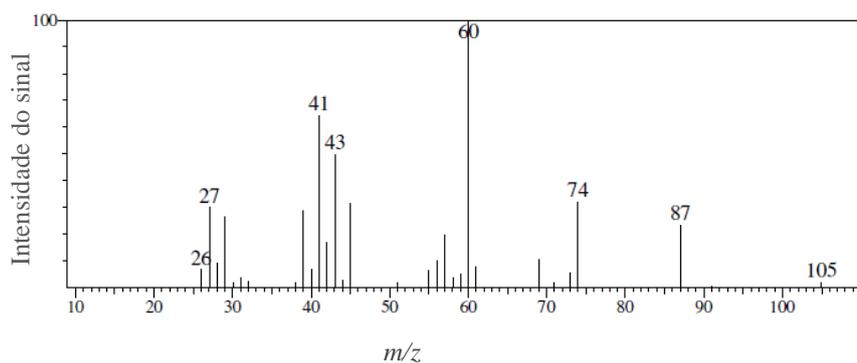
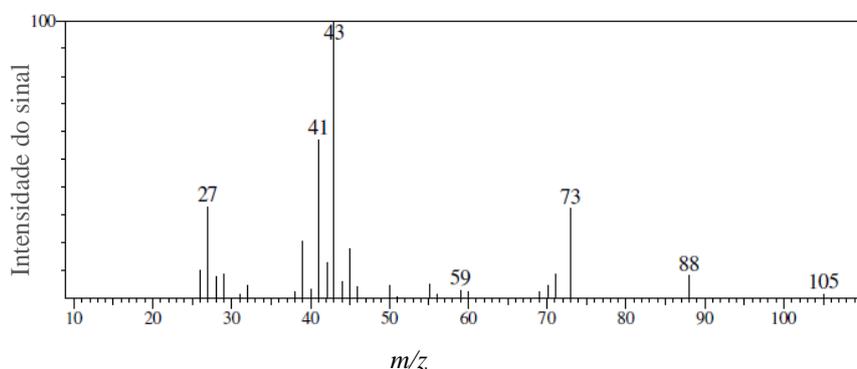


Figura 25: Sinal obtido por IE-MS, identificado como ácido isobutírico.



4.2.3 Compostos orgânicos voláteis (COVs)

Os COVs identificados foram distribuídos em 4 classes químicas, sendo 10 alcoóis, 4 aldeídos, 3 cetonas, e 6 ácidos carboxílicos. A maior área de integração total para cada substância, ao longo das 25 horas, pode ser visualizada na Tabela 6.

Tabela 6. Compostos orgânicos voláteis identificados ao longo das 25 horas da cinética de fermentação espontânea dos frutos de *E. oleracea*.

Substâncias	Amostra (área)		TR (min)	IS (%)	m/z
	F1	F2			
<i>Álcoois</i>					
Etanol	$6,02 \times 10^7$	$9,54 \times 10^8$	3,70	98	31
1-penten-3-ol	$1,87 \times 10^7$	$1,06 \times 10^7$	5,15	95	57
3-metil-1-butanol	$7,31 \times 10^7$	$5,17 \times 10^6$	5,75	95	57
3-metil-3-buten-1-ol	$1,35 \times 10^7$	$7,83 \times 10^5$	6,45	96	41
2-penten-1-ol	$6,21 \times 10^6$	$1,68 \times 10^6$	7,63	96	57
3-hexen-1-ol	$4,98 \times 10^7$	$2,10 \times 10^7$	9,02	98	41
2-hexen-1-ol	$1,15 \times 10^7$	-	9,45	96	57
2,3-Butanodiol	$6,77 \times 10^7$	-	13,30	98	45
Benzenemetanol	$4,53 \times 10^5$	$3,77 \times 10^5$	18,53	95	79
Benzenetanol	$4,51 \times 10^5$	-	19,1	96	91
<i>Aldeídos</i>					
Hexanal	$6,90 \times 10^7$	$4,00 \times 10^7$	4,58	95	44
2-Hexanal	$2,57 \times 10^7$	$1,12 \times 10^7$	6,16	96	81
Benzaldeído	$2,68 \times 10^5$	-	12,25	95	77
1-Dodecanal	$2,04 \times 10^5$	-	19,80	95	43
<i>Cetonas</i>					
2,3- butanodiona	$8,51 \times 10^6$	-	3,87	96	43
1-penten-3-ona	$1,55 \times 10^7$	$1,00 \times 10^7$	4,12	94	55
3-hidroxi-2-butanona	$5,50 \times 10^6$	$2,10 \times 10^6$	7,25	95	45
<i>Ácidos carboxílicos</i>					
Ácido fórmico	$7,48 \times 10^6$	$1,67 \times 10^6$	8,25	97	56,01
Ácido acético	$2,87 \times 10^7$	$7,50 \times 10^5$	10,3	98	43
Ácido malônico	$3,23 \times 10^6$	$2,39 \times 10^6$	11,09	95	73
Ácido isobutírico	$3,20 \times 10^5$	-	12,98	97	43
Ácido benzóico	$2,28 \times 10^5$	-	17,15	96	120
Ácido capróico	$1,13 \times 10^5$	-	17,97	94	60

TR: tempo de retenção; IS: índice de similaridade; F1: fruto fermentado procedente de Murinin; F2: fruto fermentado procedente da Ilha do Campumpema; m/z: relação massas/carga; - : abaixo do limite de detecção.

Nota-se a maior abundância dos álcoois e ácidos nos frutos fermentados, tanto em número, quanto em concentração relativa. A abundância de todas essas classes é bastante relatada por vários autores em estudos sobre o perfil de COVs em processo de fermentação espontânea de frutas e vegetais (DI CAGNO et al., 2010, 2011a, 2011b; LEE et al., 2011; PULIDO et al., 2012).

A diferença qualitativa observada entre F1 e F2 ocorreu, provavelmente, em função do tempo pós-colheita ser diferente entre as matrizes, e isso ter viabilizado o processo de fermentação espontânea em F2, antes do mesmo começar a ser analisado, como relatado anteriormente. Dessa maneira, não se pode atribuir a diferença em função da procedência do fruto.

4.2.3.1 Álcoois

Como relatado anteriormente, os maiores valores de área durante a fermentação espontânea do açaí, foram identificados para F2, provavelmente em função do maior tempo pós-colheita até o momento dos ensaios.

Os álcoois superiores etanol, 1-penten-3-ol, 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), 3-metil-3-buten-1-ol, 2-penten-1-ol, 3-hexen-1-ol e 2 hexen-1-ol são oriundos do metabolismo de aminoácidos ou açúcares durante a fermentação alcoólica (BERRY et al., 1995).

O 3-metil-1-butanol foi identificado no vinho, e considerado como “*off flavours*”, os quais são compostos associados a descrições de amargor, contribuindo com notas negativas para os vinhos quando se encontram muito acima do seu limite de percepção sensorial (0,2 mg/L) (ESCUADERO et al., 2007).

O 2,3-butanodiol é encontrado em pequenas quantidades em tecidos de plantas e animais superiores, assim como em vários produtos alimentícios, neste caso, pela ação de microrganismos (MOLINA, 1995). O 2,3-butanodiol é um produto da fermentação alcoólica, sendo o segundo componente mais abundante no vinho (ESCUDEIRO et al., 2007).

4.2.3.2 Cetonas

Segundo Weldegergis et al. (2011) há várias possíveis rotas de formação de cetonas descritas na literatura, tendo como precursores ácidos graxos, aminoácidos ou

até mesmo açúcares. A 2,3- butanodiona foi encontrada apenas na amostra F1, no ponto de 15 horas. Já a 1-penten-3-ona 3-hidroxi-2-butanona foi encontrada em F1 e F2, em todos os pontos da cinética de fermentação.

A 3-hidroxi-2-butanona é bastante relatada no processo de fermentação de vinhos, sendo, frequentemente, o composto majoritário na obtenção desse produto. É sensorialmente descrita como aroma de manteiga e gordura (ESCUADERO et al., 2007).

4.2.3.3 Aldeídos

Dentre os 4 aldeídos identificados na polpa de açaí fermentada, o hexanal e o 2-hexanal estiveram presentes nas duas amostras, e foram mais intensos em F1. O hexanal pode ser formado diretamente a partir de ácido linoléico por via enzimática ou indiretamente através do ácido capróico (presente nas duas amostras) oriundo do mesmo ácido graxo por β - oxidação. O ácido linolênico também pode contribuir para a formação deste aldeído, pois a ação de lipoxigenases oxida este ácido graxo a 3-hexenal, que por sua vez forma 2- hexenal, que é convertido a hexanal (ROWAN et al., 1999; REINECCIUS, 2006). No caso do açaí, como se tem muito mais ácido linoléico que linolênico (11,5% e 1,1% do total dos ácidos graxos, respectivamente), é mais provável que o ácido linoleico seja o precursor (BICHARA, ROGEZ, 2012).

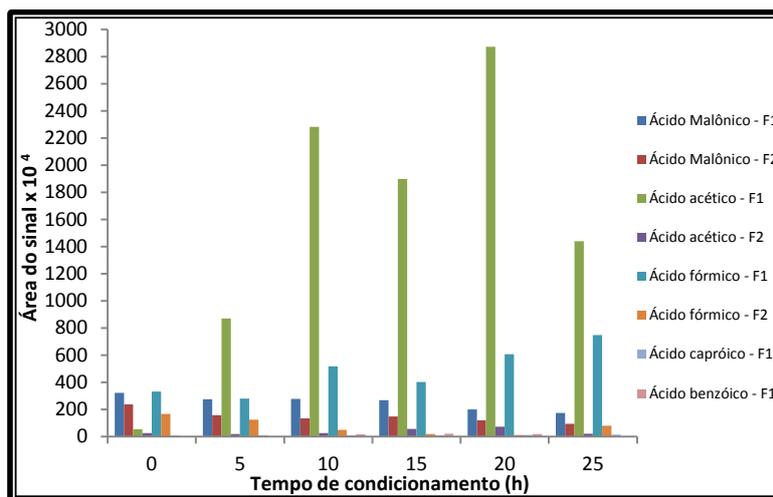
Observou-se para F1 que houve uma maior concentração relativa de hexanal, e menor concentração de ácido hexanóico. Isto pode ter ocorrido por duas hipóteses: uma maior conversão de ácido hexanóico em hexanal ou por diminuição da oxidação deste aldeído em ácido hexanóico. O hexanal e o 2-hexenal têm sido descritos como aroma herbáceo e frutado, e rançoso e gorduroso, respetivamente (ESCUDEIRO et al., 2007).

4.2.3.4 Ácidos carboxílicos

Dentre os ácidos identificados, o ácido acético foi o que apresentou maior intensidade durante a fermentação espontânea do açaí, para F1. Este resultado corrobora com a literatura, que relata a fermentação acética como a mais acentuada em frutas, dentre os processos fermentativos caracterizados durante fermentação espontânea do açaí (AQUARONE, 1990; BORTOLIN et al., 2001; MARQUES, et al. 2010; AGUIAR et al., 2013).

A produção dos ácidos acético, malônico, caprótico e fórmico foi observada a partir do tempo zero de condicionamento até às 25 horas, para ambas as procedências. Os demais ácidos foram encontrados a partir das 15 horas de fermentação, apenas para F1, como mostra a Figura 26.

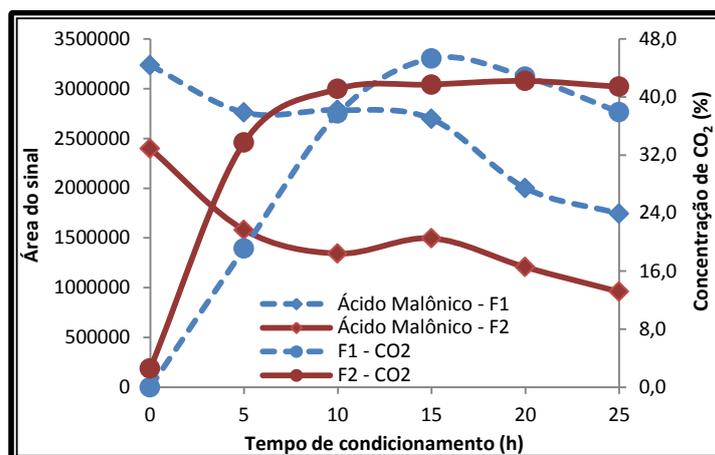
Figura 26: Produção dos ácidos carboxílicos durante as 25 horas de concionamento dos frutos de *E. oleracea*.



A fermentação malolática, caracterizada no presente trabalho, ocorre também espontaneamente na produção de vinho, conforme estudou Lopez et al. (2008). A literatura relata bastante esse processo fermentativo, durante a obtenção do vinho, em função da conversão do ácido malônico em ácido láctico e CO_2 (REVEL et al, 1999; LIU, 2002; UGLIANO et al., 2003). Durante a etapa de fermentação dos frutos de *E. oleracea*, o ácido malônico foi sendo consumido ao longo das 25 horas de condicionamento da matriz. Observando a Figura 27, percebe-se uma relação inversamente proporcional ao consumo desse ácido, e a produção de CO_2 .

Aguiar et al. (2013) relataram a presença do ácido láctico, durante fermentação espontânea, em ambientes aberto e fechado, dos frutos de *E. oleracea*. Apesar de não ter sido indentificado nesse trabalho, os resultados apresentados na Figura 27, podem ser um indício da incapacidade do método utilizado em identificar o ácido láctico.

Figura 27: Produção do ácido malônico e CO₂, durante fermentação espontânea dos frutos de *E. oleracea*.



O ácido capróico é formado no metabolismo dos ácidos graxos, principalmente pela β -oxidação do ácido linoléico, mas também através dos ácidos oléico e esteárico (ROWAN et al., 1999), que estão presentes na polpa de açaí, segundo Nascimento et al. (2008) e Menezes et al. (2008). Rezende e Fraga (2003) relataram a presença do ácido capróico entre os principais compostos da polpa do murici, o qual foi sensorialmente descrito com aroma de ranço. Dessa forma, sugere-se uma alteração sensorial, indesejável, na polpa dos frutos em processo de fermentação espontânea.

Com estes resultados pode-se afirmar que o tempo pós-colheita e o condicionamento dos frutos de *E. oleracea* em ambientes microaerófilos, são fatores de forte influência na qualidade sensorial da polpa de açaí. Segundo Aguiar (2010), pessoas que trabalham no processamento artesanal do fruto – forma normalmente comercializada na região Amazônica –, relatam que frutos transportados em ambientes fechados, possuem um *azedume* (dados de campo) que não é identificado nos frutos transportados em ambiente aberto. Rogez (2000) relatou que este atributo sensorial indesejável não poderia ter relação com o pH (5,0 – 5,5) do açaí. Logo, a identificação dos ácidos apresentados na Tabela 7 pode justificar essa característica sensorial.

Aguiar et al. (2013) encontraram o limite de detecção de palatabilidade para o ácido acético, em suco de açaí obtido de frutos condicionados em baixa aeração, por 7 horas, em condições de fermentação espontânea similares as estudadas neste trabalho.

4.3 IMPLICAÇÕES SOBRE UMA POSSÍVEL ATRAÇÃO DE TRIATOMÍNEOS

4.3.1 Concentração de gases, temperatura e umidade relativa

4.3.1.1 Concentração de CO₂

Barrozo e Lazzari (2004b) e Guerenstein e Hildebrand (2008) relataram que uma das principais consequências da adaptação dos triatomíneos ao habitat humano, bem como ao seu peridomicílio é o forte efeito atrativo do gás carbônico sobre insetos hematófagos. Este fato se agrava em ambientes com contínuas correntes de ar, pois os odores viajam em seus pacotes e são detectados como estímulos pelos insetos, mesmo a longas distâncias.

Durante o protocolo de ações de controle da DC, realizado pela SESPA, em 2011, foram capturadas espécies de triatomíneos positivadas, com o *T. cruzi*, no peridomicílio dos habitantes das Ilhas do combú, Murutucum e Papagaio, do município de Belém. Esses insetos foram capturados também em açazeiros, durante a dessecação das palmeiras, nas mesmas ilhas.

Considerando esses fatores, e os resultados da concentração de CO₂ encontrados neste trabalho, conclui-se que os frutos do açazeiro, em seu período pós-colheita, possuem uma tendência forte de exercer atração sobre os triatomíneos, que podem estar nas proximidades das casas ribeirinhas ou barcos durante o transporte. Os açazeiros são abundantes em solos de várzea, ou seja, localizados às margens dos rios, onde sempre há correntes de ar em direção ao continente, carreando os odores (AGUIAR et al., 2010).

O intenso manuseio durante a pós-colheita do açaí, pode ser outro fator de influência, pois a presença de pessoas e animais ao redor dos paneiros contendo os frutos podem aumentar a quantidade de calor e CO₂ transportados pelas correntes de ar. Segundo Aguiar (2010), comparando a respiração dos frutos de açaí com a de humanos, seria necessária 1 tonelada dessa matriz (aproximadamente 80 paneiros) para liberar a quantidade de CO₂ exalado por uma pessoa adulta (em média 45 gCO₂/h).

Um dado importante é fornecido por Barrozo e Lazzari (2004a), que relatam uma atividade de locomoção dos triatomíneos, em resposta ao CO₂, apenas no início da escotofase, quando saem à procura de alimento, e isso reflete sobre a colheita do açaí no

final da tarde e/ou sobre seu armazenamento na ponta do trapiche à espera da embarcação.

4.3.1.2 Temperatura e umidade relativa

Naturalmente, as condições ambientais, de temperatura e UR, da Região Amazônica, são bastante atrativas para a habitação de insetos. Barrozo et al. (2003) concluíram que fontes úmidas de calor, à temperatura ambiente, foram atrativas à *T. infestans*. Rocha et al. (2001), relataram a preferência de *R. robustus* por ambientes úmidos, e citam que esta espécie é muito encontrada nos Estados do Pará e Amazonas.

Dessa maneira, os valores de umidade e temperatura encontrados durante o processo de fermentação espontânea, neste trabalho, podem ser um fator de atração para triatomíneos, principalmente, quando os insetos estão presentes nas embarcações, podendo haver contato direto dos vetores da DC com os frutos. Lembrando, que o paneiro utilizado para o armazenamento do fruto não oferece resistência ao contato direto.

Gomez-Nuñez (1964), num estudo sobre a criação de *R. prolixus*, percebeu que a UR exerceu maior impacto comportamental sobre o inseto, quando associada a elevadas temperaturas ambientais ($> 30^{\circ}\text{C}$). Dessa maneira, a temperatura em volta dos frutos pode ser um fator a mais para atração de triatomíneos, tendo em vista que durante o acondicionamento dos frutos de açaizeiro, os valores encontram-se próximos ou superiores a 30°C , como mostra a Figura 20 (página 52).

4.3.2 Compostos orgânicos voláteis (COVs)

4.3.2.1 Interação intraespecífica

Os triatomíneos possuem dois tipos de glândulas responsáveis pela comunicação entre as espécies: glândulas metasternais (GMs) e de Brindley. Os resultados apresentados no trabalho de Vitta e Lorenzo (2009) demonstraram que machos são atraídos por odores de fêmeas, e que as glândulas metasternais estão envolvidas nesta atração.

Dentre os compostos associados com secreções das glândulas metasternais das espécies *T. infestans* e *R. prolixus* emitidos em diferentes contextos comportamentais, a 2-butanona é relatada como feromônio sexual de machos e fêmeas, porém, exercem maior influência na atração de machos, para o acasalamento. Essa substância também é relatada como feromônio de agregação das espécies, sendo emitida, por machos e fêmeas, durante a copulação desses insetos (MANRINQUE et al., 2006; PONTES et al. 2008; PONTES; LORENZO, 2012). Dessa maneira, a identificação da 3-hidroxi-2-butanona, no presente trabalho, torna questionável o efeito de atração dessa substância sobre os triatomíneos, tendo em vista os comportamentos intraespecíficos relatados para a 2-butanona.

O ácido isobutírico, identificado no trabalho, pode ser outro indicativo para atração de triatomíneos, pelos frutos de açaí em processo fermentativo espontâneo, tendo em vista os relatos de Guerenstein e Guerin (2004), nos quais, em baixas concentrações, esse analito pode funcionar como um sinal sexual entre casais de *R. prolixus*. Entretanto, até o momento não há dados experimentais que comprovem a existência de comportamento desencadeado ou promovido por esta substância que tenham relação direta com o contexto sexual.

Insetos adultos perturbados mecanicamente emitem secreções através das GMs e das glândulas de Brindley, simultaneamente (VITTA, 2005; MANRIQUE et al., 2006). A natureza multicomponente dessas secreções deve ser considerada, levando em conta a existência de fenômenos de ativação, inibição e sinergismo que podem ocorrer na presença simultânea de diferentes componentes.

Guerenstein (1999) encontrou o ácido isobutírico no HS de *T. infestans* submetidos à perturbação mecânica. É importante relatar, que o ácido isobutírico foi encontrado por todos os autores que investigaram a secreção das glândulas de Brindley e/ou no HS de adultos perturbados de todas as espécies de triatomíneos estudadas, porém existem divergências aos outros componentes, não havendo assim um consenso sobre o comportamento desses insetos mediante a mistura dessas substâncias.

No HS de *R. prolixus* e *T. brasiliensis* perturbados mecânicamente, foram encontrados os ácidos isobutírico, acético, propiônico, butírico e o 2-metil-butírico (GUERENSTEIN, 1999; VITTA et al., 2009). Apesar do ácido acético e isobutírico serem identificados nesse trabalho como produtos da fermentação espontânea dos frutos de açaí, a literatura científica para triatomíneos, não apresenta nenhum efeito atrativo para o ácido acético.

Como a literatura retrata o comportamento dos triatomíneos, frequentemente, associado a misturas multicomponentes, é necessário realizar testes de atração entre as substâncias identificadas durante o processo fermentativo do fruto e esses insetos, para que possam ser descritas as implicações sugeridas no presente trabalho.

4.3.2.2 Interação interespecífica

Mamíferos, em geral, são ótimas fontes de compostos orgânicos voláteis através da transpiração. Os ácidos graxos carboxílicos constituem um quarto dos lipídios que estão na superfície da pele humana, e são produtos da degradação de triglicerídeos por micro-organismos presentes nas glândulas sebáceas da pele humana (TAKKEN; KNOLS, 1999).

Stefaniak e Harvey (2006) determinaram 61 constituintes no suor humano, dentre eles, os ácidos láctico, pirúvico, butirico, acético, caprótico, propiônico, isobutírico e isovalérico. Dentre esses, os ácidos acético, caprótico e isobutírico, foram identificados como metabólitos do processo fermentativo acompanhado neste trabalho. Vale ressaltar que os AGCC, e o ácido láctico, na presença de CO₂, exerceram maior influência sobre a atração de triatomíneos, na espécie *R. prolixus*, e que os insetos mais encontrados na Amazônia Brasileira pertencem a este gênero (Guerenstein; Lazzari 2008).

Nos estudos de Ortiz e Molina (2010), extratos do suor humano do rosto e dos pés apresentaram respostas significativas ($p < 0,05$), para atração de *R. prolixus*. Enquanto os extratos da mão não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para a atração.

A combinação de ácido láctico com CO₂ foi testada em ninfas de *R. prolixus* e apresentaram um aumento da atração desses insetos (Tabela 2, pág. 26). Essas duas substâncias foram identificadas durante o processo de fermentação espontânea de frutos de açaizeiro em ambiente microaeróbico (AGUIAR et al., 2013), similares ao estudado neste trabalho.

Barrozo e Lazzari (2004b) relataram que o limite de detecção do CO₂ pela espécie *T. infestans* foi de 300-400 ppm. Em sinergismo com o ácido láctico, este limite diminuiu para 75-150 ppm. Em testes apenas para o ácido láctico, esses autores verificaram que não houve efeito atrativo.

Seccadio et al. (2012) apresentaram resultados expressivos para atração da espécie *R. pictipes*, quando canalizaram substâncias voláteis produzidas por 10 kg de frutos do açaizeiro, para um sistema de teste de atração, em ambiente fechado. Os autores ainda relataram um efeito sinérgico sobre os insetos, quando em outro ensaio utilizando o mesmo sistema, foi adicionado 1% (v:v) de CO₂, não ocorrendo atração significativa dos insetos.

Schofield (1994) observou que baixas concentrações de ácido isobutírico atraíram adultos de *R. prolixus*, enquanto altas concentrações os repeliram. Guerenstein e Guerin (2001) demonstraram que o ácido isobutírico constitui o único componente da mistura de odores de coelho capaz de estimular a sensíla basicônica, localizada na antena de *T. infestans*.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que foi possível otimizar as condições necessárias de análise dos COVs, via *headspace-spme*, durante o processo fermentativo dos frutos de *E. oleracea*. Com o método de extração definido, e as condições de análise, por CG-MS, implantadas, foram identificadas, as substâncias voláteis produzidas durante a fermentação dos frutos, de duas procedências (F1 e F2).

Com os resultados obtidos, ficou evidenciado o processo de fermentação espontânea que ocorre naturalmente nos frutos de açázeiros, 25 horas pós-colheita. Nesse período, os frutos de açazeiro sofrem quatro tipos de fermentações: a alcoólica, a acética, a malolática e a capróica. Os metabólitos desses processos fermentativos sugerem uma perda na qualidade nutricional, sensorial e funcional da polpa de açáí.

Fica evidente a necessidade de investimento financeiro em cursos de instrução e capacitação, por parte da esfera governamental, aos produtores, atravessadores e comerciantes de açáí, no sentido da aplicação das boas práticas de fabricação na cadeia produtiva do açáí.

As condições ambientais onde se desenvolve a cadeia produtiva do açáí, assim como os produtos do processo fermentativo desse fruto, possuem uma relação positiva com as substâncias, relatadas pela literatura, que exercem atração intraespecíficas e interespecíficas dos vetores da DC. A classe dos ácidos carboxílicos e cetonas, sugerem uma possível atração sobre os triatomíneos, principalmente, durante o acondicionamento dos mesmos em trapiches, e nas embarcações utilizadas para o transporte.

Dessa maneira, para futuros trabalhos, fica a idéia de realizar um estudo de atração com os COVs do processo fermentativo de *E. oleracea*, para validar as possíveis implicações aqui apresentadas.

Aos produtores, torna-se importante instruí-los, no sentido de evitar colocar os cachos no chão, e diminuir a presença de animais e pessoas ao redor dos paneiros; assim como, diminuir ao máximo o tempo de transporte dos frutos até os centros comerciais, para manter, ao máximo, sua qualidade microbiológica, nutricional e sensorial.

6 REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy**, Allured Publishing Corporation, USA, 1995.

AGUIAR, F. S. **Avaliação da fermentação espontânea dos frutos de *Euterpe Oleracea* durante o período pós-colheita e suas possíveis implicações sobre atração de triatomídeos**. 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

AGUIAR, F.S.; ROGEZ, H MENEZES, V.R. Spontaneous fermentation of *Euterpe oleracea* fruits during the postharvest. **Postharvest Biology and Technology**. No prelo, 2013.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J. de. Estudo das leveduras contaminantes da Usina Santo Alexandre. In: ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ". **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**. p.51-56. 2005.

ANDRADE, L. C.; PORTELA, R. S.; FERRÃO, E. S.; SOUZA, A. L.; REIS, A. A. **Adoção de novos paradigmas n organização e gestão de empreendimentos solidários: um estudo sobre o processo produtivo do açaí através das associações e cooperativas no território rural do Baixo Tocantins – Pará – Brasil**. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural – Sober. Acre, 2008.

APREA, E.; GIKA, H.; CARLIN, S.; THEODORIDIS, G., VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F. Metabolite profiling on apple volatiles content based on solid phase microextraction and gas-chromatography time of flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 28, n. 218, p. 4517-4524, 2011.

AQUARONE, E.; ZANCANARO Jr., O. Vinagres. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. (Eds). **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1990. p. 104-122.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008. 67 p.

AUDINO, P. G.; ALZOGARAY, R. A.; VASSENA, C.; MASUH, H.; FONTAN, A.; GATTI, P.; MARTINEZ, A.; CAMPS, F.; CORK, A.; ZERBA, E. 2007. Volatile compounds secreted by Brindley's glands of adult *Triatoma infestans*: identification and biological activity of previously unidentified compounds. **Journal of Vector Ecology**. v. 32, n. 1, p.75-82. 2007.

AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P.; TADA, E. S.; RIVELLINO, S. R. Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.873, n. 5, p.117–127. 2002.

BARBOSA, R. L. **Transmissão oral do *trypanosoma cruzi* pela polpa de açaí em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP, 2010. 97f.

BARGHINI, A.; URBINATTI, P. R.; NATAL, D. Atração de mosquitos (diptera: culicidae) por lâmpadas incandescentes e fluorescentes. **Entomologia y Vectores**. v. 11, n. 4, p. 611-622, 2004.

BARROZO, R. B.; LAZZARI, C. R. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. **Chemical Sense**, v. 29, p. 319– 329, 2004.

BARROZO, R. B.; MANRIQUE, G.; LAZZARI, C. R. The role of water vapour in the orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). **Journal of Insect Physiology**. v. 49, p. 315-321, 2003.

BARROZO, R. B.; MINOLI, S. A.; LAZZARI, C. R. Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). **Journal of Insect Physiology**. v. 50, p. 249–254, 2004.

BELTRÃO, H. B. M.; CERRONI, M. P.; ROBERTO, D.; FREITAS, C.; PINTO, A. Y. N.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A. S.; COSTA, E. G.; SOBEL, J. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007. **Tropical Doctor**, v. 39 n. 4, p. 231-232, 2009.

BERRY, D. R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. **Fermented beverage production**, Blackie, London, p. 32-61, 1995.

BICHARA, C. M. G.; ROGEZ, H. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). In: YAHIA, E.M.. (Org.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: Açaí to citrus**. Cambridge: Woodhead Publishing, v. 2, p. 1-26, 2011.

BODIN, A.; BARROZO, R.; COUTON, L.; LAZZARI, C.R. Temporal modulation and adaptative control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. **Journal of Insect Physiology**. v.54, p.1343–1348. 2008.

BORTOLINI, F.; SANT'ANNA, E. S.; TORRES, R. C. Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinida deliciosa*): composição dos mostos e métodos de fermentação acética. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 236-243, 2001.

BOTTO-MAHAN, C.; PEDRO E. CATTAN, P. E.; CANALS, M. Field tests of carbon dioxide and conspecifics as baits for *Mepraia spinolai*, wild vector of Chagas disease. **Acta Tropical**, v. 82 p. 377–380, 2002.

BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: Collins, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de cromatografia**, 7 ed. Campinas-SP: UNICAMP, 2006, p. 203-270.

BORDEN, J. H. Two tree baiting tactics for the management of bark beetles with semiochemicals1. **Journal of Applied Entomology**. v.114, n. 5, p. 201-207. 1992.

BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P.; CANALS, M. Field tests of carbon dioxide and conspecifics as baits for *Mepraia spinolai*, vector of Chagas disease. **Acta Tropical**. v. 82, p.377–380. 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 218**, de 29 de julho de 2005. Diário Oficial da União. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://egis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18094>> acessado em 02 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 269**, de 22 de Setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 23 de set. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Informativo do Departamento de Ciência e Tecnologia – DECIT**, n. 2, de abril de 2009. Edição especial.

BROWN, A. W. A. Studies of the responses of the female *Aedes* mosquito. Part IV. Field experiments on Canadian species. **Bulletin of Entomological Research**. v. 42, p. 575 – 583, 1951.

BUCKENHÜSKES, H.J. Fermented vegetables. In: DOYLE, P.D., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. (Eds.), **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 2ed. ASM Press, Washington, DC, p. 595-609. 1997.

BUXANT, R., ROGEZ, H., AQUINO, A.R., SOUZA, J.N. DE, SOUSA, C.L. **Qualidade microbiológica do suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) comercializado na cidade de Belém - Pará**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, 1997. Resumos. Rio de Janeiro : SBM, 1997. 276p.

CAMANDAROBA, E. L.; PINHEIRO LIMA, C. M.; ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas' disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n.2, p. 97-103, 2002.

CARLIER, Y.; DIAS, J.C.P.; LUQUETTI, A.O.; HONTEBEYRIE, M.; TORRICO, F.; TRUYENS, C. Trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas. **Encyclopédie Médico-Chirurgicale**. v.8, p.505-A20, 2002.

CEVA-ANTUNES, P. M. N. et al. Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by Solid Phase Micro Extraction (SPME). **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 39, n. 4, p. 436-442, 2006.

CHANDARAJ, K.; GUNASEKARAN, P. Alcoholic Fermentation. In: PANDEY, A. (Ed.). **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology**. Nova Iorque: Food Products Press, 2004. 735p.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 4^o edição. Cambridge Press, UK. 770 pp. 1998.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de Frutas e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. Lavras: UFLA, 2005. 781p.

COROA, R.J.F., OLIVEIRA, T.M.A., DAHAN, D.E., ALMEIDA, M.G.C. de, JARDIM, M.A.G. Análise microbiológica do suco de açaí produzido em uma comunidade ribeirinha do estuário amazônico. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 11, n. 2, 1995.

COURA, J. R. Tripanosomose, Doença de chagas. **Ciência e Cultura**. v. 55, n. 1, p. 30-33. 2003.

CRESPO, J.; MANRIQUE, G. Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: Role of Brindley's and metasternal glands. **Journal of Insect Physiology**. v. 53, n. 7, p. 708–714. 2007.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 1539-1545, 2004.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; MORIÑA, R. M. SANDRA, P. Monitoring and fast detection of mycotoxin-producing fungi based on headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction of the volatile metabolites. **Journal of Chromatography A**. v. 985, n. 1, p. 127-135. 2004.

DIAS, J. C.; MACHADO, E. M.; FERNANDES, A. L.; VINHAES, M. C. General situation and perspectives of Chagas' disease in Northastern Region, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. 13-34, 2000.

DIAS, J. C. P.; MACEDO, V.O. Doença de Chagas. In: COURA, J.R (org) **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 557-593, 2005.

DIAS, J. P.; BASTOS, C.; ARAÚJO, E.; MASCARENHAS, A. V.; MARTINS NETTO, E.; GRASSI, F.; SILVA, M.; TATTO, E.; MENDONÇA, J.; ARAÚJO, R. F.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; ARAS, R. Surto de doença de Chagas aguda associada à transmissão oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p.296-300, 2008.

DIAS, J.C.P.; Epidemiologia. In: BRENER, Z; ANDRADE, Z. A; BARRAL NETO, M. (orgs) **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 48-74, 2000.

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

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 603-612. 2002.

DIAS, J. C. P.; PRATA, A.; SCHOFIELD, C. J. Doença de Chagas na Amazonia: esboço da situação atual e perspectiva de prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35, n. 6, p. 669-78. 2002.

DI CAGNO, R.; CODA, R. DE ANGELES, M.; GOBBETTI, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**. v. 33, p. 1-10. 2013.

DI CAGNO, R., SURICO, R.F., PARADISO, A., DE ANGELIS, M., SALMON, J.-C., BUCHIN, S., DEGARA, L., GOBBETTI, M. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. **International Journal of Food Microbiology** 128, 473e483. 2008b.

DI CAGNO, R., SURICO, R.F., SIRAGUSA, S., DE ANGELIS, M., PARADISO, A., MINERVINI, F., DE GARA, L., GOBBETTI, M. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. **International Journal of Food Microbiology**. v. 127, p. 220- 228. 2008a.

DI CAGNO, R.; CARDINALI, G.; MINERVINI, G.; ANTONIELLI, L.; RIZZELLO, C.G.; RICCIUTI, P.; GOBBETTI, M. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. **Food Microbiology**. v. 27, n. 2, p. 381-389. 2010.

DI CAGNO, R., MINERVINI, G., RIZZELLO, C.G., DE ANGELIS, M., GOBBETTI, M. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. **Food Microbiology**. v. 28, p. 1062-1071. 2011a.

DI CAGNO, R.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C.G.; LOVINO, R.; SERVILI, M.; TATICCHI, A.; URBANI, S.; GOBBETTI, M. Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**. v. 28, p. 900-909. 2011b.

DICKE, M. & SABELIS, M.W. (1988) Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. **Functional Ecology**, v. 2, p. 131-139.

DIEHL, P.A., VLIMANT, M., GUERENSTEIN, P., GUERIN, P.A. Ultrastructure and receptor cell responses of the antennal grooved peg sensilla of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Arthropod Structure & Development**. v. 31, 271–285. 2003.

DUAILIBI, Julia. O açaí na trilha do kiwi. **Veja On Line**. São Paulo, 11 de abril de 2007. Disponível em: http://veja.abril.uol.com.br/110407/p_102.shtml. Acesso em 14 de abril de 2012.

ESCUADERO A, FARIÑA L, CACHO J, FERREIRA V. Analytical Characterization of the Aroma of five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the

Concept of Fruitiness of Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 4501-4510. 2007.

FELLOWS, P. J. **Food Processing Technology**. Cambridge: Woodhead, 2000. 575 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 1996. v. 1. 182p.

FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. In: FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Livraria Varela, 2004, p. 17-28.

GALVÃO C.; ANGULO V. M. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**. v. 12, p.61–68. 2006.

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.

GARRUTI, D. S. **Composição de voláteis e qualidade de aroma de vinho de caju**. 2001. 204f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2001.

GARRUTI, D. S.; FRANCO, M. R. B.; DA SILVA, M. A. A. P.; JANZANTTI, N. S.; ALVES, G. L. Evaluation of volatile flavour compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice by the Osme gas chromatography/olfactometry technique. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.83, p.1455-1462, 2003.

GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C.; KUNKEE, R.E. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having a impaired ability to form hydrogen sulfide. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.44, n.1, p.17-21, 1993.

GIUDICI, P.; KUNKEE, R.E. The effect of nitrogen deficiency and sulfur containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.45, n.1, p.107-112, 1994.

GUERENSTEIN, P.G., GUERIN, P.M. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. **Journal of Experimental Biology**. v.204, n.2, p 585–597. 2001.

GUERENSTEIN, P. G.; HILDEBRAND, J. G. Roles and Effects of Environmental Carbon Dioxide in Insect Life. **Annual Review of Entomology**. v. 53, p. 161-178, 2008.

GUERENSTEIN, P. G.; LAZZARI, C. R. Host-seeking: Howtriatomines acquire and make use of information to find blood. **Acta Tropical**. v.45, n.3, p. 16-29. 2008.

GUILLO, M.; GIUDICI, P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. **International Journal of Food Microbiology**. v. 125, p. 46-53, 2008.

HASHIZUME, T. Tecnologia do Vinho. In.: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos**. São Paulo: Blucher, 2008. 523p.

HERNÁNDEZ, A.; MARTÍN, A.; ARANDA, E.; PÉREZ-NEVADO, F.; CÓRDOBA, M. G. Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. **Food Microbiology**, v. 24, p. 346-351, 2007.

HUTKINS, R. W. **Microbiology and Technology of Fermented Foods**. Oxford: Blackwell, 2006. 489p.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro, 2009.

IEC. INSTITUTO EVANDRO CHAGAS. **Boletim Informativo sobre Vigilância Epidemiológica da Doença de Chagas na Amazônia Brasileira**. 2007.

ILHA, E. C.; BERTOLDI, F. C.; REIS, V. D. A.; ANNA, E. S. Rendimento e Eficiência da Fermentação Alcoólica na Produção de Hidromel. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. v. 82, p. 1981- 1990. 2008.

INCZEDY, J.; LENGYEL, T.; URE, A. M.; **Compendium of analytical nomenclature: definitive rules 1997, “the orange book”**, 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1998.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) **Retention index, I in column chromatography**. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/R05360.html>. Acessado em: 18 de março de 2013.

INSAUSTI, T.C., LAZZARI, C.R., CAMPANUCCI, V.A. Neurobiology of behaviour. A morphology of the nervous system and sense organs. In: Carcavallo, et al. (Eds.), **Atlas of Chagas' Disease Vectors in America**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, vol. 3 pp. 1017–1051. 1999.

JACKMAN, E. A. Alcohol industrial. In: BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Biotecnologia básica**. Ed.3. Zaragoza: Acribia, p. 320-321. 1991.

JANSEN, A. M.; D'ANDREA, P. S.; ALVES, F. M.; NETO, S. F. C.; ARAÚJO, V. A. L. **Avaliação do ciclo enzoótico do *Trypanosoma cruzi* nas ilhas do Combú, Murutucum e Papagaio do município de Belém, estado do Pará**. Relatório do centenário da Doença de Chagas. Secretária de Saúde do Estado do Pará (SESPA). 2011. 25p.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**, 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

JENNINGS, W.; SHIBAMOTO, T. **Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography**. New York: Academic Press, 1980. 472 p.

JURBERG, J.; GALVÃO, C.; NOIREAU, F.; CARCAVALHO, R. U.; ROCHA, D. S.; LENT, H. **Uma Incografia dos Triatomíneos**. Rio de Janeiro: Co-edição IRD Editions e Editora Gama Filho, 2005. 48p.

KAFKAS, E. et al. Comparison of methodologies for the Identification of aroma compounds in strawberry. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. v. 29, p. 383-390, 2005.

KANG, J., THAKALI, K. M., XIE, C., KONDO, M., TONG, Y., OU, B., Gitte JENSEN, G.; MEDINAD, M. B.; SCHAUSS, A. G., WU, X. Bioactives of acai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, v.3, p.671–677, 2012.

KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, L. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 8 n. 80, p. 35-62, 2000.

KOLAHGAR, B.; HEIDEN, A. C. Discrimination of different beer sorts and monitoring of the effect of aging by determination of flavor constituents using SPME and a chemical sensor, **Gerstel Application Note** 11/2002.

KUSKOSKI, E. M.; GARCIA ASUERO, A.; TERESA MORALES, M.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p. 1283-1287, jul-ago, 2006.

LANDOLT, P. J.; PHILLIPS, T. W. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. **Ann Rev Entomol**. v. 42 p. 371–391. 1997.

LAZZARINI M. Diário Popular – Via Internet. Viva Bem: **Cuidados para evitar doenças transmitidas por alimentos**. Pelotas, RS, 2004. Disponível em: <http://www.diariopopular.com.br/20_04_04/ip160410.html> acessado em 02 de dezembro de 2011.

LAZZARI, C. R. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. **Journal of Insect Physiology**. v. 38, p. 895-903. 1992.

LAZZARI, C. R., NUNEZ, J. A. The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. **Journal of Insect Physiology**. v. 35, p. 525-529. 1989

LEE, H.; YOON, H. J. I, Y.; KIM, H.; PARK, H.; LEE, J. Functional properties of Lactobacillus strains from kimchi. **International Journal of Food Microbiology**. v. 145, p. 155-161. 2011.

LEHANE, M.J. **The biology of blood-sucking in insects**, Second Edition. Cambridge University Press, New York, NY, 336 p. 2005.

LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G. S.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea Martius* (açai) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.56, n. 1, p. 53-64, 2005.

LIU, S. A review. Malolactic fermentation in wine beyond deacidification. **Journal of Applied Microbiology**. v. 92, p. 589-601. 2002.

LOPEZ, I.; LOPEZ, R.; SANTAMARIA, P.; TORRES, C.; LARREA-RUIZ, F. Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines. **Vitis**. v. 47, n. 2, p. 123-129. 2008.

LORENZO, A. N. F.; LAZZARI, C. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. **Physiological Entomology**. v. 23, p. 33-37. 1998.

LORENZO, M. G.; LAZZARI, C. R. Temperature and reative humity affect the seletion of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. **Acta Tropica**. v. 72, p. 241-249, 1999.

MANRIQUE, G.; VITTA, A. C. R. FERREIRA, A. R.; ZANI, C. L.; UNELIUS, C. R.; LAZZARI, C. R.; DIOTAIUTI, L.; LORENZO, M. G. Chemical communication in chagas disease vectors. Source, identity, and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 9, p. 2035–2052, 2006.

MARQUES, F. P. P.; SPINOSA, W.; FERNANDES, K. F. CASTRO, C. F. S.; CALIARI, M. Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 30, n. 1, p. 119-126. 2010.

MASSAGER, P. R. **Microbiologia dos Processos Fermentativos**. São Paulo: Varela, 2005. 525p.

MASSARO, D. C.; REZENDE, D. S.; CAMARGO, L. M. A. Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 11, n. 2, p. 228-40, 2008.

MENEZES, E. M. S.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açai (*Euterpe oleracea Mart*) liofilizada. **Acta Amazônica**. v. 38, n. 2, p. 311-316. 2008.

MILLER, J. R.; ROELOFS, W. L. Individual variation in pheromone sexual component ratios in two populations of the redbanded leafroller moth. **Argyrotaenia velutinana**. v. 9, p. 359-363. 1980.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Chagas: Descrição da doença**. Brasília. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?=31114. Acesso em: 17 jun. 2011.

MIRANDA, I. P. A.; RABELO, A.; BUENO, C. R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M.N.S. **Palm fruits of Amazonia-Manaus: MCT/INPA**. (in Portuguese). 119 p. 2001.

MOLINA, M. A. B. **Avaliação de caldo de cana-de-açúcar para obtenção de 2,3-butanodiol**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentação) – Universidade de São Paulo – USP, São Paulo. 1995. 160 f.

MONCAYO, A. Chagas' disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

MONTET, D.; LOISEAU, G.; ZAKHIA, N. Fermented Vegetables. In: PANDEY, Ashok (ed.). **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology**. Londres: Food Products Press, p.211-223. 2004.

NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 30, n. 2, 2008.

NATION JL. **Insect Physiology and Biochemistry**. University of Florida, CRC Press, p. 485. 2002.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAÚJO, W. N. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases Journal**. v. 15, n. 4, p. 653-655, 2009.

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, 49p., 1995.

NYANGA, L.K., NOUT, M.J.R., GADAGA, T.H., THEELEN, B., BOEKHOUT, T., ZWIETERING, M.H. Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**. v. 120, p.159-166. 2007.

OLIVEIRA, J. C.; SETTI-PERDIGÃO, P. SIQUEIRA, K. A. G.; Características microbiológicas do suco de laranja *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26, n.2, p.241-245. 2007.

ORTIZ, M. I.; MOLINA, J. Preliminary evidence of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Triatominae) attraction to human skin odour extracts. **Acta Tropica**. v. 113, 174-179, 2010.

PANAFTOSA. 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.

PARÁ. Secretaria de Saúde Pública. Sistema Único de Saúde. Coordenação de Vigilância à Saúde. Departamento de Controle de Endemias. Gerência Técnica em Doenças de Chagas. **Manual de vigilância e controle de Chagas para Agentes Comunitários de Saúde e Agentes em Endemias do Estado do Pará**. Belém, PA, 2009.

PARLAMENT, T. H. Solvent extraction and distillation techniques. In: MARSILI, R. (Ed); **Techniques for Analyzing Food Aroma**, Marcel Dekker Inc., New York, cap. 1, p. 17-44, 1997

PASSOS, L. A. C. **Pesquisa associa polpa do açaí à transmissão da doença de Chagas**. *Jornal da Unicamp*. Campinas, 10 a 16 de maio de 2010. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/maio2010/ju461pdf/Pag03.pdf acessado em 10 de agosto de 2011.

PAVARINI, D. P. **Variabilidade temporal e intraespecífica dos constituintes voláteis das folhas de *Lychnophora ericoides* Mart.** 2011. 126 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2011.

PAWLISZYN, J.; CATHERINE, A. L.; KILLAM, L. M.; BUCHHOLZ, K. D.; BERG, J. R. Automation and optimization of solid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**. v. 64, N. 17 p. 1960-1966, 1992.

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

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.

PINHO, O. FERREIRA, I. M. P. L. V. O. SANTOS, L. H. M. L. M. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal of Chromatography A**, v.1121, p.145–153, 2006.

PINO, J. A; BENT, L. Odour-active compounds in guava (*Psidium guajava* L. cv. Red Suprema). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 10, p. 6153 - 6167. 2013.

PINO, J. A. QUERIS, O. Characterization of odor-active compounds in guava wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, n. 9, p. 4885-90. 2011.

PINTO, A. Y. N.; VALENTE, S. A. S.; LOPES, R.; SILVA, O.; CASTRO, T. B.; VALENTE, V. C. Ocorrência de tripanossomíase aguda familiar no município de Igarapé-Miri, Pará: Gravidade de apresentação clínica em idosos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 381, 2003.

POMPEU, D.R., BARATA, V.P., ROGEZ, H. Impacto da refrigeração sobre variáveis de qualidade dos frutos do açaizeiro (*Euterpe oleracea*). **Alimentos e Nutrição**. v. 20, n. p.141-148. 2009.

PONTES, G. B.; BOHMAN, B.; UNELIUS C. R. LORENZO, M. G. Masternal gland volatiles and sexual communication in the triatomine bug, *Rhodnius prolixus*. **Journal of Chemical Ecology**. v. 34, p. 450–457. 2008.

PONTES, G. B.; LORENZO, M. G. Female metasternal gland odours mediate male aggregation in *Rhodnius prolixus*, a triatomid bug. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 26, p. 33–36, 2012.

PRAT, P.; MORETTI, R.H.; CARDELLO, H.M.A.B. Elaboração de bebida composta por mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e sucos de frutas ácidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v.25: p.147-52. 2005.

PRICE, P.W.; BOUTON, C.E.; GROSS, P.; MCPHERON, B. A.; THOMPSON, J.N.; WEISS, A. E. Interaction among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. v. 11, n. 8, p. 41–65. 1980.

PULIDO, R. P.; BENOMAR, N.; CAÑAMERO, M. M.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A. **Fermentation of caper products**. In: Hui, Y.H. (Ed.), Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology, second ed. CRC Press, Boca Raton, USA, p. 201-208. 2012.

RAGHU, S., DREW, R. A. I.; CLARKE, A.R. Influence of host plant structure and microclimate on the abundance and behavior of a tephritid fly. **Journal of Insect Behavior**. v. 17, p. 179-190, 2004.

REINECCIUS, GARY. Flavor chemistry and technology. In. **Flavor formation in fruits and vegetables**, 2nd ed, Boca Raton; London; New York: Taylor & Francis group, cap. 4, p. 73-98. 2006.

REIS, T. Açaí faz 1 vítima de Chagas a cada 4 dias na Amazônia. **Folha de São Paulo**, 18 de agosto de 2007.

REISENMAN, C. E.; LAZZARI, C. Spectral sensitivity of the photonegative reaction of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). **Journal of Comparative Physiology A**. v. 192, p. 39–44, 2006.

REZENDE, C. M.; FRAG, S. R. G. Chemical and Aroma Determination of the Pulp and Seeds of Murici (*Byrsonima crassifolia* L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 14, n. 3, p. 425-428, 2003.

REVEL, G.; MARTIN, N.; PRIPIS-NICOLAU, L.; LONVAUD-FUNEL, A.; BERTRAND, A. Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, n. 10, p. 4003–4008. 1999.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Traité d'Œnologie**: chimie du vin, stabilisation et traitements. Paris: Dunod, 1998. V.2, 519p.

RIU-AUMATELL M. A.; CASTELLARI, M.; LOPEZ-TAMAMES, E.; GALASSI, S.; BUXADERAS, S. Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. **Food Chemistry**, v. 87, p. 627–637, 2004.

RIU-AUMATELL, M.; VARGAS, L.; VICHI, S.; GUADAYOL, J. M.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. Characterisation of volatile composition of white salsify (*Tragopogon porrifolius* L.) by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and simultaneous distillation–extraction (SDE) coupled to GC–MS. **Food Chemistry**. v. 129, p. 557–564. 2011.

ROCA, M. J.; LAZZARI, C. R. Effects of relative humidity on the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Hygro-preference and eclosion success. **Journal of Insect Physiology**. v. 40, n. 10, p. 901-907, 1994

ROCHA, D. S.; SOLANO, C.; JURBERG, J.; CUNHA, V.; GALVÃO, C. Avaliação em laboratório da atividade de voo de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919, potencial vetor silvestre do *Trypanosoma cruzi* na Amazônia Brasileira. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v.2, n.1, p. 73-78, 2011.

ROCHA, D. S.; JURBERG, J.; CARCAVALHO, R. U.; PRESGRAVE, O. A. F.; CUNHA, V.; GALVÃO, C. Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento ninfal de *Rhodnius robustus*. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 4, p. 400-406, 2001.

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

ROGEZ, H.; AKWIE, S. N. L. T.; MOURA, F. G. ; LARONDELLE, Y. Kinetic Modeling of Anthocyanin Degradation and Microorganism Growth during Postharvest Storage of Açaí Fruits (*Euterpe oleracea*). **Journal of Food Science**, v. 77, p. 1300-1306, 2012.

ROGEZ, H., PASCAL, S., BUXANT, R., LOPES, S.Q., COLSONCORBISIER, A.M. **Identificação dos principais fungos e leveduras presentes na polpa do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, 1997, Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro : SBM, 1997. p. 269.

ROSPARS, J. Interactions of odorants with olfactory receptors and other preprocessing mechanisms: how complex and difficult to predict? **Chemical Senses**. v. 38: p. 283-287, 2013.

ROWAN, D. Biosynthesis of straight-chain ester volatiles in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled precursors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, n. 7, 1999.

RUTHER, J.; MEINERS, T.; STEIDLE, J. L. M. **Rich in phenomena-lacking in terms. A classification of kairomones**. Chemoecology. v. 12, n. 4, p. 161-167. 2002.

SABATINI, N.; MUCCIRELLA, M. R.; MARSILIO, V. Volatile compounds in uninoculated and inoculated table olives with *Lactobacillus plantarum* (*Olea europaea* L., cv. Moresca and Kalamata). **LWT- Food Science and Technology**. v. 41, p. 2007-2022, 2008.

SABELIS, M. W.; JANSSEN, A.; PALLINI A.; VENZON, M.; BRUIN, J.; DRUKKER, B.; SCUTAREANU, P. **Behavioral responses of predatory and herbivorous arthropods to induced plant volatiles: From evolutionary ecology to agricultural applications**. In: *Induced Plant Defenses against Pathogens and Herbivores*. St. Paul, MI, USA: APS Press, The American Phytopathological Society. p. 269–298. (1999).

SAGRI (Secretaria de Estado da Agricultura). Estado do Pará. **Estatísticas de Produção**. 2010. Disponível em: www.sagri.pa.gov.br. Acesso em 03 de maio de 2012.

SANTOS-MALLET, J. R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; CARVALHO-MOREIRA, C. J.; Z.; ANDRADE, J. R. COURA T. C. M. Morphobiological aspects of *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) from the Upper and Middle Negro River, Amazon region of Brazil. I- Scanning electron microscopy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100: 915- 923. 2005.

SCHMITZ, S.; CLAYTON, J.; NONGTHOMBA, U.; PRINZ, H.; VEIGEL, C.; GEEVES, M.; SPARROW, J. *Drosophila* ACT88F indirect flight muscle-specific actin is not N-terminally acetylated: A mutation in N-terminal processing Affects actin function. **Journal of Molecular Biology**. v. 295, n. 5, p. 1201--1210. 2000.

SCHOFIELD, C. J. **Triatominae, biología y control**. Eurocommunica Publications, United Kingdom. 1994.

SECCADIO, L. L.; COSTA, H. S. C.; CARAMÊS, E. T. S.; ROGEZ, H. **Attracting of triatominae by Euterpe oleracea fruit and synergism evaluation in the presence of CO₂**. In: 16th World Congresso f Food Science and Technology, Foz do Iguaçu - PR. Brasil. 2012.

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; ZHANG, Y.; LEE, R.; SAND, D.; SCHEULLER, H. S.; HEBER, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 9329–9339. 2006.

SESPA (Secretaria Estadual de Saúde do Pará). Sistema Único de Saúde. Coordenação de Vigilância à Saúde. Departamento de Controle de Endemias. Gerência Técnica em Doenças de Chagas. **Relatório diário de notificações da contaminação da Doença de Chagas no Estado do Pará**. Belém, PA, 2013.

SETTEMBRINI, B. P. Circadian rhythms of locomotor activity in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 21, n. 2, p. 204-212. 1984

SHIREY, E. R. SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. In: PAWLISZYN, J. **Handbook of Solid Phase Microextraction**. Supelco, Bellefonte, PA, USA. 2012. 478p.

SHIRIVASTAVA, M.; DATTA, A. K. Determination of specific heat and thermal conductivity of mushrooms (*Pleurotus florida*). **Journal of Food Engineering**. v. 39, p. 255-260, 1999.

SIGMA-ALDRICH. T705002A – **Solid Phase Microextraction (SPME) Metal Fiber Assemblies**. 2005. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/t405058.Par.0001.File.tmp/t405058.pdf. Acessado em 10 de janeiro de 2012.

SOLIERI, L.; GIUDICI, P. **Vinegars of the world**. Milão: Springer, 2009. 297 p.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparison of different extraction methods for analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 93-103, 2004.

STEFANIAK, A.B., HARVEY, C.J. Dissolution of materials in artificial skin surface film liquids. **Toxicology In Vitro**. v. 20, p. 1265–1283. 2006.

SUOMALAINEN, H. Yeasts and its effect on the flavour of alcoholic beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, v.76, p.422-425, 1970.

SVS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO BRASIL. **Doença de Chagas aguda no município de Santana - Amapá**. Nota Técnica SVS 2005, 04 abr. 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21310>. Acesso em: 09 outubro 2011.

SVS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO BRASIL. Doença de Chagas aguda. **Nota Técnica SVS 2007a**, 09 out. 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas_091007.pdf>. Acesso em: 09 outubro 2011.

SVS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO BRASIL. Doença de Chagas aguda por transmissão oral. **Nota Técnica SVS 2007b**, 26 set. 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2609.pdf>. Acesso em: 09 outubro 2011.

SZAJNMAN, S. H.; RAVASCHINO, E. L.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J. B. Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1,1-bisphosphonates derived from fatty acids against *Trypanosoma cruzi* targeting farnesyl pyrophosphate synthase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.15, n. 21, p. 4685-4690, 2005.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3ª ed., Artmed: Porto Alegre, 2004.
- TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 131-57. 1999.
- UGLIANO, M.; GENOVESE, A.; MOIO, L. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 5073-5078. 2003.
- VALENTE, S. A. S. **Epidemiologia da transmissão oral da doença de Chagas**. Exposição na Mesa Redonda Situação atual da doença de Chagas na Amazônia. XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Florianópolis, 2005.
- VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**. v. 23, n. 4, p. 523-529. 2000.
- 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(1), p. 395-398, 1999.
- VARMING, C.; MIKAEL, A. P.; POLL, L. Comparison of Isolation Methods for the Determination of Important Aroma Compounds in Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Juice, Using Nasal Impact Frequency Profiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, n. 6, p. 1647-1652, 2004.
- VELOSO, S. S. C.; SANTOS, M. L. S. **Aspectos microbiológicos da bebida "Açaí" (*Euterpe oleracea* Mart.) consumida na cidade de Belém**. Trabalho de Conclusão de curso. Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil, 1994.
- VIDAL, D. M. **Identificação e síntese dos componentes do feromônio sexual de *Condylorrhiza vestigialis* (Lep.: Crambidae) e *Edessa meditabunda* (Hem.: Pentatomidae)**. 2012. 207 f. Dissertação (Mestrado em Química, Área de Concentração Química Orgânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2012.
- VITTA, A. C. R. **Caracterização morfológica das glândulas de Brindley e Metasternais, identificação química das suas secreções e comportamento sexual em *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae)**. Dissertação (Mestrado em Entomologia), Universidade Deferal de Viçosa. 2005.
- VITTA, A. C. R.; LORENZO, M. G. Copulation and mate guarding behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 46, p.789-795. 2009.
- VITTA, A. C. R.; SERRÃO, J. E.; LIMA, E. R.; VILELA, E. F. The metasternal and Brindley's glands of *Triatoma brasilienses* neiva (Hemiptera: Reduviidae). **Neotropical Entomology**. v. 38, n. 2, p. 231-236. 2009.
- YANG, C.; WANG, Y.; LIANG, Z.; FAN, P.; WU, B.; YANG, L.; WANG, Y.; LI, S. Volatiles of grape berries evaluated at the germplasm level by headspace-SPME with GC-MS. **Food Chemistry**. v. 114, p. 1106-1114, 2009.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; FILHO, D. F. S.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M. J.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazônica**. v. 41, n. 4, p. 545 – 552, 2011.

YUYAMA, L. K. O.; ROSA, R. D.; AGUIAR, J. P. L.; NAGAHAMA, D.; ALENCAR, F. H.; YUYAMA, K.; CORDEIRO, G. W. O.; MARQUES, H. O. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) and camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) (Mc Vaugh). Do they possess antianemia action? **Acta Amazonica**. v. 32, n. 4, p. 625-633. 2002.

WAGNER, R. **Composição de voláteis e aroma de salames nacionais tipos italiano e milano**. 2008. 299p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

WHO - World Health Organization. **Control of Chagas Disease**. Geneva. WHO Technical Report Series 905, 2002.

WHO. World Health Organization. **Global defense against the infectious disease threat**. Geneve: Mary Kay Kindhauser, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/infectious-disease-news/cds2002/chapter5.pdf>>. Acesso em: 28 set 2011.

WHO. World Health Organization. Chagas: One hundred years later. **World Health Organization**, v. 87, n. 7, p. 491-492, 2009.

ZACHARIAS, C. A.; PONTES, G. B.; LORENZO, M. G.; MANRIQUE, G. Flight initiation by male *Rhodnius prolixus* is promoted by female odors. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 4, p. 449–451, 2010.

ZELEDÓN, R.; RABINOVICH, J. E. Chaga's disease and ecological appraisal with special emphasis on its insects vectors. **Annual Review Entomol**. v. 26, p.101-133. 1981.

WELDEGERGIS, B. T.; VILLIERS, A.; MCNEISH, C.; SEETHAPATHY, S.; MOSTAFA, A.; GÓRECKI, T.; CROUCH, A. M. Characterisation of volatile components of Pinotage wines using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC × GC–TOFMS). **Food Chemistry**. v. 129, p. 188-199. 2011.

WIGGLESWORTH, V. B.; GILLET, J. D. The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the mechanism of orientation to the host. **Journal of Experimental Biology**. v.11, p.120-138. 1934.

WILLMER, P.G. Microclimate and the environmental physiology of insects. **Advances in Insect Physiology**. v. 16, n.1, p.57. 1982.