

Marcella Gallegos de Souza Campos

**UTILIZAÇÃO DE ÁGUA DE COCO (*cocos nucifera*) INDUSTRIALIZADA
COMO CONSERVANTE PARA *Trypanosoma vivax***

Monografia apresentada á Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito parcial do Curso
de Residência Integrada em Medicina
Veterinária.
Área de concentração: Clínica Médica de
Ruminantes
Tutor: Prof. Elias Jorge Facury Filho

**BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG
2014**

Monografia defendida e aprovada em 21 de fevereiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Elias Jorge Facury Filho
Presidente

Prof. Antônio Último de Carvalho

Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

José Azael Zambrano Uribe

Sumário:

Resumo	4
1. Introdução	6
2. Revisão de literatura	7
3. Material e métodos	11
3.1. Obtenção das amostras	11
3.2. Obtenção das parasitemias e tempos analisados	11
3.3. Análise estatística	12
4. Resultados e discussão	12
5. Considerações finais	17
6. Conclusão	17
7. Referências bibliográficas	18

Resumo:

A tripanossomose em ruminantes é uma doença de grande importância na América do Sul. Uma das maiores dificuldades para o diagnóstico por meio de exames parasitológicos é a viabilidade do parasita depois que o sangue é colhido até a realização da análise. O teste de Woo é o exame mais indicado a campo, quando a parasitemia da amostra é baixa, pois apresenta maior sensibilidade entre os diagnósticos parasitológicos da doença. A água de coco vem sendo usada para cultivo de células vegetais, como meio de cultura para cultivo de fungos e protozoários e como diluente de sêmen de diversas espécies. Este trabalho teve como objetivo a utilização da água de coco industrializada como adjuvante no diagnóstico do *Trypanosoma vivax* pelo método de Woo. O estudo foi realizado no mês de julho de 2013, baseado na análise de três parasitemias diferentes, 550000, 100000 e 1000 parasitas/mL. Cada parasitemia possuía 60 amostras, as quais 30 amostras pertencentes ao grupo controle G1 (1 mL sangue infectado) e as outras 30 amostras ao grupo tratado G2 (1 mL de sangue infectado mais 1 mL de água de coco industrializada). Todas as amostras foram avaliadas em cinco tempos (T1: zero hora; T2: 6 horas após diluição; T3: 12 horas após diluição; T4: 24 horas após diluição; e T5: 48 horas após diluição). Para análise estatística dos dados utilizou-se o teste de Qui-quadrado e McNemar com mínimo de 95% de significância ($p < 0,05$), pelo programa SAS. Os resultados obtidos nos tempos avaliados demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos realizados. A utilização da água de coco aumentou a viabilidade do hemoparasita nos tempos T2, T3 e T4. As três parasitemias, quando analisadas separadamente, apresentaram resultados distintos e apontaram sua influência, assim como os tempos envolvidos no estudo.

Palavras-chave: *Trypanosoma vivax*, bovino, método de Woo, água de coco.

Abstract:

Trypanosomiasis in ruminants is a disease of great importance in South America. A major difficulty for parasitological diagnosis is the parasite viability after the blood is collected to perform the analysis. The Woo test is the widely used test when the parasitemia of the sample is low, because it has greater sensitivity. Coconut water has been used for the cultivation of plant cells, adjuvant for culture of fungi and protozoa, and as diluent semen from several species. This study aimed to use the coconut water industrialized as adjuvant in the diagnosis of *Trypanosoma vivax* by the method of Woo. The study was conducted in July 2013, based on the analysis of three different parasitemia, 550000, 100000 and 1000 parasites/mL. Each parasitemia had 60 samples, including 30 samples in the control group G1 (1mL infected blood) and the other 30 samples in the treated group G2 (1 mL of infected blood plus 1 ml of coconut water processed). All samples were analyzed in five times (T1: time zero, T2: 6 hours after dilution, T3: 12 hours after dilution, T4 for 24 hours after dilution, and T5: 48 hours after dilution). For statistical analysis was used the chi- square and McNemar tests, with minimum 95 % significance ($p < 0.05$), in SAS program. The results obtained showed significant differences between the treatments. The use of coconut water increased the viability of hemoparasite at times T2, T3 and T4. The three parasitaemia, when analyzed separately, showed different results and pointed their influence, as well as the time involved in the study.

Key-words: *Trypanosoma vivax*, bovine, Woo test, coconut water.

1. Introdução

O hemoparasita *Trypanosoma vivax* é uma dos agentes causadores da tripanossomíase em ruminantes, entre eles bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos. Considerada doença de grande importância para a pecuária por gerar perdas na produtividade animal, esta enfermidade ocorre principalmente no continente Africano, em áreas onde seu vetor biológico está presente, a mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.). Entretanto, pela alta adaptabilidade do parasita à forma de transmissão, tornou-se epidemiologicamente importante no continente Americano, com registros de casos na América Central e do Sul (Paiva, 2009).

Fora do habitat natural da mosca tsé-tsé ocorre a transmissão mecânica do hemoparasita, através de insetos hematófagos como os tabanídeos e a *Stomoxys calcitrans*. As moscas picadoras são capazes de transmitir mecanicamente o *Trypanosoma vivax* por meio de suas peças bucais ao se alimentarem em mais de um hospedeiro em curto intervalo de tempo. Outra forma de transmissão mecânica pode ocorrer do modo iatrogênico através da utilização de uma mesma agulha por vários animais durante a aplicação de medicamentos ou vacinações (Vargas e Arellano, 1997; Jones e Dávila, 2001). A transmissão transplacentária nos ruminantes também é considerada importante na epidemiologia da doença (Paiva, 2009).

Levine (1973) reportou a ocorrência de *T. vivax* também em equinos e em outros estudos, têm-se encontrado suínos parasitados por *T. vivax* (Simo et al., 2006; Nimpaye et al., 2011). Alguns animais silvestres como o veado, coelhos e porcos selvagens são considerados reservatórios em potencial do parasita. Estes possuem resistência à doença associada a um longo período de parasitemia, possibilitando o surgimento de casos no ambiente doméstico, devido ao

contato entre esses animais e os animais de produção (Lafferty, 1997).

O primeiro relato de *T. vivax* no Brasil ocorreu em 1946 no estado do Pará, por Boulhosa. Diagnósticos em 1981 no Amapá, 1996 em Mato Grosso, 2002 na Paraíba e 2008 nos estados do Maranhão e Minas Gerais, demonstram a adaptabilidade e o favorecimento à expansão do agente etiológico pela movimentação dos rebanhos bovinos dentro do território nacional (Serra Freire, 1981; Silva et al., 1996; Batista, 2006; Guerra et al. 2008; Carvalho et al., 2008).

Uma das maiores dificuldades para o diagnóstico da tripanossomíase nos exames parasitológicos é a viabilidade do parasita depois que o sangue é colhido até a realização da análise. O teste de Woo é o método indicado quando a parasitemia da amostra é baixa, até 700 parasitas/mL, porém esta exerce influência na confirmação pelo teste (Desquesnes e Tresse, 1996). Piñeres et al. (2009) realizaram estudo de criopreservação do *T. vivax*, com o objetivo de ampliar o tempo de vida do parasita, porém as amostras não apresentaram resultados satisfatórios no teste de Woo após o descongelamento, concluindo que a temperatura ambiente favorece a viabilidade do hemoparasita.

A água de coco vem sendo usada para cultivo de células vegetais (Soares et al. 2013), como meio de cultura para cultivo de fungos patogênicos e como diluente de sêmen das espécies ovina, caprina e suína (Blume e Marques, 1994). A mesma ainda é utilizada para enriquecer meios de cultura de *Tritrichomonas foetus*, protozoário parasita do sistema reprodutivo dos bovinos (Martins et al. 2004) e no desenvolvimento de tecidos destinados ao estudo da biossíntese de vírus vegetais (Carvalho et al. 2006).

A utilização da água de coco industrializada ao invés de in natura para a

diluição das amostras no presente experimento, foi baseada no estudo realizado anteriormente por Paula Motta et al. (2013), que constatou uma viabilidade mais prolongada em amostras de sangue com *T. vivax* diluídas em água de coco industrializada quando comparadas às diluídas em água de coco in natura. Além disso, o produto industrializado agrega facilidade de acesso, transporte, aumento do prazo de validade e custo na obtenção.

A industrialização da água de coco tornou possível a distribuição do produto para todas as regiões brasileiras, o que permite fácil acesso ao consumidor e maior vida útil. Os métodos de conservação utilizados pela indústria, como a adição de metabisulfito de sódio, têm como função a inibição da ação de enzimas oxidativas e a garantia da estabilidade microbiológica da água após abertura do fruto, além de manter, o máximo possível, suas características sensoriais originais (Aragão et al., 2001; Carvalho et al., 2006).

Objetivou-se com este trabalho avaliar a utilização da água de coco industrializada como conservante no diagnóstico do *Trypanosoma vivax* pelo método de Woo.

2. Revisão de Literatura

As principais espécies causadoras de tripanossomíase em animais domésticos na América do Sul são o *Trypanosoma cruzi*, *T. equiperdum*, *T. evansi* e *T. vivax*, sendo os três últimos os mais patogênicos e de maior relevância veterinária (Clarkson, 1976).

O *Trypanosoma vivax* foi introduzido na América Latina pela importação de gado zebu do Senegal para Guiana Francesa e Antilhas em 1830 (Leger e Vienne, 1919) e disseminou-se rapidamente por sua alta capacidade de adaptação e por ser transmitido mecanicamente por moscas hematófagas (Silva et al., 2002). A doença pode causar perdas econômicas significativas de até

47% na redução do lucro em um rebanho leiteiro, com elevados índices de mortalidade dos animais adultos, aumento do número de abortos e queda expressiva na produção de leite, (Abrão, 2009).

O protozoário eucariótico *Trypanosoma vivax* (*Duttonella*) pertence ao grupo Salivaria. As formas tripomastigotas encontradas na corrente sanguínea apresentam cinetoplastos grandes, em forma de meia lua, localizado na porção terminal. Possui um único flagelo livre e tem comprimento que varia de 16 µm a 23 µm, além de corpo alongado, achatado, extremidades afiladas e membrana ondulante reduzida (Dávila et al, 1998). Apesar de ser um parasita de sangue circulante, possui capacidade migratória para outros tecidos do hospedeiro vertebrado, sugerindo sua participação em lesões inflamatórias, degenerativas de órgãos como coração (Masake, 1980; Kimeto et al., 1990), sistema nervoso central (Batista et al., 2007; Batista et al., 2008) e sistema reprodutivo (Bezerra et al., 2008).

O período de incubação da infecção por *T. vivax* é variável. Em caprinos e ovinos este período varia de quatro a doze dias, já nos bovinos atinge de nove a quatorze dias, podendo chegar aos 59 dias, dependendo da virulência da amostra do parasita (Osório et al, 2008).

A patogenia da tripanossomíase por *T. vivax* é influenciada por fatores ligados ao hospedeiro, como susceptibilidade e resposta do sistema imunológico do animal, e também por fatores inerentes ao parasita, como a virulência da amostra (Anosa, 1983). O resultado dessa interação influencia o curso da infecção, que pode se manifestar de forma aguda, subaguda e crônica, bem como apresentar sinais clínicos variados, como anemia, anorexia, atraso no crescimento, perda de peso, aborto, redução da fertilidade e queda na produção de leite

(Paiva, 2009). O fenômeno conhecido como tripanotolerância pode ocorrer em ruminantes com infecção crônica por *T. vivax*, permanecendo como portadores clinicamente normais durante um longo período, o que favorece a disseminação em rebanhos. A tripanotolerância permite que o indivíduo controle o desenvolvimento dos parasitas e limite os efeitos patológicos associados à doença, assim como os níveis de parasitemia (Silbermayr et al., 2013). Isso ocorre devido à maior produção de anticorpos, especialmente IgG1, por esses animais, contra antígenos do tripanossoma, associada a resposta mais rápida dos linfócitos T, capazes de reconhecer os antígenos que se modificam no agente, diferente de um animal que apresenta o quadro normal da doença, com uma resposta transitória do sistema imune (Paling e Dwinger, 1993).

Em uma infecção superaguda encontra-se uma parasitemia alta e persistente, geralmente associada à morte do animal. Na infecção aguda a parasitemia é alta e na fase crônica ocorre baixa parasitemia, que pode se estender por vários meses, ou reaparecer em casos de imunossupressão do indivíduo (Madruga, 2004).

Os principais sinais clínicos geralmente encontrados são palidez de mucosas, anemia, perda progressiva de peso, anorexia, febre, diarreia, sintomas de ordem neurológica, caracterizando neuropatias (Batista, 2007), desordens reprodutivas como aborto no terceiro trimestre de gestação e mortalidade perinatal nas fêmeas (Silva et al., 2013) e lesões degenerativas causadas por processos inflamatórios nos testículos e epidídimo nos machos, assim como alterações na viabilidade espermática (Sekoni et al., 2004; Bezerra et al., 2008).

A anemia causada na tripanossomíase é atribuída à hemólise intra e extra-vascular, com diminuição da eritropoiese e hemorragias, caracterizada como normocítica normocrômica, com tendência a se tornar macrocítica normocrômica. Ao exame de esfregaços sanguíneos observa-se anisocitose, policromasia e presença de corpúsculos Howell–Jolly. Apesar de sua natureza não ter sido completamente elucidada, a anemia constitui-se na maior causa de morbidade nas tripanossomíases bovinas, podendo ser usada como parâmetro para monitorar a intensidade da doença no rebanho (Saror, 1979).

O diagnóstico das tripanossomíases pode ser feito por métodos parasitológicos, imunológicos ou de biologia molecular. O método parasitológico é o mais utilizado no Brasil para o diagnóstico das infecções clínicas por *T. vivax* em rebanhos bovinos (Madruga, 2004).

Na fase aguda, quando os tripanossomas são abundantes na corrente sanguínea, a identificação morfológica do parasita é possível através de métodos parasitológicos diretos, por meio de exames de sangue fresco entre lâmina e lamínula (Gardiner, 1989). O sangue é mantido aquecido e examinado imediatamente à procura de tripanosomas com movimento ativo. Outro método parasitológico é a confecção de esfregaços com gota espessa, corados pelo método de Giemsa, porém necessitam de confirmação por esfregaços finos corados pelo mesmo método (Wilson, 1971).

Os esfregaços sanguíneos finos corados pelo método de Giemsa, observados em microscopia óptica, são uma opção para confirmação e diferenciação das espécies de *Trypanosoma* pelo tamanho, forma do corpo, posição do núcleo, do cinetoplasto e grau de desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo (Silva et al., 2002). Entretanto, durante a infecção, com a cronicidade da doença, ocorrem

flutuações da parasitemia, devido às mudanças de antígenos proteicos do hemoparasita com a finalidade de não ser reconhecido e destruído pelo sistema imunológico do hospedeiro, tornando-se difícil o encontro de parasitos em esfregaços sanguíneos (Madruga et al., 2006).

Quando a parasitemia torna-se baixa e intermitente, a sensibilidade do método parasitológico direto pode aumentar com a técnica da centrifugação do sangue em tubo capilar, conhecida como técnica do microhematócrito de Woo (1970). Tal técnica consiste no preenchimento de um tubo capilar de vidro para cada amostra de sangue, centrifugação a 5.000 rpm por cinco minutos e leitura deste tubo em microscópio ótico, com aumento de 40x, para visualização das formas sanguíneas, que se concentram entre o plasma e a camada leucocitária. Quebrando-se o capilar entre a camada líquida e a camada celular e depositando-se duas a três gotas em lâmina de vidro, um esfregaço corado com Panótico Rápido pode ser confeccionado, esta técnica é chamada Buffy Coat (Murray et al., 1977).

A inoculação em camundongos também é uma prática no diagnóstico das tripanossomíases com boa sensibilidade. Consiste na inoculação via intraperitoneal ou intramuscular de 0,2 ml de sangue infectado em camundongos, que são acompanhados pela determinação da parasitemia e/ou mortalidade (Silva et al., 2002). Entretanto, autores apontam que a inoculação em camundongo seja pouco sensível na detecção de algumas amostras de *T. vivax* (Murray et al., 1977; Kalu et al., 1986).

Os testes sorológicos são mais indicados em inquéritos epidemiológicos quando existe possibilidade de infecção subclínica ou doença crônica no rebanho (Eisler et al., 1998; Ventura et al., 2001). O ensaio imunoenzimático (ELISA) e as reações de imunofluorescência indireta (RIFI) são os métodos mais comumente

utilizados para o diagnóstico sorológico. A detecção de anticorpos anti-tripanosoma em soros de animais infectados fornece informações exatas a respeito da situação da doença, porém não apresentam especificidade capaz de diferenciar as espécies (Desquesnes e Tresse, 1996; Silva et al., 2002).

Na América do Sul, a utilização do ELISA em estudos sorológicos torna-se viável devido à ausência de espécies de tripanosomas que induzam resposta imune capazes de gerar reações cruzadas com os antígenos do *T. vivax*, diferente do continente Africano, onde o *T. congolense* interfere nos resultados. Além disso, *T. theileri*, que ocorre na América Latina, não apresenta reação cruzada com antígenos de *T. vivax*. A sensibilidade do ELISA chega a 97,6% e sua especificidade a 96,9%, porém reações cruzadas com outros hemoparasitas, como *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*, podem ocorrer em 5,5% dos testes (Madruga et al., 2006).

No caso da RIFI são utilizados tripanosomas inteiros fixados para a demonstração de anticorpos, não havendo reação cruzada entre o *T. vivax* e outros hemoparasitos, como *Anaplasma marginale*, *Eperythrozoon* sp., *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*. Este método pode ser utilizado para detecção da tripanossomíase, porém possui baixa especificidade quando comparado aos métodos moleculares, que ultrapassam 99,0% (Platt e Adams, 1976; García et al., 2006).

As técnicas moleculares são baseadas na identificação do DNA dos tripanosomas, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresenta alta especificidade e permite detectar pequenas quantidades do DNA do parasito nas amostras, possibilitando o diagnóstico definitivo da infecção através da identificação precoce e específica do parasita. Apesar do custo mais elevado para sua realização, o diagnóstico por meio de método molecular possui uma maior

especificidade (Masake et al., 1997). O método de PCR também permitiu avanços na caracterização genética e taxonômica das diferentes cepas de *T. vivax*, com maior precisão e confiabilidade (Desquesnes e Dávila, 2002).

Em relação ao tratamento da doença os medicamentos encontrados na literatura são diaceturato de diminazene, brometo de homidium, cloreto de homidium e cloreto de isometamidium (Silva et al., 2004). O tratamento ou profilaxia da tripanossomíase depende de uso correto das bases medicamentosas, sendo importante a identificação dos parasitos envolvidos, a fim de evitar o estabelecimento de resistência aos antiparasitários (García et al., 2006).

Poucos estudos são realizados com a utilização de adjuvantes na conservação do *T. vivax* para ampliar sua viabilidade e aumentar a sensibilidade dos testes parasitológicos. Piñeres et al. (2009) avaliaram o tempo de sobrevivência do *T. vivax* refrigerado sem conservantes, em temperatura ambiente sem conservantes e criopreservado com a utilização de DMSO 5% e glicerol 10%. O protozoário apresentou uma maior viabilidade em temperatura ambiente quando comparado ao refrigerado, avaliados até oito horas após a coleta. Em relação à criopreservação constatou-se que a técnica deve ser realizada em duas etapas com nitrogênio, inicial gasosa e depois líquida, com melhores resultados utilizando-se o criopreservador glicerol 10%.

A água de coco, por ser uma solução estéril, ligeiramente ácida, composta de proteínas, sais, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhe conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, é constantemente utilizada na área da biotecnologia da reprodução das espécies animais, pois fornece os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e a viabilidade dos gametas masculinos e

femininos nos processos de criopreservação (Carvalho et al. 2006). A água de coco apresenta composição de aminoácidos semelhante a do leite, porém com maior porcentagem de arginina, alanina, cistina e serina (Aragão, 2001). Foi isolada da água de coco uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-indol-acético, o qual confere aos espermatozoides um aumento na motilidade e na porcentagem de espermatozoides vivos, elevando assim a taxa de fertilidade (Carvalho et al. 2006).

A água de coco in natura apresenta em sua composição básica 93% de água, 5% de açúcares, além de proteínas, vitaminas, sais minerais, grau brix igual a 7,0 (21°C) e pH igual a 4,8. Cada 100 mL de água de coco contém 4,4 g de glicose; 0,37 mg de proteínas; 6,2 mg de fósforo; 175 mg de potássio; 17,5 mg de cálcio; 8,5 mg de magnésio; 10,5 mg de sódio; 0,06 mg de ferro e 57 mg de vitamina C. Com o progresso da maturação do fruto Aragão et al. (2001) observaram redução no volume de água, nos açúcares, sólidos totais, enquanto os teores de gordura e proteína aumentaram significativamente. O pH no fruto chega a elevar-se acima de 5 até o final da sua maturação. A legislação brasileira permite a adição de ácido cítrico para correção da acidez no caso da água-de-coco submetida a algum processo tecnológico de conservação (BRASIL, 2002).

Atualmente, existe no mercado a água de coco processada por UHT (ultra high temperature), comercializada em embalagens cartonadas. O processo de esterilização visa à destruição de todos os microrganismos presentes no alimento e tem como consequência a redução das alterações físicas e químicas no produto (Penha et al. 2010). A industrialização da água de coco com a utilização de conservantes propicia uma redução dos níveis de contaminação, garantindo a segurança alimentar e aumentando o tempo de prateleira do produto, por tratar-se de um meio extremamente suscetível ao

crescimento microbiano (Aragão et al., 2001).

A adição do conservante metabissulfito de sódio provoca modificações nas características físico-químicas da água de coco como pH, sólidos solúveis totais, cor e açúcares redutores que influenciam os atributos de sabor e aparência (Costa et al. 2005). O mesmo pode ser responsável pelo elevado teor de sódio encontrado nas amostras comerciais. O sulfito em alimento possui a função de inibir o escurecimento enzimático, pois desativa a ação de enzimas como a polifenoloxidase (Naozuka et al. 2004). Segundo Laurila et al. (1998), os sulfitos são agentes multifuncionais e possuem capacidade controladora do desenvolvimento microbiológico nos alimentos. Devido à sua ação antioxidante, o metabissulfito de sódio sequestra o oxigênio tanto da água quanto do alimento, gerando assim um ambiente anaeróbio, o que conseqüentemente causa interferência sobre os microrganismos aeróbios presentes. Todavia, os aeróbios que têm capacidade de serem anaeróbios facultativos e os anaeróbios são favorecidos com esta redução do oxigênio (Góes et al. 2006).

Nos tripanosomatídeos, ocorrem taxas parecidas do consumo de glicose tanto em anaerobiose quanto em aerobiose, o que é característico de um metabolismo fermentativo (Tielens, 1998). No caso da glicólise anaeróbica no hemoparasita, a enzima glicerol quinase é essencial para o processo, produzindo ATP a partir do glicerol (Ely, 2011).

Possibilitar um aumento do tempo de vida do *Trypanosoma vivax* após a coleta do material infectado poderia contribuir no diagnóstico parasitológico da doença, principalmente nas fases com menor parasitemia circulante. A dificuldade do diagnóstico confirmatório por um método parasitológico nas propriedades do país, comumente distantes de laboratórios e de mão de obra qualificada, incentivou a

realização do estudo. Objetivo-se avaliar a viabilidade do *T. vivax* utilizando a água de coco industrializada como possível conservante nas amostras.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção das amostras

O estudo foi realizado no mês de julho de 2013, no laboratório da Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica e Cirurgias Veterinárias da Universidade Federal de Minas Gerais. O sangue parasitado com *T. vivax* foi oriundo de um carneiro previamente inoculado para obtenção de antígeno destinado à confecção de exames sorológicos da doença. Este procedimento foi aprovado pelo CETEA UFMG, segundo protocolo 143/2008.

O carneiro era um macho castrado de 30 kg de peso vivo, sem raça definida, e foi inoculado com 1 mL de inóculo preservado em nitrogênio líquido (10^7 trypanosomas/mL). O período de incubação foi de 15 dias e foram observados sintomas como febre, anorexia, desidratação moderada e mucosas levemente hipocoradas. O sangue infectado foi obtido no 17º dia após a inoculação, através da punção da veia jugular em tubos com sistema de vácuo, contendo EDTA como anticoagulante. Nesse momento, a parasitemia era de 550000 parasitas/mL. O animal foi tratado uma semana depois do surgimento dos sintomas da doença com diaceturato de diminazene na dose de 3,5 mg/kg por via intramuscular, segundo indicação do fabricante (Hertape Calier Saúde Animal S/A).

3.2 Obtenção das parasitemias e tempos analisados

O diagnóstico parasitológico foi realizado pelo método de Woo (1970). A determinação da parasitemia do *T. vivax* foi realizada de acordo com Brener (1961). Foi utilizado 5µl de sangue entre

lâmina/lamínula (22 x 22 mm) e realizou-se a leitura de 50 campos microscópicos. O número de parasitos observados foi multiplicado pelo fator 80, obtendo-se o número de tripanossomas em 5µl de sangue.

O experimento foi baseado na análise de três parasitemias diferentes, com dois tratamentos por parasitemia e cinco tempos de análise pós coleta.

As parasitemias utilizadas foram 550000, 100000 e 1000 *T. vivax*/mL. Inicialmente, o sangue coletado apresentou uma parasitemia de 550000 de *T. vivax*/mL e para a obtenção das duas parasitemias menores (100000 e 1000 *T. vivax*/mL), esta amostra foi diluída utilizando-se sangue de um ovino saudável compatível, através do teste de compatibilidade sanguínea pela prova cruzada, segundo Brown e Vap (2007). Após a diluição, as novas amostras obtidas foram avaliadas quanto à parasitemia de acordo com Brener (1961).

As amostras foram divididas em dois tratamentos, o grupo G1, controle, e o grupo G2, tratado. O G1 possuía apenas 1 mL de sangue infectado, enquanto o G2, 1 mL de sangue infectado com a adição de 1 mL de água de coco industrializada. Cada parasitemia possuía 30 amostras em cada tratamento, totalizando 180 amostras.

Não foi levada em consideração a diluição da parasitemia que ocorreu no grupo G2, devido à adição da água de coco industrializada, o estudo possuía como objetivo maior um método fácil e prático para conservar o parasita por mais tempo até a chegada de uma possível amostra infectada a um laboratório para confirmação da doença.

O produto utilizado na diluição das amostras do G2 foi da marca Kerococo® (® Pepsico do Brasil LTDA) e

obteve em análise com phmetro, pH 5,04, osmolaridade de 322 mEq/L em osmômetro e cerca de 0,055 g de açúcares/mL, segundo informações da tabela nutricional do produto.

Todas as amostras foram avaliadas em 5 tempos: T1-zero hora; T2-6 horas após diluição; T3-12 horas após diluição; T4-24 horas após diluição; e T5-48 horas após diluição. O tempo de 6 horas pós coleta para a primeira análise, foi escolhido baseado na observação de Woo (1970), de acordo com a viabilidade máxima do parasita enviado para diagnóstico. Durante os intervalos de análise, as amostras permaneceram acondicionadas em geladeira, a 7°C. Antes de cada análise foram homogeneizadas durante 3 minutos, como descrito por Desquesnes e Tresse (1996).

3.3 Análise estatística

Para análise estatística utilizou-se análise de contingência, que comparou a frequência de amostras positivas entre os tratamentos, os grupos com diferentes parasitemias e entre os tempos, pelo teste de Qui-quadrado e McNemar, com mínimo de 95% de significância ($p < 0,05$), pelo programa SAS.

4. Resultados e Discussão

A utilização da água de coco industrializada aumentou a viabilidade do hemoparasita depois de 6, 12 e 24 horas de diluição. No momento zero, todas as amostras confirmaram-se positivas e 48 horas após a diluição todas as amostras confirmaram-se negativas, como demonstrado na tabela 1 e no gráfico 1.

Tabela 1. Frequência de amostras de sangue positivas para *Trypanosoma vivax* no teste de Woo, de acordo com o tratamento da amostra (G1–controle e G2–água de coco industrializada) e tempo de coleta (T1–0, T2–6h, T3–12h, T4–24h e T5–48h).

	T1	T2	T3	T4	T5
G1	100% A	44,4% a B	22,2% a C	1,1% a D	0%
G2	100% A	58,8% b B	37,7% b C	11,1% b D	0%

*Resultados seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente em relação ao tratamento, pelo teste de Quiquadrado X^2 ($p < 0,05$).

** Resultados seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente em relação ao tempo, pelo teste de McNemar X^2 ($p < 0,05$).

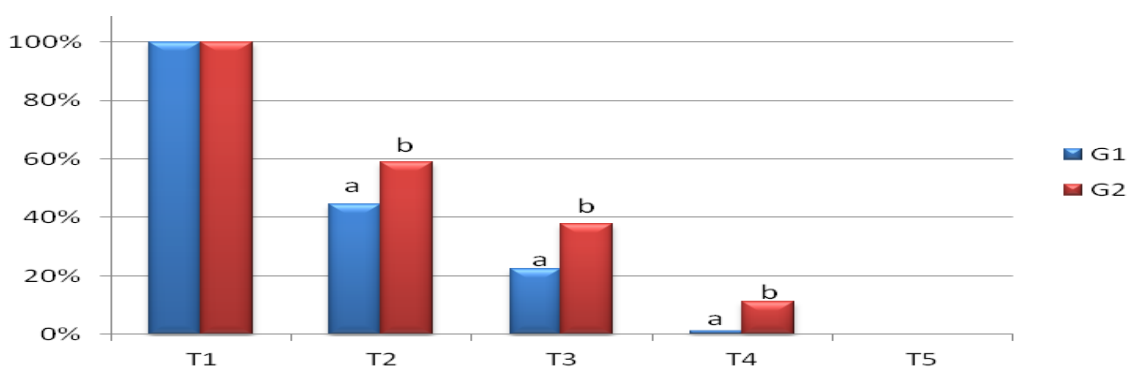


GRÁFICO 1. Frequência de amostras de sangue positivas no teste de Woo, de acordo com o tratamento (G1–Controle e G2–Tratado com água de coco industrializada) da amostra e tempo de coleta (T1–0, T2–6h, T3–12h, T4–24h e T5–48h). (a-b) Resultados com diferença estatística ($p < 0,05$).

O pH do sangue bovino varia entre 7,31 e 7,41 e sua osmolaridade entre 280 a 320 mEq/L (Cunningham, 1993). O fato do aproveitamento da água de coco seco, mais maduro e conseqüentemente com pH mais elevado, para a produção de água de coco longa vida a partir do ano 2000, pode ser um fator prevalente para o valor do pH obtido na amostra utilizada (Carvalho et al. 2006). Durante o processamento da água de coco, podem ser adicionados açúcares exclusivamente para correção e padronização do teor de sólidos solúveis do produto, como a sacarose, em quantidade não superior a 1,0 g/100 mL (Penha et al. 2010), fato este que pode haver influenciado positivamente na

viabilidade do *T. vivax*, devido a grande quantidade energia disponível no meio para a utilização do parasita. Os dados obtidos, apresentados na tabela 1 demonstram que a utilização da água de coco industrializada aumentou em até 24 horas a viabilidade do parasita nas amostras, ultrapassando o tempo limite para diagnóstico positivo no exame de Woo (1970).

Quando analisadas separadamente as diferentes parasitemias demonstraram relevância nos resultados obtidos em relação à viabilidade do protozoário. Na tabela 2, estão demonstrados os resultados das parasitemias testadas nos tempos, de acordo com os tratamentos utilizados.

Tabela 2. Frequência de amostras de sangue positivas para *Trypanosoma vivax* no teste de Woo, de acordo com as parasitemias (550000, 100000 e 1000 parasitas/mL), o tratamento da amostra (G1 – controle e G2 – água de coco industrializada) e tempo de coleta (T1–0, T2–6h, T3–12h, T4–24h e T5–48h).

	550000 <i>T. vivax</i> /mL		100000 <i>T. vivax</i> /mL		1000 <i>T. vivax</i> /mL	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2
T1	100% A	100% A	100% A	100% A	100% A	100% A
T2	100% A	100% A	20% a B	40% b B	13,3% a B	36,6% b B
T3	66,6% a B	93,3% b A	0% a	20% b C	0%	0%
T4	3,3% a C	33,3% b B	0%	0%	0%	0%
T5	0%	0%	0%	0%	0%	0%

*Resultados seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha, dentro de cada parasitemia, diferem estatisticamente em relação ao tratamento, pelo teste de Quiquadrado X^2 ($p < 0,05$).

**Resultados seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente em relação ao tempo, pelo teste de McNemar X^2 ($p < 0,05$).

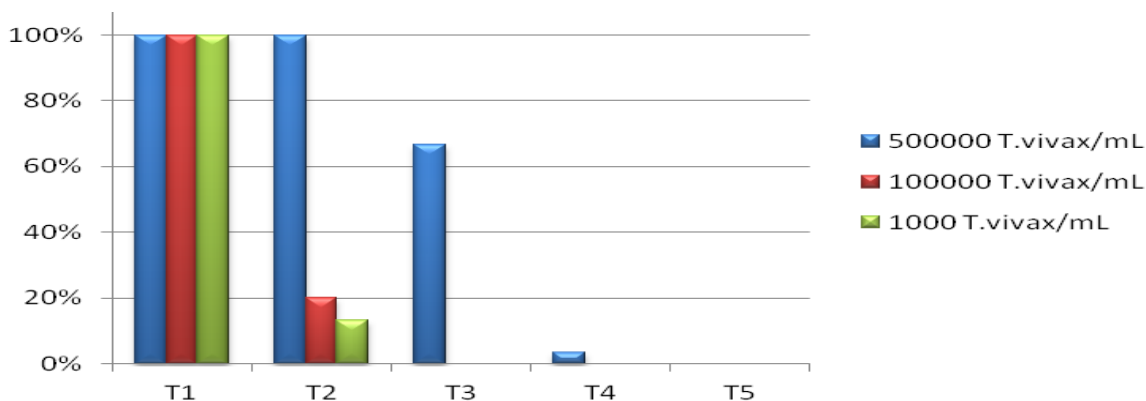


GRÁFICO 2. Efeito do tratamento (grupo Controle) nos tempos (T1–0, T2–6h, T3–12h, T4–24h e T5–48h) nas três parasitemias (550000, 100000 e 1000 *t. vivax*/mL) na detecção de amostras positivas no teste de Woo.

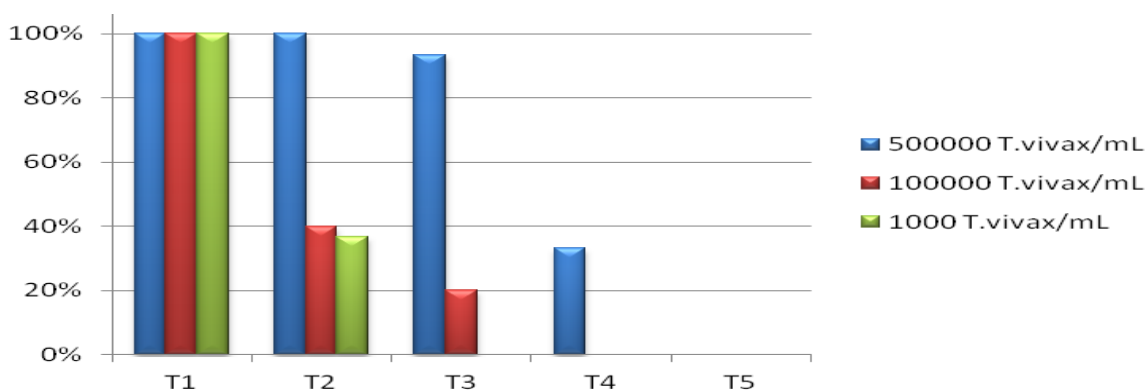


GRÁFICO 3. Efeito do tratamento (grupo Tratado com água de coco industrializada) nos tempos (T1–0, T2–6h, T3–12h, T4–24h e T5–48h) nas três parasitemias (550000, 100000 e 1000 *t. vivax*/mL) na detecção de amostras positivas no teste de Woo. (*) Resultados com diferença estatística.

Os grupos G1 e G2 apresentaram resultados distintos e demonstraram influência das parasitemias testadas, nos

tempos e de acordo com tratamento envolvido. Perante os dados demonstrados na tabela 2 independente da parasitemia da

amostra o tempo influencia em sua viabilidade, porém quanto maior for a parasitemia mais tempo ela permanece positiva. Em relação ao tratamento utilizado, observou-se um maior número de amostras positivas por mais tempo com o uso da água de coco como conservante do hemoparasita nas três parasitemias, apesar da influência direta das mesmas nas amostras, como visualizado nos gráficos 2 e 3. Segundo estudos de Desquesnes e Tresse (1996) a sensibilidade do teste de Woo atinge 100% com parasitemia acima de 700 tripanosomas/ml de sangue, 80% entre 300 e 700 parasitos, 50% entre 60 e 300 parasitos, e muito baixa quando se tem menos de 60 tripanosomas/ ml de sangue. De acordo com Wang (1984) a influência da parasitemia elevada em uma amostra sanguínea pode sofrer variação da susceptibilidade de cada indivíduo eucariótico presente, como também pode haver diferença na utilização da glicose pelos mesmos.

No caso do *T. brucei* ocorre utilização de 85 nmol de glicose por minuto com a finalidade de divisão do parasito uma vez a cada sete horas, o que tornaria o número de tripanosomas encontrados na corrente sanguínea mais elevado. Como o rendimento energético da glicólise é baixo e as formas tripomastigotas utilizam apenas a glicose como fonte energética, a demanda pelo açúcar é alta, e apesar desta ser abundante nos fluidos de seus hospedeiros vertebrados em condições normais, uma hipoglicemia pode ser observada em animais infectados na fase aguda (Wang, 1984). Segundo Ely (2011), o simples metabolismo energético da glicólise é comum a todos os tripanosomatídeos, porém existem pequenas e significativas diferenças entre os vários organismos, não só entre as espécies, mas também entre fases distintas do ciclo de vida da mesma espécie. Ao contrário da maior parte dos eucariotos onde a glicólise ocorre no citoplasma, nos tripanosomatídeos esta via ocorre em uma organela denominada

glicossomo. Eles não utilizam a cadeia respiratória ou fosforilação oxidativa para a produção de ATP, o principal produto final da degradação da glicose na maioria dos tripanosomatídeos é o acetato, exceto para as formas tripomastigotas de *T. brucei* que excretam piruvato. Em relação ao *T. vivax*, mais estudos são necessários para a identificação de possíveis diferenças em seu metabolismo.

5. Considerações Finais

A utilização de um meio que possa proporcionar ao hemoparasita um maior aporte de nutrientes pode possibilitar um acréscimo no tempo de viabilidade, auxiliando em um diagnóstico confirmatório da doença em casos agudos de forma eficaz, rápida e com baixo custo para realização.

Apesar da influência do nível de parasitemia e do tempo para realização do método de Woo, o uso de água de coco industrializada nas amostras possibilitou um maior tempo de viabilidade das mesmas em relação ao grupo G1 controle. Mais estudos são necessários para elucidar o real metabolismo do *Trypanosoma vivax* com o intuito de auxiliar tanto nas características da própria doença, como nos métodos diagnósticos e novos tratamentos possíveis para a tripanossomíase.

6. Conclusão

A utilização da água de coco industrializada como conservante para a sobrevivência do hemoparasita *Trypanosoma vivax* demonstrou ser eficaz, no diagnóstico confirmatório da doença pelo teste de Woo. O método também contribuiu com o aumento do tempo de viabilidade das amostras com baixa parasitemia, possibilitando maiores chances de um diagnóstico confirmatório da doença na fase aguda, por meio de material enviado a laboratório para análise.

7. Referências Bibliográficas

- ABRÃO, D.C.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; SATURNINO, H.M.; RIBEIRO, M.F.B. Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no estado de Minas Gerais. **Ciê. Anim. Bras.**, v.1, p.672-676, 2009.
- ANOSA, V.O.; KANEKO, J.J. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): Hematologic, erythrocyte biochemical, and iron metabolic aspects. **Am. J. Vet. Res.**, v.44, p.639-644, 1983.
- ARAGÃO, W.M.; ISBERNER, I.V.; CRUZ, E.M.O. Água de coco. Aracajú: **Embrapa CPATC/ Tabuleiros Costeiros**, 2001.
- BATISTA, J.S.; BEZERRA, F.S.B.; LIRA, R.A.; CARVALHO, J.R.G.; NETO, A.M.R.; PETRI, A.A.; TEIXEIRA, M.M.G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.**, v.28, p.63-69, 2008.
- BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA, R.C.; GUERRA, J.L. Experimental infection by *Trypanosoma vivax* in sheep. **Pesq. Vet. Bras.**, v.26, n.1, p.31-37, 2006.
- BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M.M.G.; MADRUGA, C.R.; SIMÕES, S.D.V.; MAIS, T.F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semi-arid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Vet. Parasitol.**, v.143, p.174-181, 2007.
- BEZERRA, F.S.B.; GARCIA, H.A.; ALVES, H.M.; OLIVEIRA, I.R.; SILVA, A.E.; TEIXEIRA, M.M.; BATISTA, J.S. *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. **Pesq. Vet. Bras.**, v.28, p.575-582, 2008.
- BLUME, H., MARQUES, A. P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 1994.
- BOULHOSA, J. Informação Científica, **Boletim Técnico Ministério da Agricultura**, p.21-26, 1946.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 9, 29 de maio de 2002. Anexo 1.39. Documento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Disponível em:** <<http://www.sistemasweb.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 22 jan. 2014.
- BRENER, Z. **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas**. 1961. 100f. Tese (Livre docência)-Faculdade de Odontologia e Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1961.
- BROWN, D.; VAP, L. Princípios sobre transfusão sanguínea e reação cruzada. In: THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2007. Cap.15, p.188-198.
- CARVALHO, A.U.; ABRÃO, D.C.; FACURY FILHO, E.J.; PAES, P.R.O.; RIBEIRO, M.F.B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.3, 2008.
- CARVALHO, J. M., MAIA, G. A., SOUSA, P. H. M., MAIA Jr, G. A. Água de coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v.27, n.3, p.437-452, 2006.
- CLARKSON, M.J. Trypanosomiasis of domesticated animals of South America. Seminar on Trypanosomiasis – Species of the subgenus and their potential usefulness. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**; v.70, n.2, p.125-126, 1976.

- COSTA, L. M. C., MAIA, G. A., COSTA, J. M. C., FIGUEIREDO, R. W., SOUSA, P. H. M. Avaliação de água de coco obtida por diferentes métodos de conservação. **Ciê. agrotec.**, Lavras, v.29, n.6, p. 1239-1247, 2005.
- CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993, 454 p.
- DÁVILA, A. M. R., RAMIREZ, L., SILVA, R. A. M. S. *Trypanosoma vivax* en Amérique: morphométrie et spectre d'hôtes. **Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v.51, n.1, p.29-35, 1998.
- DESQUESNES, M., TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*. **Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v.49, n.4, p.315-321, 1996.
- DESQUESNES, M.; DÁVILA, A.M.R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Vet. Parasitol.**, v.109, p.213-231, 2002.
- EISLER, M. C. et al. Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISA for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. **Vet. Parasitol.**, v.79, p.187-201, 1998.
- ELY, Carolina Schroeder. **Amplificação e clonagem da região codificante do gene da enzima glicerol quinase de *Trypanosoma evansi***. Lages, UDESC, 2011. 50 f. Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal-CAV, Lages, Santa Catarina, 2011.
- GARCÍA, H.; GARCÍA, M.E.; PÉREZ, G.; BETHENCOURT, A.; ZERPA, É.; PÉREZ, H.; MENDONZA-LEÓN, A. Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.100, n.4, p.297-305, 2006.
- GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Adv. Parasitol.**, v.28, p.229-317, 1989.
- GÓES, L. M. N. B., MENDES, P. P., MENDES, E. S., RIBEIRO, C. M. F., SILVA, R. P. P. Uso do metabissulfito de sódio no controle de microrganismos em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Acta Sci. Biol. Sci.** Maringá, v.28, n.2, p.153-157, 2006.
- GUERRA, R. M. S. N. et al. Biometry of *Trypanosoma vivax* found calf the city of Maranhão, Brazil. **Cien. Rural**, v.38, n.3, p. 833, 2008.
- JONES, T.; DÁVILA, A. M. R. *Trypanosoma vivax*: out of Africa. **Trend. in Parasitol.**, v.2, n.17, p.99-101, 2001.
- KALU, A. U.; EDEGHERE, J. U.; LAWANI, F. A. Comparison of diagnostic techniques during subclinical single infections of tripanosomiasis in goats. **Vet. Parasitol.**, v.22, p.37-47, 1986.
- KIMETO, B.A.; MUGERA, G.M.; NYAGA, P.N. Haemorrhagic pancarditis in cattle infected with *Trypanosoma vivax*. **Vet. Parasitol.**, v.34, p.295-301, 1990.
- LAFFERTY, K. D. Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment?. **Parasitol. Today**, n.13, p.251-255, 1997.
- LAURILA, E., KERVINEN, R., AHVENAINEN, R. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. **Agbiotech News Inf.**, Oxon, v.9, n.4, p.53-66, 1998.
- LEGER, M.; VIENNE, M. Epizootie à trypanosomes chez les Bovidés de la Guyane française. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v.12, p.258-266, 1919.

- LEVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and man.** 2 ed. Minneapolis: Burguers, 1973
- MADRUGA, C.R. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* no Brasil. **Rev. Bras. Parasitol.Vet.**, v.13, n.1, p.46-47, 2004.
- MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; CAVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER, I.B.; RIBEIRO, L.R.; KESSLER, R.H.; SOARES, C.O.; MIGUITA, M.; MELO, E.P.S.; ALMEIDA, R.F.C.; LIMA JR, M.M.S.C. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, n.7, 2006.
- MARTINS, N. E., ASSIS, R. A., LOBATO, F. C. F., COSTA, G. M., OLIVEIRA, P. R. Use of coconut water (*Cocos nucifera*, Linnaeus) for *in vitro* maintenance of *Tritrichomonas foetus* (riedmuller, 1928). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, n.2, p.85-87, 2004.
- MASAKE, R.A. The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. **Vet. Rec.**, v.13, p.551-557, 1980.
- MASAKE, R. A. et al. Sensitive and specific of *T. vivax* using the PCR. **Exp. Parasitol.**, v. 85, p. 193-205, 1997.
- MURRAY, M.; MURRAY, P.K.; McINTYRE, W.I.M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.71, p.317-318, 1977.
- NAOZUKA, J., VEIGA, M. A. M. S., OLIVEIRA, E., TADINI, C. C., OLIVEIRA, P. V. Determinação de Ca, Cu, Fe, k, Mg, Mn, Na e Zn em amostras de água de coco comerciais. XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Recife, Pernambuco, 2004. **Anais...** Recife, PE, SBCTA, 2004.
- NIMPAYE, H.; NJIOKOU, F.; NJINE, T.; NJITCHOUANG, G.R. *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* “forest type” and *T. simiae*: prevalence in domestic animals of sleeping sickness foci of Cameroon. **Parasit. Jour.**, v.18, p.171-179, 2011.
- OSÓRIO, A. L. A. R., MADRUGA, C. R., DESQUESNES, M., SOARES, C. O., RIBEIRO, L. R. R., COSTA, S. C. G. *T. (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.103, n.1, p.1-13, February 2008.
- PAIVA, Erika de Souza. **Tripanossomíase por *T. vivax* em pequenos ruminantes: descrição de surtos e infecção experimental da doença.** UFERSA, 2009. 84 f. Tese (Mestrado em Ciência Animal), Mossoró, RN, 2009.
- PALING, R.W.; DWINGER, R.N. Potential of trypanotolerance as a contribution to sustainable livestock production in tsetse affected Africa. **Vet. Quart.**, v.15, n.2, p.60-67, 1993.
- PAULA MOTTA, D. J. A.; GALLEGOS; M., REYES, D. A. R.; RIBEIRO, M. F. B.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J. Uso de água de coco (in natura e industrializada) na conservação de *Trypanosoma vivax* presente em sangue bovino. X Cong. Bras. Buiatria, Belém, Pará, 2013. **Anais...** Belém, PA, CBB, 2013.
- PENHA, E. M., CABRAL, L. M. C., DA MATTA, V. M. Água de coco. In: VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. **Bebidas – vol.2 - Bebidas não alcoólicas.** São Paulo: blucher, 2010. Cap.1, p.1-12.
- PIÑERES, E. G.; MARQUES, L. T.; BELLO, A. R. Tiempo de supervivência In vivo y criopreservación de *Trypanosoma vivax*. **Rev. Cien. FCV-LUZ**, v.19, n.3, p.225-229, 2009.

- PLATT, K.B.; ADAMS, L.G. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for detecting *T. vivax* in South America cattle. **Res. Vet. Sci.**, v.21, p.53-58, 1976.
- SAROR, D.I. Classification of the anaemia of bovine trypanosomosis. **Vet. Rec.**, v.105, p.95–98, 1979.
- SEKONI, V.O.; REKWOT, P.I.; BAWA, E.K. Effects of *T. vivax* and *T. congolense* infections on the reaction time and semen characteristics of Zebu (Bunaji) x Friesian crossbred bulls. **Res. Theriogenology**, v.61, p55-62, 2004.
- SERRA FREIRE, N. M. Oiapoque – outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.4, n.4, p.30-31, 1981.
- SILBERMAYR, K.; LI, F.; SOUDRÉ, A.; MULLER, S.; SOLKNER, J. A novel qPCR assay for the detection of African Animal Trypanosomosis in trypanotolerant and trypanosusceptible cattle breeds. **Neglec. Trop. Dis.**, v.7, n.8, e2345, 2013.
- SILVA, R.A.M.S. et al. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.91, n.5, p.561-562, 1996.
- SILVA, R.A.M.S.; RAMIREZ, L.; SOUZA, S.S.; ORTIZ, A.G.; PEREIRA, S.R.; DÁVILA, A.M.R. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. **Vet. Parasitol.**, v.85, 1999.
- SILVA, R.A.M.S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A.M.R. *Trypanosoma evansi* e *T. vivax* – Biologia, Diagnóstico e Controle. **EMBRAPA**, Corumbá, Brasil, 140p., 2002.
- SILVA, R.A.M.S.; LIMA, E.S.S.; RAMIREZ, L. Quimioterapia das Tripanossomoses ocorrentes no Pantanal. Documentos 65, **EMBRAPA**, Corumbá, Brasil, 26p., 2004.
- SILVA, T.M.F.; OLINDA, R.G.; RODRIGUES, C.M.F.; CÂMARA, A.C.L.; LOPES, F.C.. Pathogenesis of reproductive failure induced by *T. vivax* in experimentally infected pregnant ewes. **Vet. Res.**, v.44, 2013.
- SIMO, G.; ASONGANYI, T.; NKININ, S.W.; NJIOKOU, F.; HERDER, S. High prevalence of *T. brucei gambiense* group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon. **Vet. Parasitol.**, v.139, n.1-3, p.57-66, 2006.
- SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J; SUZUKI, R. M; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Cultivo in vitro de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticult. Bras.**, vol.31, p.63-67, 2013.
- TIELENS, A. G. M., VAN HELLEMOND, J. J. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. **Parasitol. Today** , v.14, n.7, p.265-271, 1998.
- VARGAS, T. M.; ARELLANO, S. C. La tripanosomiasis bovina en América Latina y el Caribe. **Vet. Mon.**, v.33, p.136, p.17-21, 1997.
- VENTURA, R. M. et al. *Trypanosoma vivax*: characterization of the gene for a Brazilian stock and species-specific detection by PCR of an intergenic space sequence. **Exp. Parasitol.**, v.99, p.37-48, 2001.
- WANG, C. C. Parasite enzymes as potential targets for antiparasitic chemotherapy. **Jour. med. Chemist.** , v.27, n.1, p.1-9, 1984.
- WILSON, A.J.; CUNNINGHAM, M.P. Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. III. Patterns in the production of common antibodies. **Trop. Anim. Heal. Prod.**, v.3, p.133–139, 1971.
- WOO, P.T.K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. **Acta Trop.**, v. 27, p. 384–386, 1970.