

A UTILIZAÇÃO DA GLICERINA COMO CONSERVANTE EM SORO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

THE USE OF GLYCERIN AS SERUM'S PRESERVANT OF PATIENTS WHO MAY BE INFECTED WITH *TRYPANOSOMACRUZI*

Jaqueline Ataíde Silva Lima¹, Alejandro Luquetti Ostermayer², HânstterHállison Alves Rezende³, Liliane da Rocha Siriano⁴, Sérgio Henrique Nascente⁵, Suelene Brito do Nascimento Tavares⁶eJuliana Boaventura Avelar⁷

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações de anticorpos anti- *T. cruzi* em amostras de soro puras e amostras conservadas com duas preparações diferentes de glicerina. Foram utilizados Imunofluorescência Indireta e Enzimaimunoensaio para dosagens de anticorpos. Não foram encontradas diferenças significativas na análise de amostras de soro sem ou com conservantes.

Palavras-chave: Glicerina, Conservação, Anticorpos, *Trypanosoma cruzi*

1. Acadêmica do curso de Biomedicina da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, jaquelinellima21@gmail.com

2. Professor associado da Universidade Federal de Goiás. Doutor em Medicina Tropical, Responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás,aluquetti@gmail.com

3. Biomédico, Secretária Municipal de Saúde de Aparecida de Goiânia. Mestrando em Medicina Tropical e Saúde Pública pela Universidade Federal de Goiás, hanstter.bio@hotmail.com

4. Biomédica do Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás, Doutora em Medicina Tropical e Saúde Pública, liliane.siriano@yahoo.com.br

5. Professor do Departamento de Biomedicina e Farmácia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e da Universidade Federal de Goiás, Doutor em Ciências da Saúde, sergionascente@yahoo.com.br

6. Biomédica, Chefe do Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás, Doutora em Ciências da Saúde, suelenetavares@gmail.com

7. Professora do Departamento de Biomedicina e Farmácia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Doutora Medicina Tropical e Saúde Pública, jubavelar@hotmail.com

Abstract

This study aimed assesses concentration of antibodies anti-*T. cruzi* in sample of clean serum and sample of conserved serum with twodiferents preparations of glycerin. Indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbentwere used to dose the antibodies. Significant differences were not found in the assay of serum sample with or without retaining.

Keywords: Glycerin, Conservation, Antibodies, *Trypanosomacruzi*

Introdução

A Doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Trypanosomacruzi* (*T. cruzi*). A transmissão vetorial se dá por insetos hematófagos da família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*, sendo os mamíferos seus hospedeiros definitivos e principais reservatórios, atualmente estando controlado no Brasil a principal espécie de transmissão *Triatomainfestans* (ALMEIDA et al., 2007).

Porém, existem outros mecanismos de transmissão, como a transfusão sanguínea, oral por alimentos contaminados, via transplacentária ou transmissão pelo canal do parto. Existem mecanismos secundários como acidentes laboratoriais, manuseio de animais infectados, transplantes de órgãos, transmissão sexual, feridas, contato com espermatozoides ou fluido menstrual com presença de *T. cruzi* (COURA e DIAS, 2009).

A distribuição geográfica da infecção chagásica, incluindo seus reservatórios e seus vetores, se estende desde os Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile. Assim, em toda a América e 90 milhões de pessoas nesta região estão expostos à infecção (DIAS et al., 2008).

No Brasil, a estimativa é de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas, com uma incidência de 100 novos casos por ano (via oral). No que diz respeito à morbidade e à mortalidade, a doença foi considerada como um dos principais problemas de saúde pública na América Latina (WHO, 2013).

A infecção apresenta-se sob duas fases clínicas bem distintas. A fase aguda, mais frequente em crianças, apresenta como característica o sinal de Romaña e o chagoma de inoculação, que aparecem de sete a dez dias após a infecção e permanecem por cerca de dois a quatro meses. A fase crônica é classificada sob três formas

línicas: indeterminada, cardíaca e digestiva. Na forma indeterminada, as alterações patológicas são pouco significativas, o que torna o diagnóstico clínico difícil nesta fase, os testes sorológicos são positivos. As pesquisas apontam que cerca de 60% das pessoas infectadas se encontram nesta forma. Nas outras formas (cardíaca e digestiva) os testes sorológicos confirmam os achados clínicos (OLIVEIRA et al., 2008).

Para o diagnóstico de doença de Chagas na fase aguda (ou em reativação de imunossupressão), utiliza-se esfregaço sanguíneo ou uma técnica de concentração, tais como microhematócrito ou método de Strout, devem ser utilizados. Preparações coradas detectam parasitos quando a parasitemia é alta (fase aguda) (WHO, 2013).

Na fase crônica, prova sorológica são atualmente utilizadas para possibilitar o diagnóstico da doença de Chagas. Constituem exames bastante efetuados para a identificação da parasitose em pessoas que estão na fase crônica da doença. Os testes mais utilizados correspondem à Hemaglutinação Indireta (HAI), à Enzima Imunoensaio (ELISA) e à Imunofluorescência Indireta (IFI) (MARCHI et al., 2007). Títulos elevados em dois testes sorológicos indicam sorologia reagente, porém o clínico deve empregar o bom senso para a interpretação dos resultados. O diagnóstico clínico da doença de Chagas deve ser apoiado em dados epidemiológicos e clínicos, bem como nos exames complementares. A sorologia confirma ou exclui a etiologia (CASTRO e LUQUETTI, 1997).

Para o diagnóstico da Tripanossomíase Americana, também podem ser utilizados, o western blot, o teste de diagnóstico rápido (como imunocromatografia), entre outros. Especialmente para fins de investigação, hemocultura, xenodiagnóstico e reação em cadeia de polimerase (PCR) também são utilizados (WHO, 2013).

A utilização da glicerina na conservação de amostras de soro para a sorologia anti-*T. cruzi* está descrita na literatura (CAMARGO e GUIMARÃES, 1980; WINSLOW e HOLLAND, 1944). Esta é utilizada como conservante, pois apresenta baixo custo, fácil transporte, não necessita de baixa temperatura, além de ser anticongelante e umectante (SASAKI et al, 1996; OLIVEIRA, 2008).

O objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações de anticorpos anti-*T. cruzi* em amostras de três grupos: soro com glicerina pura, soro puro e soro com glicerina tamponada em amostras de soro puras e amostras conservadas com duas preparações diferentes de glicerina.

Material e Métodos

Foram selecionadas aleatoriamente 100 amostras de soros procedentes da soroteca do Laboratório de Pesquisa da Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. As amostras de soros são de pacientes que realizaram a sorologia para Tripanossomíase Americana no Laboratório de Pesquisa no referido laboratório.

Foram coletados 10 ml de sangue de cada paciente por punção venosa, onde todas as amostras tiveram o soro aliquoteado em tubos de 2 ml e preservadas por três formas diferentes, assim distribuídas: sendo elas, amostra com glicerina pura (A), amostra pura (B) e amostra com glicerina tamponada (C), totalizando 200 amostras glicerinadas (volume a volume) e 100 amostras puras.

Após este processo, foram congelados e estocados em congelador a - 20°C, por um período de quatro meses. Todas essas amostras passaram a integrar a soroteca do Laboratório de Pesquisa da Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás.

Para esta pesquisa, foram utilizadas as técnicas de ELISA, utilizando o kit Anti Chagas SYM da marca Symbiosys[®] (Leme, Brasil) e IFI, por meio do método "in house". Os kits utilizados nesta pesquisa foram doados pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás) e pelo Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas.

A técnica de ELISA consiste em antígenos recombinantes de *T. cruzi* adsorvidos em microplacas de microtitulação, onde foram adicionados 0,1 ml dos soros em diluição única de 1:21. Após a incubação de 30 minutos em estufa úmida, fez-se a lavagem da placa na lavadora de placas de ELISA com tampão apropriado. Adicionou-se o conjugado composto por anticorpos anti-IgG humana conjugada a enzima peroxidase (Symbiosys[®], Leme, Brasil). Após 30 minutos de incubação a 37°C em estufa úmida, a placa foi novamente levada à lavadora. Adicionou-se o substrato (H₂O₂) e o cromógeno (TMB), substância incolor que adquire coloração pela ação do substrato, sob abrigo da luz. Essa reação foi interrompida em até 30 minutos com adição de ácido sulfúrico. A seguir, procedeu-se à leitura da intensidade da cor obtida em cada poço da microplaca com auxílio de espectrofotômetro (Tecan-Spectra Classic[®], USA) que, indicou a reatividade de

cada cavidade em densidade óptica (DO) e foram confirmadas como positivas todas as amostras que possuíram DO maior que o ponto de corte. O valor do ponto de corte (*cut-off*) foi determinado por placa. Este valor foi calculado a partir da média de controles negativos e positivos incluídos no kit, multiplicado por 0,22 ($CP - CN \times 0,22$). O índice de referência foi calculado pela divisão da DO pelo *cut-off*.

A Imunofluorescência Indireta (IFI) consistiu na incubação durante 30 minutos a 37°C do soro diluído com antígeno de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) fixados em lâminas de microscopia convenientemente demarcada. Após três lavagens sucessivas, procedeu-se a incubação com conjugado (FITC-Biomerieux®, França) nas mesmas condições anteriormente descritas, seguidas de novas lavagens em recipientes próprios com tampão PBS. As lâminas secaram a temperatura ambiente e foram montadas com glicerina tamponada e lamínulas. As leituras das lâminas foram realizadas em microscópio de fluorescência, cuja luz ultravioleta ativa o isotiocianato de fluoresceína presente apenas nos parasitos que apresentaram anticorpos ligados à sua superfície. Os soros foram examinados em diluição inicial de 1:10 até o título final, sendo considerado reagente quando o título é maior que 1,1, não reagente quando o título menor que 0,9 e indeterminada com o título entre 0,9 e 1,1.

Todas as amostras de soro foram testadas pelas duas técnicas totalizando 600 testes (300 amostras testadas em cada metodologia).

A análise estatística foi realizada no software BioEstat® versão 5.3, sendo feito o teste ANOVA para verificar diferenças entre os três grupos amostrais, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$.

Resultados

Foram realizadas duas técnicas laboratoriais, ELISA e IFI, em 100 amostras de soro, sendo que, 60 possuem sorologia anti-*T. cruzi* positiva e 40 apresentam sorologia negativa. No método de ELISA, utilizou-se a média dos índices para realizar o teste ANOVA, onde não foi observada disparidade na análise entre os grupos (tabela 1).

Tabela 1: Análise pelo teste ANOVA para as amostras testadas pela técnica de Enzimaimunoensaio entre os três grupos (soro com glicerina pura, soro puro e

soro com glicerina tamponada), em pacientes atendidos no Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. Sendo significativo, o intervalo de confiança $p < 0,05$:

Grupos	N		Média dos DO		p-nível	
	+	-	+	-	+	-
Soro Glicerina a 85% (A)	60	40	4,30	0,18	0,18	0,06
Soro Puro (B)	60	40	4,20	0,26		
Soro Glicerina Tamponada (C)	60	40	4,48	0,28		

Na técnica de IFI, ao comparar os três resultados agrupados, não houve diferença significativa nas análises entre os grupos (tabela 2).

Tabela 2: Análise pelo teste ANOVA para Imunofluorescência Indireta entre os três grupos (soro com glicerina pura, soro puro e soro com glicerina tamponada), em amostras de soro de pacientes atendidos no Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. Sendo significativo, o intervalo de confiança $p < 0,05$:

Grupos	N		Média dos DO		p-nível	
	+	-	+	-	+	-
Soro Glicerina a 85% (A)	60	40	7.006	2,36	0,067	0,064
Soro Puro (B)	60	40	4.703	8,42		
Soro Glicerina Tamponada (C)	60	40	5.530	6,31		

Discussão

A eficácia do diagnóstico da Tripanossomíase Americana depende da fase da doença em que o paciente se encontra. Na fase aguda, por haver alta parasitemia, as técnicas parasitológicas como hemocultura, xenodiagnóstico e exame direto possuem alta sensibilidade, podendo esta chegar a 100%. Já as técnicas sorológicas, não apresentam eficácia nas primeiras semanas, devido aos baixos níveis de anticorpos específicos (IgG). A fase crônica é caracterizada por baixíssima parasitemia e altos níveis de anticorpos IgG. Portanto, nesta fase o diagnóstico é feito basicamente por testes sorológicos, através das técnicas de ELISA, HAI e IFI, que apresentam sensibilidade variando de 95% a 100% (MORAES-SOUZA, 2000; LANGHI-JUNIOR et al., 2002). Métodos parasitológicos como a Hemocultura, apresentam nesta fase sensibilidade baixa, variando de 40% a 50% (CHIARI, 1966; LIMA, 2001).

De maneira geral, o diagnóstico sorológico para a doença de Chagas é o método de escolha tanto em laboratórios clínicos como em bancos de sangue, apresentando os maiores coeficientes de sensibilidade (MORAES-SOUZA et al., 2006).

Para o diagnóstico sorológico, pode-se utilizar amostras de soro puras ou amostras conservadas em glicerina. Esta, mais utilizada em laboratórios de pesquisa ou para posterior confirmação sorológica.

A glicerina é um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico (APOLINÁRIO, 2012). O termo glicerina ou glicerol são usados alternadamente na literatura, mas seu nome oficial pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) é propano-1,2,3-triol (RAMOS, 2008).

O uso da glicerina como conservante apresenta inúmeras vantagens, como a possibilidade de se realizar transporte da amostra, manutenção em temperatura ambiente, baixo custo, ser anticongelante e umectante, propriedades estas que parecem contribuir para a manutenção da estabilidade da amostra (SASAKI et al, 1996; OLIVEIRA, 2008).

A utilização da glicerina na conservação de amostras de soro para a sorologia anti-*T. cruzi* está descrita na literatura (CAMARGO e GUIMARÃES, 1980;

WINSLOW e HOLLAND, 1944). Esta é amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa, principalmente pela capacidade de conservar as amostras de soro por longos períodos, e permitir o transporte de amostras a outras regiões, mantendo a sua estabilidade (CAMARGO e GUIMARÃES, 1980).

É importante lembrar que soros mal acondicionados, ou não convenientemente refrigerados, podem perder reatividade pela degradação das imunoglobulinas, fornecendo um resultado falso-negativo (LUQUETTI et al., 1995). Para evitar essa interferência, os soros devem ser conservados em congelador, em temperatura inferior a -15°C , quando se deseja utilizá-los por um período superior a 2-3 dias após a coleta de sangue. A preservação com glicerol (glicerina) na proporção de 50% (partes iguais de soro e glicerol) mantém a reatividade por muitos anos (CAMARGO et al., 1986).

Segundo Luquettie Rassi(2000, p. 365), sua soroteca contém diversos soros conservados com glicerina, que estão em perfeitas condições de análise, decorridos de até 22 anos após a coleta de sangue.

A glicerina também é utilizada na conservação de peças anatômicas de bovinos (GIGEK et al., 2009; BATISTA et al., 1996) em membranas biológicas para uso cirúrgico (OLIVEIRA et al.; 2009), em dentes de rato para reimplante (OKAMOTO et al., 1994), preservação de membro torácico em cães (ZILIOTTO et al., 2003), conservação do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (MUNFORD e SIMONI, 1996), reconstituição vesical em cães (OLIVEIRA, 2008) e em diáfises femorais caninas (AMENDOLA, 2007).

Conclusão

Concluimos que a utilização ou não do conservante glicerina, ao ser analisado por testes estatísticos, não apresentou diferença significativa na análise da concentração de anticorpos anti-*T. cruzi*, em amostras estocadas e conservadas por quatro meses. O curto período de estocagem e conservação pode ter influenciado em nossos resultados.

A glicerina, por preservar a reatividade das amostras, é um conservante de escolha para soros em laboratórios que necessitam de uma conservação

prolongada, como laboratórios universitários, laboratórios de pesquisa, e laboratórios clínicos que enviam amostras para outros estados ou países.

Referências

ALMEIDA, E.A.; NETO, R.M.B.; GUARIENTO, M.E.; WANDERLEY, J.S.; SOUZA, M.L. *Apresentação clínica da doença de Chagas crônica em indivíduos idosos*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 40, n. 3, mai/jun. 2007.

AMENDOLA, G.F. *Aspectos biomecânicos, bacteriológicos e micológicos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou mel*. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, mar. 2007.

APOLINÁRIO, F.D.B.; PEREIRA, G.F.; FERREIRA, J.P. *Biodiesel e Alternativas para utilização da glicerina resultante do processo de produção de biodiesel*. Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense, v. 2, n. 1, p. 141-146. 2012.

BATISTA, L.C.; DALECK, C.R.; SHIMANO, A.C.; ALESSI, A.C.; ABRAHÃO, M.S. *Estudo comparativo da resistência à tração do peritônio (bovino, equino, suíno e canino) a fresco e conservado em glicerina*. Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia, São Paulo, v. 33, p. 305-312, 1996.

CAMARGO, M.E.; GUIMARÃES, M.C.S. *Conservação de alíquotas de soros de toxoplasmose e chagásicos por adição de glicerina*. 16º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. 357. 1980.

CASTRO, A.M.; LUQUETTI, A.O. *Diagnóstico Sorológico da Doença de Chagas*. In: João Carlos Pinto Dias; José Rodrigues Coura. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 1997.

CHIARI, E.; BRENER, Z. *Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na fase crônica*. Revista do Instituto de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 8, p. 134-138. 1966.

COURA, J.R.; DIAS, C.P. *Epidemiology, Control and Surveillance of Chagas Disease - 100 Years After Its Discovery*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,

v. 4, n. 1, jul. 2009.

DIAS, J.P.; BASTOS, C.; ARAÚJO, E.; MASCARENHAS, A.V.; NETTO, E.M.; GRASSI, F.; SIVA, M.; TATTO, E.; MENDONÇA, J.; ARAÚJO, R.F.; YASUDA, M.A.S.; ARAS, R. *Surto de doença de Chagas aguda associada à transmissão oral*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 41, n. 3, mai/jun. 2008.

GIGEKE, T.; OLIVEIRA, J.E.M.; NETO, A.C.A.; CARVALHO, W.L.; PEREIRA, F.V.; ALMEIDA, A.H. *Estudo analítico da técnica de glicerinação empregada para conservação de peças anatômicas de bovinos*. V Simpósio de Ciências da UNESP e VI Encontro de Zootecnia UNESP, Dracena, set. 2009.

LANGHI JUNIOR, D.M.; BORDIN, J.O.; CASTELO, A.; MORAES-SOUZA, H.; STUMPF, R.J. *The application of Latent Class Analysis for Diagnostic Test Validation of Chronic Trypanosomacruzi Infection in Blood Donors*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 6, p. 181-187, aug. 2002.

LAURINO, C.C.F.C.; LORA, P.S.; BRENOL, J.C.T.; GRUTCKI, D.M.; XAVIER, R.M. *Experiência da adoção do I e II Consensos Brasileiros de Fator Antinuclear por Imunofluorescência Indireta em Células HEp-2 em um hospital universitário*. Revista Brasileira de Reumatologia, Porto Alegre, v. 49, n. 2, p. 110-120. 2009.

LIMA, A.O. *Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, ed. 8. 2001.

LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. *Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo Trypanosoma cruzi*. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas, Rio de Janeiro, ed. 2, p. 365. 2000.

LUQUETTI, A.O.; TAVARES, S.B.N.; OLIVEIRA, R.A.; ROCHA, I.M. *Perda variável de anticorpos anti-Trypanosomacruzi, em soros conservados durante uma ano em diferentes condições de armazenamento*. Revista de Patologia Tropical, p. 323. 1995.

MARCHI, C.R.; NETO, V.A.; ALMEIDA, I.C. *Comportamento do método quimioluminescente-ELISA em relação a resultados considerados discordantes por meio de três técnicas convencionais para diagnóstico da doença de Chagas*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 40, n. 1, p. 68-70, jan.

2007.

MORAES, M.H.; GUARNERI, A.A.; GIRARDI, F.P.; RODRIGUES, J.B.; EGER, I.; TYLER, K.M.; DTEINDEL, M.; GRISARD, E.C. *Differentserologicalcross-reactivityof Trypanosoma rangeliforms in Trypanosoma cruziinfectedpatientssera*. Parasites & Vectors, vol.1, n.20. 2008.

MORAES-SOUZA, H. *Transmissão Transfusional da Doença de Chagas*. Revista de Patologia Tropical, v.29, p.91-100. 2000.

MORAES-SOUZA, H.; MARTINS, P.R.J.; FERREIRA-SILVA, M.M.; ABUD, M.B. *Perfil sorológico para doença de Chagas dos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberaba*. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São José do Rio Preto, vol.28, n.2, p.105-109, abr-jun. 2006.

MUNFORD, V.; SIMONI, I.C. *Efeito da temperatura de estocagem sobre o poder infectante do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina*. Biotemas, São Paulo, ed.9, v. 1, p. 7-18. 1996.

OKAMOTO, T.; SOUZA, C.M.R.; GABRIELLI, M.F.R.; SONODA, C.K. *Estudo histomorfológico sobre reimplante mediato no incisivo superior de rato. Efeitos da conservação do dente em glicerina a 98%*. Revista da Faculdade de Odontologia, Bauru, v.2, n. 4, p. 103-108, out-dez. 1994.

OLIVEIRA, L.L. *Reconstituição vesical em cães (Canis familiaris): Xenoenxerto com túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98%*. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, set. 2008.

OLIVEIRA, L.L.; SOUZA, D.B.; ABÍLIO, E.J.; CARVALHO, E.C. *Métodos de preservação de membranas biológicas para uso cirúrgico*. Jornal Brasileiro de Ciência Animal, Campos dos Goytacazes, ed.2, v.3, p.175-188. 2009.

OLIVEIRA, M.F.; NAGAO-DIAS, A.T.; PONTES, V.M.O.; JÚNIOR, A.S.S.; COELHO, H.L.L.; COELHO, I.C.B. *Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil*. Revista de Patologia Tropical, v.37, n.3. 2008.

RAMOS, L. P. *Glicerina, o tamanho do problema*. Revista Biodieselbr, v. 3. 2008.

SASAKI, A.T.; SHIMIZU, S.H.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A.J.; CAMARGO, E.D.;

SILVA, M.V. *Sorodiagnóstico da doença de Chagas: Novo reagente para o teste de hemaglutinação indireta (THAI)*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, São Paulo, ed.29, v.2, p. 137-144, mar/abr. 1996.

.WHO (World Health Organization) Control of Neglected Tropical Diseases (NTD) - Chagas disease (American trypanosomiasis).Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/ [Capturado em 12/05/2013].

WINSLOW, C.E.A.; HOLLAND, D.F. *The disinfectant action of glycerol in varying concentrations*.A Manual of Pharmacology and its Applications to Therapeutics and Toxicology, Philadelphia, p.90.1944.

ZILIOOTTO, L.; FANTINATTI, A.P.; DALECK, C.R.; FILHO, J.G.P.; SOUZA, A.P.; DINIZ, P.P.V.P. *Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico. Estudo experimental em cães*. Acta Cirúrgica Brasileira, São Paulo, ed.2, v.18, p. 107-115, mar/abr. 2003.