



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS/ CCA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**



**ESTUDO *IN VITRO* DA CREOLINA® SOBRE O VENENO
BOTRÓPICO: ACHADOS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS.**

Hugo Thyares Fonseca Nascimento Pereira da Silva

AREIA, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS/ CCA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA



**ESTUDO *IN VITRO* DA CREOLINA® SOBRE O VENENO
BOTRÓPICO: ACHADOS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS.**

Hugo Thyares Fonseca Nascimento Pereira da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Medicina Veterinária pela
Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra.

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Hugo Thyares Fonseca n p da.

ESTUDO IN VITRO DA CREOLINA® SOBRE O VENENO BOTRÓPICO:
ACHADOS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS / Hugo Thyares

Fonseca n p da Silva. - Areia, 2019.

31 f. : il.

Orientação: Ricardo Romão Guerra Guerra.

Monografia (Graduação) - UFPB/CCA.

1. atividade antiofídica; Bothrops jararaca; hemólise.

I. Guerra, Ricardo Romão Guerra. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS/ CCA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Hugo Thyares Fonseca Nascimento Pereira da Silva

ESTUDO *IN VITRO* DA CREOLINA® SOBRE O VENENO
BOTRÓPICO: ACHADOS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovado em: 05/06/2019.

Nota: 9,7

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra – UFPB (Orientador)

Médico Veterinário - Vinícius Tomé dos Santos Souza – UFPB

Médica Veterinária – Msc. Telma de Sousa Lima – UFPB

Prof. Dr. Fabiana Satake – UFPB

Coordenação de TCC

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra pelas leituras sugeridas ao longo dessa orientação, pela dedicação e todos os aprendizados por ele proporcionado.

A minha mãe Prof^ª. Me. Claudenice Rodrigues do Nascimento pelo apoio incondicional, literaturas sugeridas, noites viradas me ajudando enriquecer o presente trabalho e por acreditar sempre no meu potencial.

Ao meu pai José Jackson Pereira da Silva e toda minha família pela compreensão das minhas ausências constantes, que não deixarão de existir mesmo após superada essa etapa.

Aos professores do Curso de Medicina Veterinária da UFPB, que contribuíram de forma inimaginável, com seus valorosos ensinamentos no decorrer de cada uma das disciplinas, auxiliando assim no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos colegas de pesquisa, em especial a Lucas Rannier, Thais Nayara, Maria Eduarda, André Cruz, Vinícius Tomé, Kelvis Freitas e Camila Pereira, que tiveram um papel fundamental no andamento dos experimentos realizados.

A Ivanilda Roseno da Cruz, por sempre saber a hora e as palavras certas na hora de apoiar e incentivar um filho, mesmo sendo um filho de coração.

A Thais Nayara de Lima Ramos por apoio incondicional em todas as decisões tomadas por mim, pelas madrugadas de estudo e por compartilhar comigo tanto os bons quanto os maus momentos.

RESUMO

Acidentes ofídicos constituem importante causa de morbimortalidade tanto em animais quanto no homem, na América latina, 90% desses acidentes são atribuídos ao gênero *Bothrops*. Apesar de preconizado, o soro antiofídico pode não solucionar lesões locais provenientes da ação proteolítica do veneno Botrópico, além de sua difícil aquisição. Nesse contexto faz-se necessário encontrar substâncias alternativas com potencial antiofídico. O delineamento experimental foi constituído por cinco grupos, cada um contendo cinco amostras, sendo G1 – grupo controle, G2 – sangue + veneno, G3 – sangue + Creolina®, G4 – sangue, veneno e Creolina®, G5 – sangue + veneno/Creolina®. Cada amostra continham 2ml de sangue bovino, acondicionado em eppendorf (2,5ml) com 2µl de EDTA. O sangue foi coletado de bezerras de até um ano de vida, sem distinção racial ou sexual, provenientes da Universidade Federal da Paraíba. Cada amostra foi estabelecida a partir aleatoriamente selecionada. Os grupos G2, G4 e G5 receberam 2µl de veneno botrópico e os grupos G3, G4 e G5 receberam 1µl de Creolina®, valores estes predeterminados pela equipe de pesquisa. Essa etapa foi realizada após avaliação individual das amostras. Os resultados obtidos foram avaliados através do ANOVA e Newman-Keuls, a 5% de significância. As amostras que apresentaram significância no método estatístico foram apenas as do grupo G3, mostrando uma capacidade hemolítica e aumento do fibrinogênio. Tais resultados revelam que o veneno botrópico no volume de 2µl não desencadeou alterações hematológicas *in vitro*, e que o uso da Creolina® no volume de 1µl não demonstrou atividade antiofídica, mas ocasionou distúrbios hemolíticos nas outras amostras em que a mesma estava presente.

Palavra-chave: atividade antiofídica; *Bothrops jararaca*; hemólise

ABSTRACT

Acute ophidiiasis is an important cause of morbidity and mortality in both animals and man, in Latin America, 90% of these accidents are attributed to the genus *Bothrops*. Although recommended, the antiofidic serum may not resolve local lesions from the proteolytic action of the Botrópico venom, in addition to its difficult acquisition. In this context it is necessary to find alternative substances with antiofidic potential. The experimental design consisted of five groups, each containing five samples, G1 - control group, G2 - blood + venom, G3 - blood + Creolina ®, G4 - blood, venom and Creolina ®, G5 - blood + venom / Creolina ®. Each sample contained 2ml of bovine blood, packed in eppendorf (2.5ml) with 2µl of EDTA. Blood was collected from calves up to one year old, without racial or sexual distinction, from the Federal University of Paraíba. Each sample was established from randomly selected. Groups G2, G4 and G5 received 2µl of botrópico venom and groups G3, G4 and G5 received 1µl of Creolina®, values predetermined by the research team. This step was performed after individual evaluation of the samples. The results were evaluated through ANOVA and Newman-Keuls, at 5% significance. The samples that presented significance in the statistical method were only those of group G3, showing a hemolytic capacity and increase of the fibrinogen. These results show that botulent venom in the volume of 2µl did not trigger hematological changes in vitro, and that the use of Creolina® in the volume of 1µl did not demonstrate antiofidic activity, but caused hemolytic disorders in the other samples in which it was present.

Keyword: antifídica activity; *Bothrops jararaca*; hemolysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de amostras em eppendorf, 30 minutos após realização de testes hematológicos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela referente ao delineamento experimental, a qual inclui os grupos, amostras e animais experimentados.

Tabela 2. Dados médios referentes à Volume Globular, Proteína Plasmática Total, Fibrinogênio e Hematimetria de todos os grupos experimentados.

Tabela 3. Tabela referente às alterações morfológicas em hemácias e plaquetas, obtidas através de estiramento sanguíneo corado com panótico rápido, posteriormente avaliado em microscópio.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Análise Hematimétrica referente aos grupos experimentados, os quais não demonstraram nenhum resultado significativo.

Gráfico 2. Gráfico referente à quantificação das Proteínas Plasmáticas Totais de todos os grupos experimentados, onde estatisticamente não é possível observar nenhum grau de significância.

Gráfico 3. Gráfico referente à concentração sérica de fibrinogênio (mg/dl) de todos os grupos experimentados, com resultado significativo de G3 em relação a G1.

Gráfico 4. Gráfico referente ao Volume Globular dos grupos experimentados, com resultado significativo que evidencia a potencial hemolítica Creolina®.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 IMPORTÂNCIAS DOS ACIDENTES OFÍDICOS.....	12
1.2 JARARACAS (<i>BOTHROPS</i>)	12
1.3 CREOLINA®	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 PERÍODO E LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	15
2.2 ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO	15
2.3 VENENO UTILIZADO NO EXPERIMENTO	15
2.4 UTILIZAÇÃO DA CREOLINA®	15
2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
2.6 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA DAS AMOSTRAS	17
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.1 RESULTADO GERAL DOS TESTES HEMATOLÓGICOS	18
3.2 PLAQUETOGRAMA / HEMATIMETRIA	18
3.3 PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL (PPT) / FIBRINOGENIO	20
3.4 VOLUME GLOBULAR MÉDIO	22
4. CONCLUSÃO	24
5. REFERÊNCIAS	25
6. ANEXOS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 IMPORTÂNCIAS DOS ACIDENTES OFÍDICOS

Atualmente no Brasil existem diversos sistemas responsáveis pelo registro de notificações referentes aos acidentes ocorridos por animais peçonhentos, como: Sistema de informação de agravos de Notificação (SINAN/MS), Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (Sinitox/Fiocruz/MS), Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde/MS e o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM/MS). Mesmo contando com todos esses sistemas, os dados obtidos não retrata a real proporção do problema, muito provavelmente devido à subnotificação dos acidentes, como também a dificuldade de acesso aos serviços de saúde de muitas cidades brasileiras (LEMOS et al., 2009).

Estimativas revelam cerca de 2,5 a 2,7 milhões de acidentes ofídicos ao ano no mundo, com aproximadamente 250.000 vítimas com sequelas e 125.000 óbitos por ano no mundo (GUTIÉRREZ, 2006). As serpentes peçonhentas com mais relevância no território brasileiro são as dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (SILVA et al., 2015). Grande maioria desses acidentes ofídicos é causada por espécies do gênero *Bothrops*, com expressivos 90% dos casos na América Latina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Segundo o SINAN (2017), dentre as notificações compulsórias no Brasil, os animais peçonhentos estão no segundo lugar do ranking dos mais notificado.

Em animais, os acidentes ofídicos também representam um grande problema na saúde pública, sendo capazes de causar lesões irreversíveis, como também prejuízos econômicos (CINTRA et al., 2014). O prejuízo anual na bovinocultura Brasileira chega a aproximadamente 130 mil cabeças de gado, devido a acidentes ofídicos, segundo relatos rotineiros de pecuaristas (CINTRA et al., 2014)

1.2 JARARACAS (*BOTHRUPS*)

As jararacas fazem parte de um grupo de 30 espécies, pertencentes à família Viperidae, distribuídas por todo território Brasileiro. Para se aquecer as jararacas utilizam a superfície do solo durante a noite, sendo uma possível justificativa para seu hábito noturno e preferência

por épocas quentes. As fêmeas geralmente são maiores e mais volumosas que os machos (SANTOS et al., 2016).

As serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* possuem alta complexidade e variação quanto às proteínas presentes em seu veneno, possivelmente advindas da dieta, idade, dimorfismo sexual e origem (QUEIROZ et al., 2008).

O veneno da *Bothrops jararaca* possui atividades fisiopatológicas importantes, como ação proteolítica (necrose tecidual), consumo de fibrinogênio ocasionado pela ativação da cascata de coagulação, que posteriormente associado a outros fatores levam a um quadro hemorrágico muito comum nesses tipos de acidentes. Em adultos desse gênero, o veneno possui uma maior ação proteolítica que coagulante, porém em filhotes o veneno tem predominantemente ação coagulante (PINHO; PEREIRA, 2001).

A evolução do quadro clínico em vítimas da *Bothrops jararaca* depende do tempo de socorro médico, idade, quantidade de veneno inoculado e local da picada (SANTOS et al., 2019). Em geral observa-se, no local da inoculação, dor, edema, hemorragia e necrose. Em níveis sistêmicos, causa alterações cardiovasculares, alterações renais e coagulação (GUTIERREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009). Também são descritas náuseas, hipotensão arterial, choque, vômitos e sudorese. As causas mais frequentes de óbito são causadas por complicações sistêmicas como insuficiência renal aguda (IRA), septicemia, choque e coagulação intravascular disseminada (CID) (PINHO; PEREIRA, 2001).

Se tratado, o acidente botrópico tem bom prognóstico, com mortalidade menor que 1%, entretanto, existe a possibilidade de problemas anatômicos e até mesmo funcionais, devido ao quadro de necrose. A insuficiência renal é possivelmente reversível por se tratar de uma IRA (CAMPOS, 1999). Na atualidade o único tratamento considerado cientificamente eficaz contra acidentes ofídicos é a soroterapia endovenosa (MOTTA, 2008). Nos acidentes causados por *Bothrops jararaca* é utilizado o soro antibotrópico (SAB) e, na falta deste utiliza-se o soro antibotrópico-crotálico (SABC). No entanto ambos apresentam limitações como, a não neutralização do efeito proteolítico da peçonha, custo elevado, difícil acesso, entre outros agravantes (BITENCOURT, 2015).

Devido a essas notórias limitações no tratamento com soro antibotrópico ou até mesmo, soro antibotrópico-crotálico a procura por uma alternativa mais rentável, de fácil acesso e com eficácia sobre a lesão provocada no local da picada, tem sido o objeto muitos pesquisadores encontrar tratamentos alternativos com potencial antiofídico.

A população do cariri paraibano relata obtenção de resultados positivos com a utilização de plantas e até mesmo com o uso da Creolina® de forma empírica (CARVALHO, 2017).

1.3 CREOLINA®

Lançada pela empresa WILLIAM PEARSON LTDA. Na década de 30, a Creolina® possui características particulares como, cor âmbar, odor forte e composição líquida homogênea. Sua natureza química é uma mistura de hidrocarbonetos, cresóis e fenóis. Comumente utilizado na medicina veterinária como antisséptico, germicida e anti-helmíntico (STEFFEN, 2010).

Em sua composição a Creolina® tem 10% de cresóis, os quais são recomendados para desinfecção de piso e instalações sanitárias. Sua ação advém da combinação com a proteína celular da bactéria, fazendo com que ocorra a desnaturação (HUBER, 1983).

No cariri paraibano os pequenos criadores de gado sofrem com perdas na produção devido aos acidentes ofídicos, geralmente provocados por serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* (CARVALHO, 2017).

Com a finalidade de reverter o quadro clínico dos bovinos acometidos, produtores fazem a utilização empírica da Creolina® por via oral, essa aplicação é feita de maneira imediata após a picada da serpente. Tal prática é bem difundida entre os pequenos produtores no estado da Paraíba, sendo também a única alternativa em casos de acidentes ofídicos nessa região (CARVALHO, 2017).

Além dos relatos de produtores quanto a eficácia da Creolina® de forma empírica, existem estudos que fomentam a sua ação antiofídica, que na utilização da via intramuscular junto ao veneno botrópico a Creolina® foi capaz de inibir os efeitos locais e sistêmicos do veneno em ratos Wistar (CARVALHO, 2017). Tais estudos e relatos deixam em aberto à possibilidade de um potencial antiofídico da Creolina® sobre o veneno botrópico, abrindo precedente para um aprofundamento científico sobre a capacidade antiofídica da mesma.

Esse estudo teve como objetivo avaliar o potencial antiofídico *in vitro* da Creolina® sobre o veneno botrópico, como também fundamentar os estudos para desenvolver um possível protocolo terapêutico de baixo custo e fácil acesso em casos de acidentes ofídicos causados por Jararaca (*Bothrops jararaca*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PERÍODO E LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário no Centro de Ciências Agrárias (HV/CCA) e no Setor de Bovinocultura, ambos localizados na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB. Seguindo os princípios éticos impostos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da referida instituição (CEUA-UFPB, nº 8049160419- Anexo 1).

2.2 ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO

Foram utilizados cinco bovinos clinicamente saudáveis sem distinção sexual, com peso corporal entre 150 a 200 kg, idade inferior a 1 ano, pertencentes a linhagem Girolanda e provenientes do Setor de Bovinocultura CCA, Campus II da UFPB, Areia-PB.

Não foi realizado nenhum tipo de manejo nutricional específico, mudança de ambiente, restrição hídrica ou qualquer tipo de alteração na rotina dos animais, as amostras foram colhidas em animais aleatórios seguindo apenas os critérios de peso, idade e linhagem dos mesmos.

2.3 VENENO UTILIZADO NO EXPERIMENTO

Utilizou-se peçonha liofilizada de *Bothrops jararaca* (Bja – Lote 01/08-10), fornecida pela Central de Venenos- NEVAS do Instituto Butantan. O mesmo foi mantido e armazenado na temperatura de -20°C e, no momento do uso, pesado e dissolvido em solução salina estéril atingindo a concentração de 1mg/ml.

Utilizou-se 2µl da solução dissolvida para cada amostra de 2ml de sangue bovino. Esse volume foi previamente estabelecido pela equipe de pesquisa em plano piloto, no qual verificou-se que volumes acima de 2µl promoviam coagulação das amostras e inviabilizando as análises.

2.4 UTILIZAÇÃO DA CREOLINA®

Por não haver embasamento teórico prévio sobre qual volume utilizar, preconizou-se para este experimento o volume de 1µl de Creolina® pura para cada amostra com 2ml de sangue bovino.

Foi preconizada a utilização da Creolina® na forma comercial de 100ml, onde foi realizada a pipetagem da mesma nas amostras de sangue bovino.

2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

De cada um dos cinco bovinos utilizados no experimento, foi obtido de forma asséptica o volume de 10 ml de sangue venoso, através da punção da veia jugular externa. Tais volumes foram divididos em cinco frações igualitárias em eppendorfs, contendo EDTA na proporção de 10µl/ml, o volume final de cada eppendorfs foi de 2 ml de sangue, posteriormente encaminhados ao Laboratório de Patologia Clínica HV/CCA/UFPB.

Após coleta, as amostras foram divididas em cinco grupos (G1; G2; G3; G4; G5), cada um dos grupos contendo cinco amostras de sangue, cada uma das respectivas amostras corresponde a um animal (A1; A2; A3; A4; A5). G1 foi correspondente ao grupo controle; em G2 a amostra foi composta por 2µl do veneno botrópico para 2ml de sangue bovino; no G3 houve a adição de 1µl de Creolina® para 2ml de sangue bovino; G4 houve adição do veneno e da creolina, entretanto a creolina® foi acrescida 15 minutos após o veneno; G5 foi constituído de 2µl veneno e 1µl de Creolina® adicionadas ao mesmo tempo (Tabela 1).

As amostras só receberam a adição do veneno botrópico e da creolina® após chegarem ao Laboratório de Patologia Clínica HV/CCA/UFPB.

Tabela 1. Tabela referente ao delineamento experimental, a qual inclui os grupos, amostras e animais experimentados.

GRUPO	AMOSTRA	ANIMAL				
GRUPO 1	Controle	A1	A2	A3	A4	A5
GRUPO 2	Veneno 2µl	A1	A2	A3	A4	A5
GRUPO 3	Creolina® 1µl	A1	A2	A3	A4	A5
GRUPO 4	Veneno 2µl > 15 mim > Creolina 1 µl	A1	A2	A3	A4	A5
GRUPO 5	(Veneno 2µl + Creolina® 1µl)	A1	A2	A3	A4	A5

Fonte. Silva (2019)

A primeira bateria de exames realizada foi no G1, nos quais estavam presentes amostras controle de cada um dos animais.

A segunda bateria de exames foi realizada no G2, grupo que recebeu a adição de 2µl de veneno botrópico em cada amostra. Antes da adição do veneno botrópico, se fez necessária a diluição do mesmo em solução salina estéril, chegando a concentração de 1mg/ml (1µg/ µl).

Na terceira bateria de exames realizada no grupo G3, foi diluído junto às amostras o volume de 1µl de Creolina®.

Já na quarta bateria de exames, realizada no G4, foi diluído junto a cada amostra 2µl de veneno. Após 15 minutos de ação do veneno botrópico sobre as amostras de sangue, foi adicionado 1µl de Creolina®.

Na quinta e última bateria de exames, realizada no G5, foi diluído junto a cada amostra o volume de 2µl de veneno botrópico mais 1µl de Creolina®, objetivando avaliar a possível ação antiofídica instantânea da Creolina® sobre o veneno botrópico.

2.6 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram acondicionadas de acordo com as exigências específicas de cada exame a ser realizado e conforme as diretrizes do LPC/UFPB.

Cada grupo foi avaliado, estabelecendo-se os níveis de PPT, VG, Fibrinogênio, contagem de hemácias e plaquetas, os quais são descritos a seguir.

Com o intuito de estabelecer a concentração das proteínas plasmáticas totais (PPT) utilizou-se o teste de micro hematócrito, que consiste na centrifugação da amostra em dois capilares a 12.000rpm durante cinco minutos, seguido da utilização do refratômetro, detendo-se o valor da PPT.

Para quantificar o fibrinogênio utilizou-se um dos capilares centrifugados anteriormente, onde o mesmo foi para o banho-maria a 56°C por três minutos, em seguida foi centrifugado novamente a 12.000rpm durante cinco minutos e também avaliado através da refratometria. A subtração do 1° PPT menos o 2° PPT (que foi para o banho-maria) nos deu o resultado do fibrinogênio.

O Volume Globular (VG) determinou-se também através da técnica de micro hematócrito, onde o mesmo após centrifugação a 12.000rpm durante cinco minutos é mensurado em uma escala, a qual avalia a proporção entre a papa de hemácias e o plasma, determinando assim o percentual do VG.

Para contagem de eritrócitos utilizou-se a Câmara de Neubauer contendo solução fisiológica mais sangue amostral, levados para o microscópio onde se pode realizar a contagem e estabelecer assim a Hematimetria.

Para a contagem de plaquetas foi instituída a contagem manual indireta, através do estiraço sanguíneo corado com panótico rápido, realizado em tempo inferior a 2 horas após coleta. A quantificação da Proteína Plasmática Total (PPT) foi determinada através do teste de refratometria. Para dosagem do Fibrinogênio plasmático, utilizou-se a técnica de precipitação pelo calor.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar a existência estatística entre os grupos analisados, foi utilizado o teste de ANOVA, acompanhado do Newman-Keuls. As análises foram realizadas pelo programa Graphpad Prism. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RESULTADO GERAL DOS TESTES HEMATOLÓGICOS

A tabela (Tabela 2) abaixo se refere aos dados hematológicos médios em seus respectivos grupos.

Tabela 2. Dados médios referentes a Volume Globular, Proteína Plasmática Total, Fibrinogênio e Hematimetria de todos os grupos experimentados.

GRUPO	VG (%)	PPT (g/dL)	FIBRINOGENIO (mg/dL)	HEMÁCIAS ($\times 10^5$)
G1	20	6,12	120	3,17
G2	19,2	6,52	480	3,01
G3	18,6	6,08	560	3,23
G4	19,2	5,96	360	2,95
G5	18,9	6,12	400	2,49

Fonte: Silva (2019).

3.2 PLAQUETOGRAMA / HEMATIMETRIA

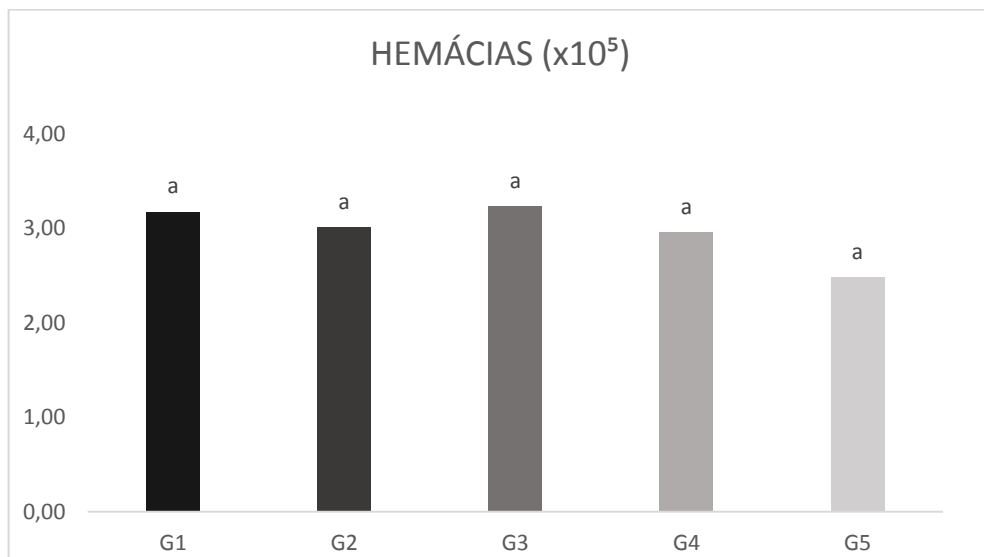
De acordo com Santoro (2004) plaquetas e fatores de coagulação são os mais importantes no mecanismo de ação do veneno botrópico, pois componentes presentes no veneno possuem o potencial de causarem distúrbios na função plaquetária e interferir na

cascata de coagulação, sua ação sobre o mecanismo de agregação plaquetária é notória e duradoura (apud YAMASHITA, 2013).

Nos grupos G2, G4 e G5, não foi possível realizar a contagem de plaquetas, devido à elevada agregação em ambos os grupos. A presença de agregação plaquetária induzida pelo veneno botrópico é descrita por diversos autores (TOKARNIA & PEIXOTO, 2006; SENISE 2014). Nas lâminas do G3, grupo acrescido com 1µl de Creolina® por amostra, também foi inviável a contagem de plaquetas, devido ao alto índice de agregação plaquetária, tal resultado sugere que a Creolina® tem um potencial mecanismo de agregação plaquetária, assim como o veneno botrópico.

Referente à Hematimetria pôde-se constatar que em G2, G4 e G5 o número médio de hemácias apresentou-se inferior ao G1 (grupo controle). Nas lâminas de estirado sanguíneo foi constatado a presença de hemácias crenadas em G3 (+), G4 (++) e G5 (+++), mas em G2, grupo que recebeu apenas veneno botrópico mais sangue bovino não foi constatada nenhuma alteração morfológica (Tabela 3), a não ser a agregação plaquetária descrita anteriormente, sugerindo que em G3, G4 e G5 os achados de hemácias crenadas deram-se devido à presença da Creolina®.

Gráfico 1. Análise Hematimétrica referente aos grupos experimentados, os quais não demonstraram nenhum resultado significativo.



Fonte: Silva (2019).

Estatisticamente não é possível realizar nenhuma afirmativa em relação aos grupos testes, pois nenhum deles apresentou resultado significativo no nível de 5% (Tabela 3).

Tabela 3: Tabela referente às alterações morfológicas em hemácias e plaquetas, obtidas através de estiraço sanguíneo corado com panótico rápido, posteriormente avaliado em microscópio.

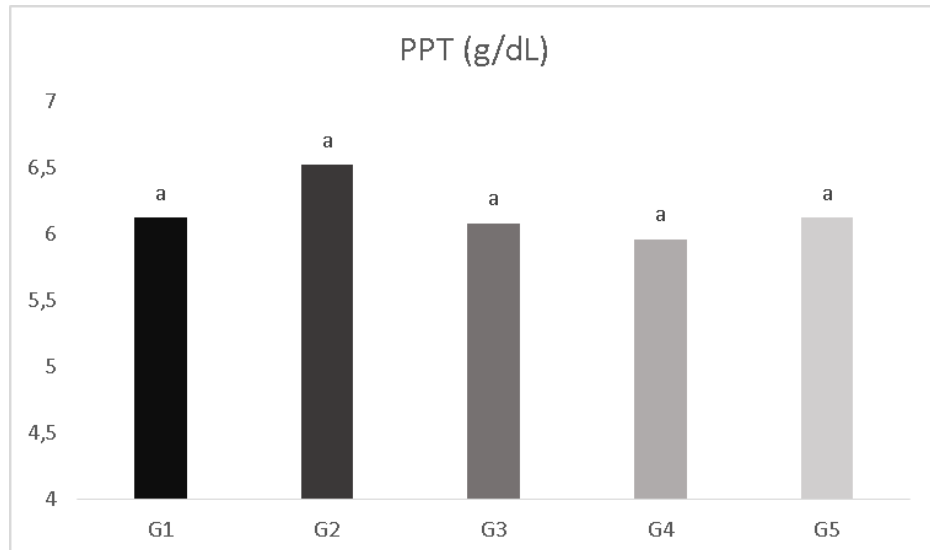
	G1	G2	G3	G4	G5
Agregação Plaquetas	-	+++	+++	+++	+++
Hemácias Crenadas	-	-	+	++	+++

Fonte: Silva (2019).

3.3 PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL (PPT) / FIBRINOGENÍO

Notou-se um aumento na PPT em G2 em relação a G1 (Gráfico 2). Segundo Boni, Zeni e Albuquerque (2011) ao realizar experimentos com veneno botrópico em camundongos, relatou um aumento no valor médio da PPT, quando comparadas ao grupo controle.

Gráfico 2. Gráfico referente a quantificação das Proteínas Plasmáticas Totais de todos os grupos experimentados, onde estatisticamente não é possível observar nenhum grau de significância.



Fonte: Silva (2019).

Em G3, G4 e G5 notou-se uma diminuição do valor médio da PPT, sugerindo uma possível atividade proteolítica devido à presença de Creolina® nessas amostras, toda via tais resultados não se apresentaram significativos no método utilizado.

Ao quantificar o fibrinogênio pode-se notar um aumento em todos os testes, entretanto, G3 foi o único grupo que apresentou resultado significativo para o fibrinogênio ao ser comparado com G1 (Gráfico 3).

Notou-se que trinta minutos após a realização da bateria de teste de cada grupo, as amostras começaram a coagular, o que indica o consumo de fibrinogênio, pois para que ocorra o processo de coagulação o fibrinogênio obrigatoriamente deve ser consumido. No grupo G3 que apresentava apenas amostra de sangue venoso acrescido com Creolina® também se pode observar esse efeito coagulante (Figura 1).

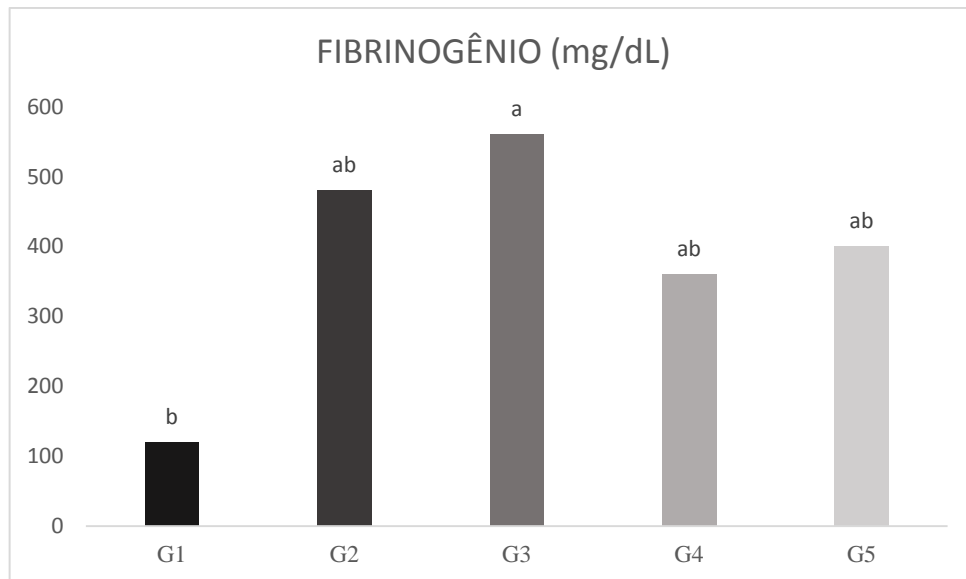
Figura 1. Imagem de amostras em eppendorf, 30 minutos após realização de testes hematológicos.



Fonte: Silva (2019).

Observou-se que em todos os grupos exceto o controle (G1), ocorreu o processo de coagulação. Apesar dos testes mostrarem que o fibrinogênio estava alto, a imagem acima sugere que o fibrinogênio foi degradado até mesmo na presença da creolina. Destaca-se que esse processo de coagulação ocorreu de forma gradativa ao longo do intervalo de trinta minutos.

Gráfico 3. Gráfico referente a concentração sérica de fibrinogênio (mg/dl) de todos os grupos experimentados, com resultado significativo de G3 em relação a G1.



Fonte: Silva (2019).

Os produtos da degradação de fibrinogênio e fibrina podem ser encontrados em níveis basais em indivíduos saudáveis, mas têm sua quantidade plasmática aumentada em decorrência de distúrbios hemostáticos (SENISE, 2014).

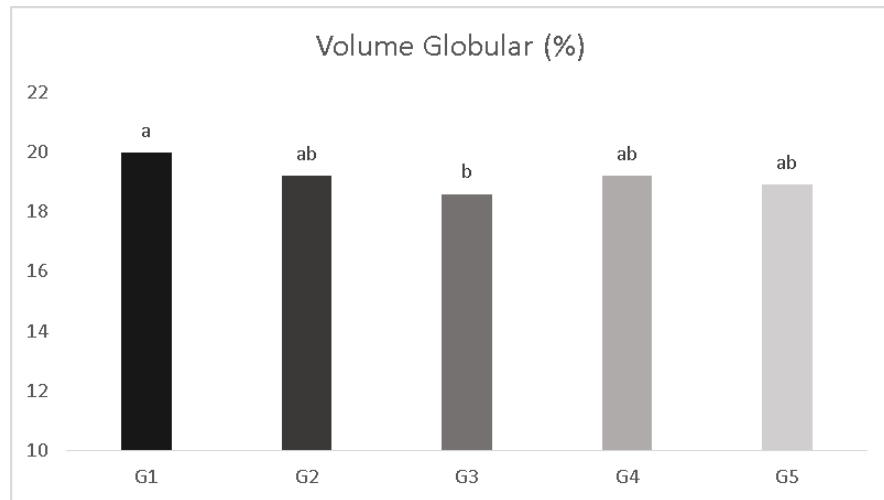
É sabido que o número de fibrinogênio amostral não é capaz de se mostrar superior ao do grupo controle, onde esse resultado significativo nos sugere um falso aumento da concentração sérica do fibrinogênio, possivelmente instituído por componentes presentes na Creolina®.

3.4 VOLUME GLOBULAR

Alterações hematológicas em paciente que sofrem por agravos pelo envenenamento por *Bothrops jararaca* são caracterizadas pela diminuição do volume globular (MOTTA, 2008). Estudos observaram também, presença de hemólise intravascular em pacientes picados por *Bothrops jararaca* (SENISE, 2014).

Nos grupos experimentados foi notória a atividade hemolítica causada pelo veneno botrópico *in vitro* (Gráfico 4), assim como, em experimentos realizados por outros autores (CISCOTTO, 2005).

Gráfico 4. Gráfico referente ao Volume Globular dos grupos experimentados, com resultado significativo que evidencia a potencial hemolítica Creolina®.



Fonte: Silva (2019).

Entretanto, dessas amostras com atividade hemolítica, as que apresentaram significância foram as do grupo G3, que por sua vez não possuíam veneno botrópico, apenas Creolina® + sangue bovino, sugerindo também uma ação hemolítica da Creolina®.

4. CONCLUSÃO

Após análises estatísticas observou-se que veneno botrópico na dose de 2 μ l, não foi capaz de desencadear alterações significativas *in vitro*.

Não foi constatado potencial antiofídico da Creolina® ao utilizar a dose de 1 μ l *in vitro*. Que demonstrou, inclusive, um potencial de agregação plaquetária e distúrbios hemolíticos.

5. REFERÊNCIAS

BITENCOURT, M.A.O. **Avaliação anti-inflamatória e antipeçonhenta das espécies *Hancornia speciosa* e *Mimosa tenuiflora* em modelos experimentais de inflamação e envenenamento induzido por *Bothrops jararaca* e *Tityus serrulatus***. 2015. 150f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN.

BOCHNER, R. et al. A Profile of Snake Bites in Brazil. **Clinical Toxicology**. v.19, n. 1,p.1-7,30Abr.2014.Disponível:http://www.researchgate.net/publication/274958480_A_Profine_of_Snake_Bites_in_Brazil_2001_to_2012. Acesso em: 8 maio 2019.

BONI, A. P; ZENI, A. L. B; ALBUQUERQUE, C. A. C. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* em camundongos inoculados experimentalmente com veneno botrópico. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, p. 176-185, 20 maio 2011. Disponível em: <http://rbfarma.org.br/files/rbf-2011-92-3-16.pdf>. Acesso em: 26 maio 2019.

CAMPOS, J. A.*et al.* Acidentes por animais peçonhentos na infância. **Jornal de Pediatria**. Rio de janeiro, 1999.

CARVALHO, L. R. R. A. **POTENCIAL TERAPÊUTICO DA CREOLINA® NA REVERSÃO DOS QUADROS CAUSADOS POR ENVENENAMENTO DE *Bothrops jararaca* EM RATOS**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina veterinária) - Universidade Federal da Paraíba, Areia PB.

CINTRA, C. A. et al. ACIDENTES OFÍDICOS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.18, n 10, p. 58-71, 1 jul. 2014. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/Acidentes%20ofidicos>. Acesso em: 8 maio 2019.

CISCOTTO, P.H.C. **Purificação e caracterização biológica (estrutural, antibacteriana, antiparasitária, hemolítica e antigênica) de componentes do veneno da serpente *Bothrops jararaca***. 2005. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia.) -

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005. Disponível em: Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/rbepid/2009.v12n1/50-59>. Acesso em: 25 maio 2019.

GARCIA, J.T. C. **Pododermite dos bovinos (Frieiras)**. Bagé RS: Embrapa Pecuária Sul, 1999. Disponível: <https://www.embrapa.br/buscadepublicacoes//publicacao/918739/pododermite-dos-bovinos-frieiras-uma-alternativa-de-tratamento>. Acesso em: 16 maio 2019.

GOMES, J.A.S.G. **Inibição dos efeitos locais induzidos pelas peçonhas das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Bothrops jararaca* pelo extrato aquoso das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêutica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN.

GUTIÉRREZ, J. M; THEAKSTON, D. G; DAVID A, W. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. **PLoS Medicine**, Estados Unidos, ano 2006, v.3, n. 6, p. 727-731, 6 jun. 2006.

GUTIERREZ, J. M; ESCALANTE, T; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.54, n.7, p. 976-987, 1 dez. 2009. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101010900163>. Acesso em: 10 maio 2018.

HUBER, W.G. Antissépticos e desinfetantes. In: JONES, L.M. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

LEMOS, J.C. et al. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, p. 1-10, 1 mar. 2009. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/rbepid/2009.v12n1/50-59>. Acesso em: 17 maio 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/>. Acesso em: 7 maio 2019.

MOTTA, Y.P. **Aspectos clínico, laboratorial e histopatológico da intoxicação experimental pelos venenos das serpentes Bothrops jararaca e Crotalus durissus terrificus em ratos Wistar tratados com antiveneno e Mikania glomerata.** 2008. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

PINHO, F.M.O; PEREIRA, I.D. OFIDISMO. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.47, n.1 p. 24-29, 24 set. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v47n1/a26v47n1.pdf>. Acesso em: 9 maio 2019.

PUORTO, G; FRANÇA, F.O.S. Serpentes não peçonhentas e aspectos clínicos dos acidentes. *In: Animais peçonhentos no Brasil Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes.* Sarvier, 2ª ed. São Paulo: 2009. p. 125–31.

QUEIROZ, G. P. *et al.* Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon**, v.52, n.8, p. 842-851, 17 out. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v47n1/a26v47n1.pdf>. Acesso em: 8 maio 2019.

SANTOS, K. C. *et al.* Systematic review: the main complications of accident bothropic. **EvsPUC GO**, Goiânia, p. 83-90, 1 out. 2016. Disponível em: <http://seer.pucgoias.edu.br/files/journals/3/articles/5189/submission/review/5189-15550-1-RV.pdf>. Acesso em: 8 maio 2019.

SENISE, L. V. **Avaliação dos distúrbios hemostáticos induzidos por veneno de serpentes *Bothrops jararaca* (Squamata Viperidae) adultas e filhotes e eficácia do tratamento com soro antibotrópico.** 2014. 94 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutor em Ciência, Instituto de Biociência da Usp, São Paulo, 2014.

SILVA, A. M. *et al.* Accidents with poisonous animals in brazil by age and sex. *Journal of Human Growth and Development*, São Paulo, p. 7-10, 25 jan. 2015.

STEFFEN, R. B. *et al.* Efeitos da creolina sobre a nematofauna associada à cultura do fumo. Rio Grande do Sul: **Tecno-Lógica**, v.14, n.1, p.20-25,2010.

THRALL, M.A. et al. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. 2ª. ed. São Paulo. Roca,2014.

TOKARNIA, C. H; PEIXOTO, P. Vargas. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, 3 jun. 2006. Disponível: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2006000200001&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 25 maio 2019.

YAMASHITA, Karine Miki. **Patogenese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca***. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2006000200001&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 23 de maio de 2019.

ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer favorável da comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFPB.



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PESQUISA IN VITRO DO POTENCIAL ANTI-FISICIDICO DA CREOLINA® FRENTE AO VENENO DA BOTHROP JARARACA", protocolada sob o CEUA nº 8049160419 (0000000), sob a responsabilidade de **Ricardo Romão Guerra** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 10/05/2019.

We certify that the proposal "IN VITRO INVESTIGATION OF CREOLINA® ANTI-PHYSIOLOGICAL POTENTIAL IN FRONT OF THE BOTHROP POISON POISON ", utilizing 7 Bovines (males and females), protocol number CEUA 8049160419 (0000000), under the responsibility of **Ricardo Romão Guerra** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/10/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2019 a 12/2019** Área: **Zootecnia**

Origem: **Laboratório de Bovinocultura CCHSA**

Espécie: **Bovinos** Sexo: **Machos e Fêmeas** Idade: **8 a 12 meses** N: **7**

Linhagem: **Girlanda** Peso: **150 a 200 kg**

Local do experimento: **Setor de Bovinocultura da Universidade Federal da Paraíba**

João Pessoa, 25 de maio de 2019

Prof. Dra. Isilania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

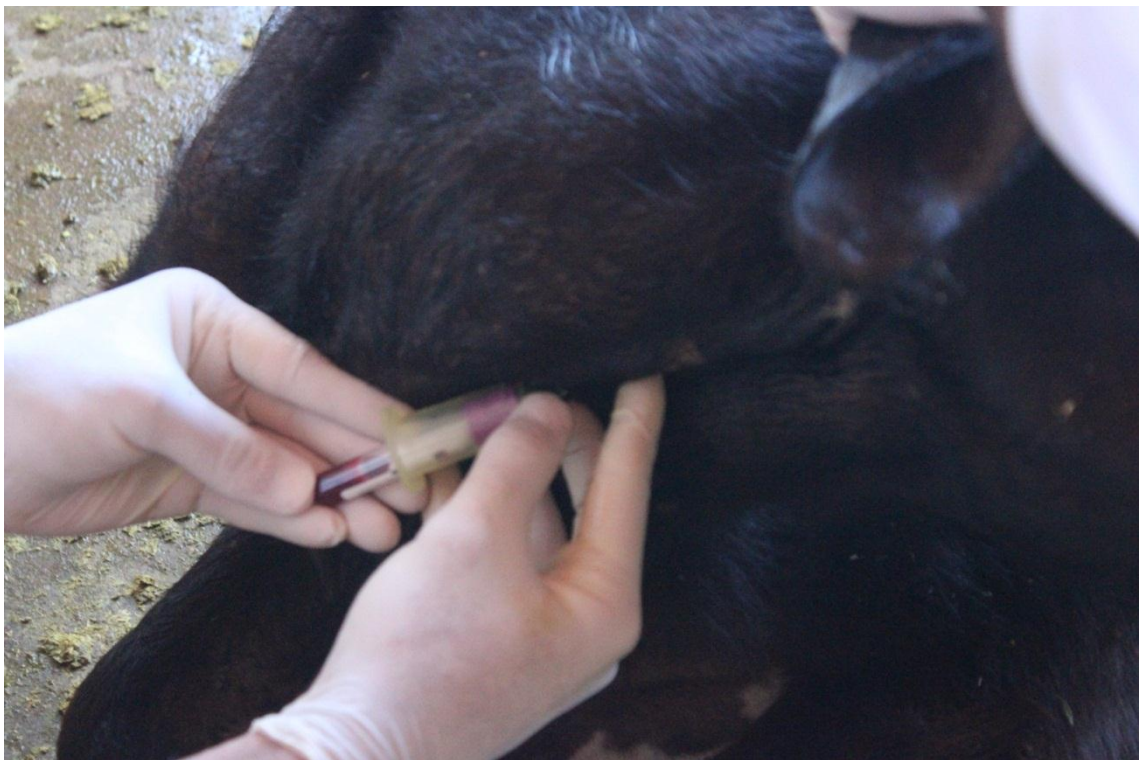
Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO 2: Animais do Laboratório de Bovinocultura-CCA (UFPB).



Fonte: Silva (2019)

ANEXO 3: Coleta de sangue venoso, através de punção da jugular externa.



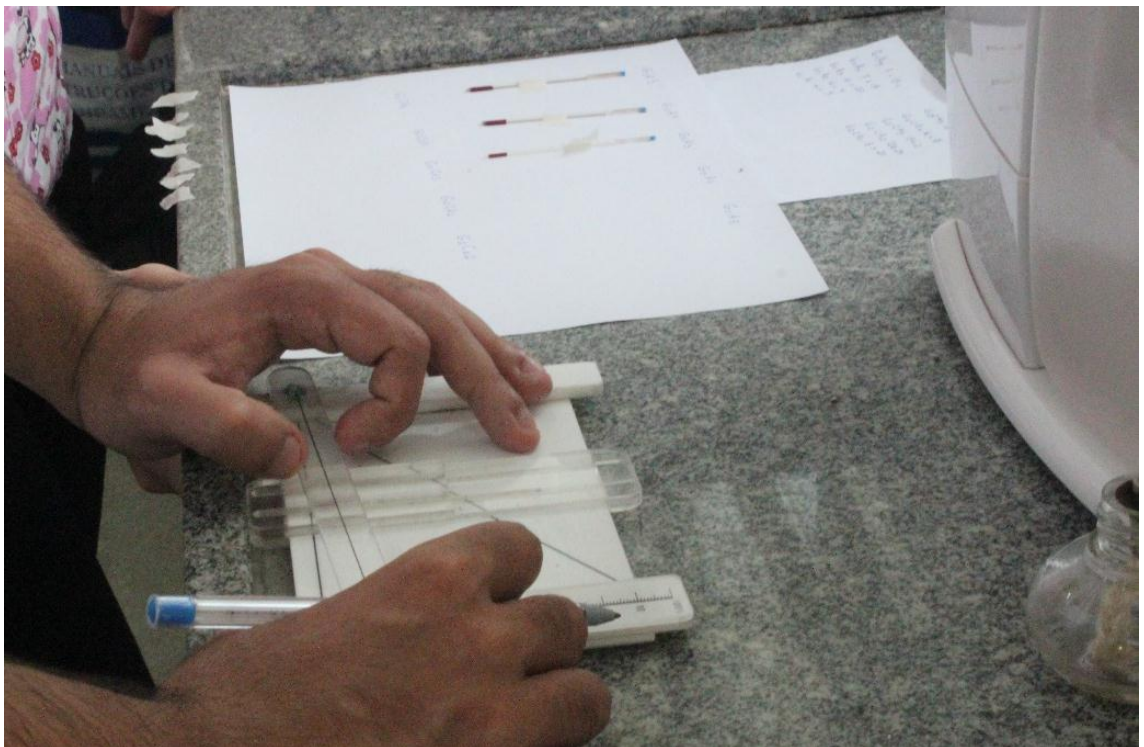
Fonte: Silva (2019).

ANEXO 4: Amostras acondicionadas para envio ao Laboratório de Patologia Clínica.



Fonte. Silva (2019).

ANEXO 5: Teste laboratorial específico para determinação do Volume Globular.



Fonte: Silva (2019)

ANEXO 6: Coloração pelo Panótico rápido.

Fonte: Silva (2019).

ANEXO 7: Quantificação do PPT através da refratometria.

Fonte: Silva (2019)