



**UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL
"FRANCISCO DE MIRANDA"
ÁREA CIENCIAS DEL AGRO Y DEL MAR
PROGRAMA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**Efecto del Extracto de *Citrus aurantifolia* sobre la
toxicidad del veneno de *Crotalus durisuss cumanensis*
del estado Falcón.**

Tutor:

Prof. Marcelo González

Autores:

**Rojas Nazarelys
Romero Yenny**

Complejo Académico Ing. Agr. "José Rodolfo Bastidas", Abril de 2015

**Efecto del Extracto de *Citrus aurantifolia* sobre la toxicidad del veneno de
Crotalus durisuss cumanensis del estado Falcón.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL
“FRANCISCO DE MIRANDA”
ÁREA CIENCIAS DEL AGRO Y DEL MAR
PROGRAMA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**Br. Rojas Nazarelys
Br. Romero Yenny**

**Trabajo presentado ante el jurado designado por la Dirección del Programa de
Ciencias Veterinarias –U.N.E.F.M, como requisito parcial para optar al título de
Médico Veterinario**

Complejo Académico Ing. Agr. “José Rodolfo Bastidas”, Abril de 2015

ACTA DE APROBACIÓN

Trabajo Especial de Grado presentado por las bachilleres **Rojas Nazarelys y Romero Yenny**. Titulado: **“Efecto del Extracto de *Citrus aurantifolia* sobre la toxicidad del veneno de *Crotalus durisuss cumanensis* del estado Falcón”**, aprobado en nombre de la “Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda” por el jurado designado por la dirección del programa de Ciencias Veterinarias.

INDICE GENERAL

ACTA DE APROBACIÓN	i
INDICE GENERAL	ii
INDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	4
MATERIALES Y MÉTODOS	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	33
RECOMENDACIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la serpiente <i>Crotalus durissus cumanensis</i>	5
Tabla 2. Clasificación taxonómica del <i>Citrus aurantifolia</i>	17
Tabla 3. Correlación de la Prueba in vitro de la actividad fosfolipasa A2 del veneno liofilizado de <i>Crotalus durissus cumanensis</i> con la actividad hemorrágica, actividad proteolítica, inhibición de proteasas e inhibición de actividad hemorrágica bajo el efecto de los diferentes tratamientos.	26
Tabla 4. Determinación de la Concentración de Veneno Letal 50 (DL50)	28
Tabla 5. área hemorrágica (expresada en cm ²) de los diferentes grupos de ratones inoculados con 17 mg de veneno Crotalico por vía subcutánea.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Correlación de la Prueba in vitro.....	27
Figura 2. Determinación de la Concentración de Veneno Letal 50 (DL50).....	28

RESUMEN

Rojas. N, Romero. Y, 2015 Efecto del extracto de *Citrus aurantifolia* sobre la toxicidad del veneno de *Crotalus durisuss cumanensis* del Estado Falcón.

Venezuela tiene un alto porcentaje en accidentes ofídicos, y pocas alternativas que sean eficaces para las víctimas que han sido emponzoñados, a partir del extracto del *Citrus aurantifolia* se buscó comprobar el poder neutralizante sobre el veneno de la *Crotalus durissus cumanensis* la cual es altamente hemorrágico. El objetivo de esta investigación fue comprobar la efectividad del extracto de *Citrus aurantifolia* sobre la toxicidad del veneno, ya que existen deficiencias en el país en cuanto a la producción de suero antiofídico efectivos, por lo tanto se desea proporcionar a las comunidades de áreas rurales del estado Falcón un antiveneno efectivo en los accidentes ofídicos por esta especie. Para este estudio se utilizaron pools de venenos liofilizados, para este estudio, se usaron ratones albinos (cepa NMRI). Se realizaron las pruebas bioquímicas para evaluar la toxicidad in vitro con la determinación de la actividad proteolítica del veneno de *Crotalus* y la determinación de la actividad fosfolipasa A2 . donde tuvo como resultado Para estas pruebas se usó el método de titulación propuesto por Yang y King XXXX para la actividad fosfolipasa. Como solución tituladora se utilizara NaOH 0,01 N, previamente valorado. Como sustrato se utilizaron una emulsión de yema de huevo en 200 ml de agua destilada, añadiendo 60 μ l de timerosal y 20 mM de cloruro de calcio en 100 ml de agua destilada, Toxicidad in vitro: Determinación de la Actividad Proteolítica el ensayo se manipulo por el método espectrometría UV a 280 nanómetros. Para las pruebas bioquímicas donde se evaluaron la toxicidad in vivo Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) del veneno *Crotalus durisuss cumanensis*: 50 Dosis letal, Determinación de la Actividad Hemorrágica del veneno de *Crotalus durisuss cumanensis*, manejo por el método de Kondo et al., (1.960). Que consiste en inocular por triplicado a los ratones con 10 μ g de veneno diluido en 0.1ml en Solución Amortiguadora Fosfatada (SAF). 2 horas después de ser inculados por vía subcutánea los animales serán sacrificados para posteriormente medir el área hemorrágica sobre la piel disecada y distendida, cercana al punto de inoculación del veneno.

Palabras clave: **veneno, serpiente, *Citrus aurantifolia*.**

INTRODUCCION

En el mundo cada año se registran cerca de cinco millones de mordeduras de serpiente y picaduras de escorpión, mayoritariamente en África, Asia y América Latina, de las cuales, entre 50 y 75% requieren tratamientos con antisueros para evitar el fallecimiento, amputación, graves trastornos neurológicos causan 4.000 muertes anuales (Balladelli, 2009). Venezuela ocupa el tercer lugar en lo referente a coeficiente de mortalidad por emponzoñamiento ofídico a nivel mundial, siendo ocupados los dos primeros lugares por Birmania y la India respectivamente. Durante los 4 primeros años de la década de los 90 el estado Falcón ocupó el sexto lugar en orden decreciente de mortalidad por emponzoñamiento ofídico (Sadner y Montilla, 1994).

Las serpientes habitan vastas regiones del planeta por ser de sangre fría sus poblaciones aumenta desde los climas fríos a los templados y los tropicales; también son más abundantes en las zonas silvestres y pocos transitadas por el hombre y muy poco presentes en las zonas pobladas muchas accidentes ofídicos son causados por desconocimiento de esta especie veneno y también por invasión a su habitad.

La mordedura de la serpiente cascabel tiene efectos biológicos del veneno de serpiente, se debe conocer que se trata de una mezcla compleja de enzimas, toxinas y otras proteínas, destinados a la digestión de sus presas, cuyo efecto se combina en función de sus propiedades y proporciones; por otra parte la composición de estos venenos varía considerablemente de una especie a otra, explicando ello la diversidad de sus efectos biológicos. Las principales manifestaciones clínicas causadas por la mordedura de serpientes y en especial *Crotalus durissus cumanensis*, son generalmente atribuidas a los efectos neurotóxicos de su veneno, la miotoxicidad sistémica (ocasionada fundamentalmente por fosfolipasas A₂) y a los efectos sobre la hemostasia (Hernández *et al.*, 2005).

Por otra parte, las manifestaciones locales en este tipo de envenamiento son escasas con respecto a aquellas por los envenamientos botrópicos. A los pocos minutos de la inyección del veneno aparece dolor local de leve a moderada intensidad, que dependiendo de la cantidad de veneno inyectando, aparece en la articulación más cercana de la zona mordida, irradiándose al resto del miembro. Esta sensación desaparece rápidamente, siendo sustituida por un adormecimiento (hipoestesia) y pesadez en todo el miembro lo que puede llevar a la muerte de la víctima (Rengifo, 2005).

En la actualidad no existe un suero antiofídico específico para envenenamiento crotalico, lo que ha llevado a muchos investigadores a la búsqueda de una nuevas alternativas para contrarrestar las manifestación que presenta la victima cuando es emponzoñado por la serpiente, en este caso por la especie *Crotalus durissus cumanensis*. Ente las búsquedas de tratamientos efectivos que pueden contrarrestar los efectos de los venenos de serpientes con pocas complicaciones o efectos adversos y de bajos costo han sido objetivos la evaluación de múltiples componentes medicinales y fórmulas de origen artesanal tradicionalmente se han utilizado otros tratamientos antiofídicos basados en la herbolaria y sustancias naturales como: orine de venado, medicamento, entre otros (Otero *et al.*, 2002).

En esta investigación se buscó una alternativa de medicina terapéutica tradicional de origen natural a partir del *citrus aurantifolia* que ayude a detener o inhibir el efecto del veneno una vez es inoculado por la serpiente en las víctimas y así evitar manifestaciones clínicas descritas anteriormente que puedan ocasionar la muerte, así como también se busca ayudar a las comunidades que son afectadas con accidentes ofídicos y que se encuentran alejadas de un centro hospitalario o en otro caso no cuenten con recursos para obtener un suero antiofídico polivalente ya que es de alto costo.

OBJETIVOS

General

Probar la efectividad del extracto *Citrus aurantifolia* sobre la toxicidad del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* del Estado Falcón.

Específicos

- Determinar la toxicidad *in vivo* mediante las pruebas biológicas como, determinación de la dosis letal 50 (DL 50), determinación de la actividad hemorrágica del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* del Estado Falcón
- Determinar la toxicidad *in vitro* mediante las pruebas bioquímicas, como determinación de la actividad proteolítica, determinación de la fosfolipasa A₂ del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* del Estado Falcón
- Demostrar el efecto del extracto de *Citrus aurantifolia* sobre la toxicidad del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* del Estado Falcón.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Las serpientes pertenecen a la clase de Reptilia donde se ubican aquellos animales que presentan un corazón con tres cavidades, respiración pulmonar y temperatura corporal variable poiquilotermos, estos tienen una piel distensible y recubierta totalmente por escamas corneas epidérmicas (orden *Spquamatha*) representada por 3 subórdenes: Sauria o *Lacertilia*, *Ambhisbaenia*, *Serpentia* u *Ophidia*. Las serpientes (Suborden: *serpentia*) se caracterizan por poseer un cuerpo alargado y recubierto por escamas, buen olfato, ausencia de extremidades y de oídos, externo. (Lancini, 1986).

Las serpientes son más abundantes en las zonas silvestres y pocos transitados por el hombre y muy poco presentes en las zonas pobladas. Generalmente resulta en la mordedura por parte de la serpiente al humano, consecuencias fatales si el ofidio es de tipo venenoso. Las serpientes venenosas representa el 19% del total de todas las especies de serpientes conocidas y todas las serpientes venenosas descritas en la bibliografía científica especializada pertenecen a cinco familias: *Viperidae*, *Crotalidae*, *Elapidae*, *Hydrophyidae* y *Culobridae*. Todas las especies pertenecientes a las cuatro primeras familias son venenosas. Aunque el hombre es sensible a todos los venenos, el de las serpientes que se alimentan de presas de sangre caliente representan el mayor peligro dada a la semejanza entre las fisiologías de dichas presas y el hombre. (Zug y Carl, 1999).

De acuerdo con Silva (1989) las serpientes de Cascabel se clasifican taxonómicamente de la siguiente manera (ver tabla 1):

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis*

Reino	Animal
Phyllum	Chordata
Clase	Reptilia
Orden	Squamatha
Familia	Viperidae
Género	Crotalus
Especie	<i>Crotalus durissus</i>
Nombre común	Cascabel

Fuente: Silva, 1989.

Las serpientes venenosas

La familia virperidae comprende a las serpientes venenosas las cuales corresponde a la mapanare, cascabeles y la cuaima son de extrema peligrosidad, no solo por su condición de ser serpiente venenosa, sino también por su comportamiento sumamente agresivo, sobre todo las mapanares y cascabeles. Este a pesar de su peligrosidad se puede catalogar como una serpiente noble ya que nos anuncia con su cascabel cuando estamos cerca de ella o cuando se siente amenazada (Rodríguez, 2010). Este género también presenta un grupo de especies y subespecies en el país *Crotalus durissus cumanensis*, *Crotalus vegrandis*, *Crotalus pifanorum*, *Crotalus durissus maricelae*, *Crotalus durissus ruruima* de las cuales *Crotalus cumanensis* abarca todo el territorio nacional (Navarrete *et al*, 2009).

La serpiente cascabel está ampliamente distribuida en el país se encuentra en zonas bajas así como en montañas, como por ejemplos la cascabel común *Crotalus durissus cumanensis* también existen otras sub especies cuya condición es endémica como por ejemplo la cascabel negra *Crotalus durissus pifanorum* y la cascabel de aracoa *Crotalus durissus vegrandis* las cuales se encuentran en Guárico y Monagas. Estas serpientes son de actividad nocturna y son una pieza fundamental en el control natural biológico de roedores y otras plagas (Rodríguez, 2010).

Estas se distinguen por tener cabeza pequeña, acorazonada y cubierto de escamas, en su mayoría, pequeñas y aquilladas o en forma de tubérculo. El cuerpo es robusto y triangular; la cola es muy corta, gruesa y siempre terminada en anillos huecos, córneos y engastados entre sí que producen un ruido peculiar cuando el animal agita la cola. Estos anillos están formados por una sustancia similar a las uñas, llamada queratina y se forma con el resto de cada muda de la capa epidérmica de la piel del reptil (Lancini, 1986).

Las serpientes son las más prodigiosas fuente de toxinas que pueden llegar a ser útiles a la humanidad. Sus venenos están compuestos por complejas mezclas de polipéptidos y proteínas que inducen una variada gama de efectos farmacológicos, los cuales proveen una útil herramienta para la comprensión de muchos eventos moleculares dentro de procesos fisiológicos normales. Los químicos fueron los primeros en considerar los venenos como objetos de interés, esforzándose por definir su composición. Sometieron a los venenos a reacciones con diferentes tipos de reactivos e intentaron separar sus componentes. Observaron que algunos tipos de reactivos los destruían, mientras que otros los precipitaban. En 1878, ocurrió un nuevo hallazgo en la investigación de los venenos de las serpientes, cuando Pelder, propuso que los venenos eran sustancias “tipo proteínas” y luego utilizando el veneno de *Crotalus adamanteus*, determinó que su naturaleza no era homogénea (Boquet, 1992).

Características del veneno del género *Crotalus*

El veneno de *Crotalus* presenta un conjunto de péptidos y proteínas tóxicas que presentan actividad hemorrágica coagulante, nefrotóxica y miotóxica (Levano *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2008) el cual es utilizado por la serpiente tanto para movilizar como para dar el comienzo a la digestión de los tejidos de la presa (Pérez *et al.*, 2008).

El mecanismo de acción del veneno no está totalmente dilucidado, pero se pueden identificar de acuerdo a su actividad en el organismo en Citotóxico y Neutóxico aunque existen combinaciones de ambos que generan variabilidad del veneno

(Gutiérrez y Rucavado, 2000). Los venenos citotóxicos tienen gran cantidad de enzimas proteasas que hidrolizan el enlace péptico de proteínas de acuerdo al sitio activo y del mecanismo de acción esta se puede clasificar en cuatro clases principales: serina, proteasa, cisteína proteasa, zinc proteasa, aspartil proteasas (Moreira, 1994).

En estudios realizados se han propuesto que los venenos citotoxicos que presentan principalmente enzima metaloproteinazas, alcanzara a hidrolizar algunas proteínas que componen la lámina basal que rodea las células endoteliales de los vasos capilares y vénulas, afectando la integridad funcional y ruptura de las células endoteliales ocasionándose extravasación e isquemia de tejidos adyacentes, manifestados el efecto necrótico caracterizado posterior a la inoculación del veneno (Moreira 1994; *et al.*, Gutiérrez y Rucavado, 2000).

Las hemorraginas representadas por la metaloproteinazas y desintegrinas causan daños al tejido endotelial ocasionando una fuerte hemorragia, influyen en la coagulación sanguínea y la agregación plaquetaria interfiriendo, potenciando o inhibiendo la agregación (Kini y Evans, 1990; Mclane, 1998). Estas enzimas evitan la formación del tapón hemostático, convirtiendo el fibrinógeno en fibriopeptidos estas enzimas pueden mostrar menor toxicidad que las neurotoxinas (Chippaux, 1998).

El veneno neurotóxico, constituido principalmente por fosfolipasas A₂ (PLA₂s) se caracteriza por presentar actividad a nivel sistémico principalmente en la inhibición de la conducción nerviosa originando el bloqueo de la unión neuromuscular y con la consecuente parálisis flácida (Bolaños, 1984; Fran y Cardoso, 1995; Gutiérrez, 1995; Hernández, 2005).

Las PLA2s, son enzimas del tipo hidrolasa-lipasa que induce cambios en la composición de membranas, activan las cascadas inflamatorias y generan vías de señalamiento celular (transducción de señales) existen diversos tipos de PLA2s clasificadas por su funcionalidad y localización celular y tisular indicado para los venenos de los grupo IA (cobras y crotalus) IIB (víboras de gabon) y IX (veneno de víboras) siendo esta PLA2s de tipo “secretoria” (García y García, 2009) esta PLA2s son moléculas que hidrolizan el enlace acil-éster en la posición sn_2 -acil de glicerofosfolipidos, liberado 3-sn-isofosfoglicerido y ácidos grasos (Tizard, 1995). El principal ácido graso liberado es el araquidónico, el cual es transformado por la enzima ciclooxigenasas y lipoxigenasas en eicosanoides o sustancias proinflamatorias como prostaglandina, prostaciclina, leucotrienos, tromboxanos por el cual afecta también la coagulación (Okumura, *et al* 2002; Ohno *et al.*, 2003). Dentro de las sustancias incluidas en el veneno, las fosfolipasa que originan actividad miotóxica y neurotóxica ejercen función en receptores pre y post simpático, las toxinas, generalmente por los efectos catalíticos se acoplan a receptores de membrana induciendo lisis celular.

La evaluación de las toxinas de serpientes incluye como moléculas centrales al metal y serinproteasas, así como (PLA2s por cuantos ellas son responsables de prácticamente el 100% de la fisiopatología del envenenamiento ofídico. La actividad proteolítica se mide *in vitro* incubando veneno de serpientes a evaluar, con una concentración conocida de una proteína de referencia normalmente albumina o caseína trascurrido un periodo de tiempo determinado (normalmente 10 minutos), se cuantifica la proteína remanente. La diferencia es el resultado de la degradación proteolítica por proteasas del veneno. Por su parte la actividad de fosfolipasa A₂ se mide incubando fosfolipido (usualmente lecitinas de huevo) con el veneno. Transcurrido un periodo de tiempo determinado (normalmente de 10 se titula los ácidos grasos liberados con una base en ambos casos se expresa la actividad enzimática como unidad de actividad proteolítica y fosfolipasa respectivamente que corresponde a los miligramos de sustratos por miligramos de venenos por minutos (Newsholme, 1987).

La composición química de los veneno es muy compleja presenta múltiples toxinas y enzimas que alteran los procesos fisiológicos originando un cuadro caracterizado por presentar efectos locales inmediatos y en casos graves alteraciones sintéticas variables y daño local y sistémico que genera una serie de procesos morbosos que ocasionan una inestabilidad orgánica pudiendo llevar la muerte del individuo afectado (Gutiérrez *et al.*, 2005; Castellón *et al.*, 2007).

En la evaluación de los diferentes parámetros en química de pacientes que sufrieron envenenamiento ofídico, los niveles enzimático que son clínicamente importantes, pueden encontrarse alterados debidos al daño ocasionado a tejidos celulares que provocan su liberación desde las células dañadas hacia el torrente sanguíneo (Ramírez, 2006) tal es el caso de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) que comprende un grupo de isoenzimas que se encuentran presentes en diversos tejidos como lo son el musculo esquelético, musculo cardiaco, hígado, eritrocitos, al igual que en páncreas, huesos y pulmón, su incremento principal está asociado a trastornos del musculo esquelético musculo cardiaco, hígado y riñón (Tietz, 1994).

Araujo y Valdespino (2006) en su trabajo de investigación realizaron la comparación de los resultados de LDH por pruebas de análisis de varianzas donde fueron evaluadas las alteraciones enzimática e histopatológicas en rata inoculadas con veneno de la serpiente *Bothrops venezuelensis*, presentado valores promedios elevados LDH, luego de haber pasado una y tres horas posteriores a la inoculación del veneno con un leve descenso de estos niveles a partir de las nueve horas post envenenamiento corroborando lo anteriormente citado en la alteración de los valores de química sanguínea.

En el envenenamiento ofídico, Soler y Rodríguez (2005), manifiesta cambios a nivel hematológico y función orgánica caracterizados por el aumento del tiempo parcial de tromboplastina (TPT) y el tiempo protrombina (TP) hipoproteinemia, hipoalbuminemia y miglobinemia el incremento de la enzimas creatinin kinasa (CK) lactato deshidrogenasas (LHD) fosfatasa alcalina, aspartatoamiotransferasa (AST),

alaminotransferasa (ALT) aumento de la relación BUN/creatinina con presencia de hipercalcenemia, hiperfosfatemia y bilirrubinemia.

Característica del envenenamiento Veneno crotálico

Las manifestaciones locales en este tipo de envenenamiento son escasas que aquellas de los envenenamientos botrópicos. A los pocos minutos de la inyección del veneno aparece dolor local de leve a moderada intensidad, que dependiendo de la cantidad de veneno inyectando, aparece en la articulación más cercana de la zona mordida, irradiándose al resto del miembro. Esta sensación desaparece rápidamente, siendo sustituida por un adormecimiento (hipoestesia) y pesadez en todo el miembro. El dolor se exagera con cualquier movimiento o presión. Se pueda observar en los 5 a 10 minutos siguientes a la mordedura, edema directo en la zona sin que la piel se torne roja y caliente, lo cual no pone en peligro la vitalidad del miembro afectado. Estas manifestaciones iniciales del envenenamiento pueden durar varias horas a días, dependiendo de la sensibilidad de la persona al veneno. Determinar la severidad del envenenamiento sobre la base de estas manifestaciones es un poco difícil. Las manifestaciones neurológicas sistémicas son de instalación rápida, apareciendo parestesias a los 15 minutos después de la mordedura, sin embargo, pueden ser la primera manifestación del envenenamiento, apareciendo, incluso, antes del edema. Estos síntomas se presentan como sensación de sabor metálico en la boca, hormigueo y adormecimiento en nariz y lengua, con una pesadez y dificultad para hablar. En caso de envenenamientos severos, estas parestesias pueden ser notadas en cuero cabelludo y en algunos casos en las manos (Rengifo, 2005).

Las manifestaciones neurológicas se acompañan de parálisis muscular progresiva, sin embargo, esta manifestación es de aparición tardía (1 a 2 horas posteriores al envenenamiento) por el período de la latencia entre la absorción del veneno y la llegada del mismo a los terminales nerviosos. Comienzan en los ojos con caídas de los párpados o ptosis palpebral, que puede estar acompañado de estrabismo. Luego se generaliza con afección de gran número de grupos musculares, siendo difícil para el paciente mantenerse de pie e imposible mantener la cabeza erguida, y

puede presentarse dificultad respiratoria, a pesar de este cuadro el paciente permanece lucido. La aparición de coma durante el cuadro neurológico es de muy mal pronóstico (Rengifo, 2005).

Menos frecuentes que los síntomas neurológicos, pero de mayor gravedad es la aparición tardía de insuficiencia renal, donde hay disminución del volumen miccional u oliguria con desequilibrio electrolítico. Es de muy mal pronóstico que el examen de laboratorio no presente normalización de los valores alterados espontáneamente dentro de las primeras 24 a 36 horas de instalado el cuadro. Esto, generalmente denota daño renal irreversible que termina en insuficiencia de grado variable (Rengifo, 2005).

Todos estos síntomas son reversibles cuando se trata a tiempo una terapéutica adecuada, con suero antiofídico que neutralice la acción del veneno (González y Acosta, 2004). El veneno de este género es altamente tóxico siendo principalmente neurotóxico y coagulante. Del Carmen y colaboradores, (2006) reportaron para el veneno de este género *Crotalus durissus cumanensis* es responsable de inducir actividad tóxica. Este veneno ejerce influencia directa sobre el sistema nervioso, pudiendo presentar parálisis de musculo respiratorio (musculo intercostales y diafragma) sobreviniendo una insuficiencia respiratoria que mayormente es mortal.

Chirinos y Wietstruck (2000) indicaron que el veneno de serpientes *Crotalus terrificus cumanensis* falconiana es cardiotoxico para las ratas, ya que los valores de las enzimas fue mayor a medida que aumenta la dosis del veneno y el tiempo de acción del mismo (1 y 2 horas después de la inoculación) lo cual indica que dicho efecto es dosis dependiente, las alteraciones en los de CK –MB han sido un indicio para el diagnóstico del infarto del miocardio. Como consecuencia de ser expuesto esto animales una dosis letal 50 del veneno crotálico.

Terapias alternativas para el envenenamiento ofídico

En las búsquedas de tratamientos efectivos que pueden contrarrestar los efectos de los venenos de serpientes con pocas complicaciones o efectos adversos y de bajos costo han sido objetivos la evaluación de múltiples componentes medicinales y fórmulas de origen artesanal tradicionalmente se han utilizado otros tratamientos antiofídicos basados en la herbolaria y sustancias naturales (orine de venado, mapurite, medicamentos, entre otros) que han mostrado mayor o menor efectividad en mejorar el cuadro clínico del paciente, brindando alivio al mismo por su efecto positivo en contra del veneno de serpientes produciendo analgesia o inhibiendo de actividad del veneno (Castro *et al*, 1999 ; Otero *et al.*, 2002., Irausquin y Bremo, 2008; Pereañez *et al.*, 2008).

Pereañez *et al.*, (2008) evaluaron la capacidad inhibitoria de tres especies de plantas de la familia heliconiaceae, utilizadas para el tratamiento de las mordeduras de serpientes sobre los efectos proteolítica, coagulantes y hemolíticos inducido por el veneno *Bothrops asper* manifestando un porcentaje de inhibición del efecto hemolítico indirecto e inhibición del efecto proteolítico en dos especies de plantas extracto de *Helioconia curtispatha* mostro la mayor capacidad inhibitoria de los efectos hemolíticos, proteolítico y coagulantes e incluso indujo una degradación del 100% de las proteínas del veneno complejo de *B. asper*. Como había sido reportado por Otero *et al*, (2000) previamente.

Rico (2010), evaluó la actividad de los venenos *Bothrops venezulensis* y *Bthrops colombiensis* y *Crotalus durissus cumanensis* inoculo 40 animales de experimentación ratas DL50 de veneno en el miembro posterior derecho intramuscular determinando a niveles séricos de lactato deshidrogenasa (LDH) a las 24 y 72 horas post inoculación de los venenos, se realizó la descripción del daño histológico ocasionado a nivel del tejido cutáneo, hepático y renal, por medio microscopia de luz, se realizó el análisis de varianzas múltiples para la comparación de medidas grupales, los resultados obtenidos en las diferentes pruebas en presencia

y ausencia de Antimoniaco Meglumine , a través de la pruebas de T (t de student). Las actividad proteolítica y fosfolipasa A₂ de los venenos de *Bothrops* y *Crotalus* fueron incrementadas con el Antimonio Meglumine, sin embargo hubo una disminución eventos secundarios al accidentes ofídicos que conlleven a una disminución de los efectos edemáticos e inflamatorios del veneno crotálico y en consecuencia limita la aparición y fosfolipasa presente en el veneno bothtropico de allí la importancia para la aplicación de compuesto alternativos en la terapia de los accidentes ofídicos.

Jara *et al.*, (2004) en el Método para la determinación de la actividad terapéutica de compuestos inhibidores de metaloproteinasas, compuestos inhibidores nuevos y el uso terapéutico de los mismos afirman que los venenos de serpiente, son mezclas complejas que contienen una amplia variedad de enzimas proteolíticas cuya función es digerir la presa o alterar sus funciones fisiológicas, especialmente por lo que respecta al sistema circulatorio. Los venenos de las serpientes de la familia Viperidae causan unos efectos importantes sobre los sistemas hemostáticos y fibrinolítico, puesto que muestran actividad procoagulante o actividad anticoagulante. Se han encontrado factores con un poderoso efecto inhibidor sobre la agregación plaquetaria y otros que interfieren en la activación de la protrombina o de la fibrina. Una clase extremadamente importante de enzimas que se encuentran en los venenos de las serpientes de la familia Crotalidae son los llamados Factores Hemorrágicos o Hemorraginas Tienen una utilidad estructural para las serpientes ya que inducen rápidamente grandes hemorragias internas en las víctimas, lo que provoca el colapso circulatorio e impide que la víctima escape. El mecanismo de la acción hemorrágica se debe a la especial facilidad con la que las enzimas degradan un gran número de proteínas filiformes que mantienen unidas las diversas células del endotelio vascular, permitiendo de este modo que los elementos sanguíneos salgan de los vasos.

En Colombia también se han hecho estudios de 8 plantas con capacidad neutralizante para los venenos de *Lachesis muta*, *Crotalus durissus cumanensis* y *Micrurus mipartitus* y en el resto del mundo se han utilizado más de 700 plantas pero

poco son validadas en el laboratorio (Otero *et al.*, 2002). Entre las 8 plantas estudiadas están *Citrus limon* (fruto maduro), *Pleopeltis percussa* (planta entera), *Brownea rosademonte* (corteza del tallo), *Heliconia curtispatha* (rizomas), *Trichomanes elegans* (planta entera), *Tabebuia rosea* (corteza del tallo), *Bixa orellana* (hojas y ramas) y *Renealmia alpinia* (rizomas), cuyos extractos etanólicos inhibieron *in vitro* el efecto letal del veneno de *Bothrops atrox asper* de Antioquia y Chocó (Vitelbina Núñez *et al.*, 2007).

Carvalho (1999) estudió el efecto del extracto *mikania f. hastata* de esta planta sobre las lesiones histopatológicas inducidas por veneno crotálico en riñón de ratón. Luego de la inoculación de veneno más guaco intraperitoneal y el posterior análisis histopatológico se diagnosticó riñón congestivo, mientras que con la inoculación de veneno o de este más antivenina se encontraron cambios característicos de insuficiencia renal aguda. También se evaluó la eficacia del guaco por vía oral, sin embargo se concluyó que es más efectivo por vía intraperitoneal.

Saez y Soto (2009) evaluaron la actividad antiveneno en plantas en pruebas *in vitro* en *in vivo* produciendo las condiciones y efectos naturales de las mordeduras lo cual la mayor parte de los casos económicamente variable en muchos países. extracto de varios centenares de especie vegetales han sido en ratas como antídotos efectivo frente venenos ofídicos procedentes *Agkistrodon Acutus*, *Bungarus Multicinctus*, *Crotalus durissus*, *Naja Naja*, *N Hannah*, *N Malanoleuca*, *N Bothrops Jaraca*, *Bothrops Atrox*, *Bothrops Punctatus*, *Bothriechis Scheleglii*, *Laticauda Semifasciata*, *Porthidium Nasutum*, *Trimesurus Flavoviridis* y *Vipera sp.* Algunas de ellas como: *Brownea Rosademonte*, *Pleopeltis Percussa*, *Heliconia Cortispatha*, *Bixa Orellana*, *Citrus limón*, *philodendro*, *tripartum*, *Ficus Nymphaeifolia*, *Struthanthus Orbicularis*, *Gonzalagunia panamensis*, *Tababuia Rosea*, *Renealmia Alpinia*, o *Senna Dariensis* resultan 100% activas frente a los efectos hemorrágicos, enzimáticos y letales veneno de mapanare suramericano en cierta especie de la india, caso *aristolochia*, *hemidesmus Indicus*, *Gloriosa Superba* *Strychns Nux-Vomica*, *Eclipta prostrata* o

Andrographis paniculata han mostrado un gran efecto neutralizador del veneno de *crotalus adamantus*.

Los Antivenenos (Sueros Antiofídicos)

Entre los agentes neutralizantes de los efectos de los venenos de las serpientes se encuentran los sueros hiperinmune, tanto monovalentes, que poseen anticuerpos específicos contra componentes del veneno del género de serpientes en especial, como los polivalentes, que son preparados por inmunización de animales con los venenos de varias especies de serpientes (OMS, 1971).

La producción y distribución de antivenenos para la protección de la salud humana o animal son limitadas y a menudo localizadas en los niveles centrales, lo cual dificulta el acceso; también sucede que los antivenenos son producidos utilizando serpientes provenientes de otras regiones. Este último aspecto es de especial importancia debido a que la experiencia muestra que los antivenenos pueden tener mayor o menor efectividad en regiones geográficas diferentes, dependiendo de las variaciones en las propiedades bioquímicas entre los venenos utilizados en la producción de antivenenos y en los venenos responsables de accidentes. Por lo tanto, la capacidad de neutralización de las toxinas del veneno, que tienen los anticuerpos del antiveneno, sería diferente en las distintas regiones (Ruiz, 1999).

Se entiende por anti veneno o suero antiofídico una preparación de suero natural, de inmunoglobulinas purificadas o de inmunoglobulinas tratadas a partir de un suero que contiene anticuerpos contra el veneno de las serpientes que se trate (OMS, 1971).

El suero antiofídico polivalente puede ser una mezcla de varios sueros antiofídicos, cada uno de ellos específicos contra una sola especie de serpiente, producidos en diferentes animales de una misma especie, o bien puede ser un suero preparado por inmunización de animales de la misma especie contra mezclas de los venenos de

diferentes especies de serpientes. Se fabrican con frecuencia sueros anti ponzoñosos polivalentes para el tratamiento de personas mordidas con serpientes de especies desconocidas (OMS, 1971).

Guillen, (2011) produjo antiveneno monovalente en gallinas ponedoras y evaluó su capacidad de inhibir de los efectos letales del veneno de especie ofídica *Bothrops colombiensis*, comparando los porcentaje de sobrevivencia del suero antiofídico plivalente (antibothropico, anticrotalico, antilachesico) elaborado por la cas comercial “probiol” igualmente se compararon el área hemorrágica generada del veneno en presencia y ausencia de los antivenenos, el promedio de sobrevivencia de ambos suero fueron 66.6% la Igy neutralizo en un 84,1 y 58,4% de las actividades hemorrágicas y necrotizantes respectivamente, Igy es una excelente herramienta para neutralizar los efectos letales y toxicidad local del veneno Bothropico.

Pérez y Morles, (2013) determinaron Dosis Letal 50 (DL50) del veneno crudo de *Bothrops colombiensis* ubicando a una concentración de 10 µg (0,01mg/kg P.V. de veneno). Lo que arrojó como resultado el extracto total de la planta ***Petiveria alliacea*** es capaz de inhibir la letalidad del veneno Bothropico en un 100% a las 48 hrs postinoculación. Eso estima que la capacidad neutralizante del extracto total de la planta ***Petiveria alliacea*** sobre la actividad proteolítica del veneno de ***Bothrops colombiensis*** es de un 69,63% de inhibición.

Citrus aurantifolia

El árbol del *citrus aurantifolia* mide de 2 a 5 metros de altura, con ramas con espinas agudas, hojas de forma elíptico-aovadas y presencia de numerosas glándulas traslucidas. Inflorescencia en glomérulos axiales con flores blancas. El fruto es globoso amarillo hasta verde amarillento. Según Lemus (2014), la clasificación taxonómica del ***Citrus aurantifolia*** es de la siguiente manera:

Tabla 2. Clasificación taxonómica del Citrus aurantifolia

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Género	Citrus
Especie	<i>Citrus aurantifolia</i>

Fuente: Lemus, 2014

Uso: el jugo del fruto con soda se emplea como gargarismo. El jugo es empleado para aclarar manchas de piel, si se diluye con agua es tomado para combatir dolores estomacales y la diarrea, también puede ser empleado para combatir la caspa. La preparación de una pasta con soda y jugo de limón se puede emplear como desodorante.

Gamarra *et al.*,(2006) señala que el aceite esencial de limón son mezclas complejas de compuestos químicos como el limoneno, g- terpineno, citral, linalol y b- cariofileno entre otros, que puede ser representada por tres clases principales: terpenos, compuestos oxigenados y sesquiterpenos . El compuesto de sabor más significativo es el citral, mientras linalol posee características organolépticas muy distintivas. Además, limoneno, mircenol, octanal , y g- terpeno entre otros contribuyen con alta sabor aroma de aceite de limón .

La calidad del aceite esencial depende de diferentes factores, entre ellos se encuentran el quimiotipo y el biotipo de la planta, las condiciones climáticas, así como proceso de extracción, Hay más de 130 compuestos volátiles identificados en aceite de limón, siendo la mayoría de ellos insaturado, como los terpenos, que se pueden modificar fácilmente, causando pérdidas en el sabor y aroma del aceite esencial, Aceite esencial de limón, básicamente, consiste en el 75% de terpenos, el 12% de compuestos oxigenados.

Carrillo y Moreno. (2007) realizaron un estudio para determinar las plantas con mayor grado de creencia popular en sus propiedades curativas. Los problemas de salud más frecuentes fueron: gripe (21%), seguido por fiebre y dolor de cuerpo (17 y 12%, respectivamente). Se identificaron 29 especies de plantas medicinales, pertenecientes a 27 géneros y 21 familias botánicas. Entre las plantas medicinales más utilizadas para tratar dichos problemas (NUS >20%) figuran: *Sambucus* sp. "Saúco" (36,67%), *Micromeria brownei* (SW.) Briq. "Poleo" y *Citrus aurantifolia* (L.) Swingle "Limón" (26,67%), seguidas de *Matricaria recutita* L. "Manzanilla", *Eucalyptus globulus* Labill. "Eucalipto" y *Verbena litoralis* H.B.K. "Verbena" (20,00%). La forma de preparación más común fue la decocción, administrada por vía oral. Como resultado de esta investigación de diferentes plantas determinaron que la comunidad le da el uso terapéutico de estas especies de plantas tiene una acción farmacológica para ciertos síntomas de enfermedades como tos, fiebre, dolor de cabeza, inflamación, dolor estomacal, hipertensión. De acuerdo a la metodología TRAMIL, de las 29 especies medicinales registradas, las que presentaron niveles de uso significativo (>20%), fueron, en orden decreciente de importancia: *Sambucus* sp. "Saúco", *Micromeria brownei* "Poleo", *Citrus aurantifolia* "Limón", *Matricaria recutita* "Manzanilla".

Prieto *et al.*, (2005), señalan que para la terapia de enfermedades de seres humanos, las plantas son una materia prima para la producción biotecnológica de medicamentos, sin embargo, en medicina veterinaria y en especial en acuicultura, los objetivos del uso de las plantas son utilizarlas en su forma natural, primordialmente para abatir costos, el *Citrus aurantifolia* tiene como uso terapéutico cicatrizante, antibacteriano, antiviral y antiparasitario

En algunas comunidades es reportado para uso contra la mordedura de serpientes. También es recomendada para más de 200 enfermedades, entre las que se encuentran gripe, resfriados, dolor de cabeza, amigdalitis, náuseas, vómito, artritis, diarrea, disentería, tos, mordeduras y picaduras de animales ponzoñosos, para facilitar el parto y expulsar la placenta.

Su cultivo es similar al del naranjo, aunque resiste mejor el frío. La parte más utilizada es el fruto (pericarpio y pulpa). El pericarpio contiene un aceite esencial de composición compleja: limoneno, pineno, citral, citronelal, terpinol, canfeno, felandreno, cumarinas, flavonoides (neohesperidósidos y rutinósidos), vitamina C, carotenoides, mucílagos, oxalato cálcico; la pulpa contiene abundante pectina, azúcares, ácido cítrico, ascórbico, málico, flavonoides. El aceite esencial es antiséptico, eupéptico, carminativo y diurético, actividad reforzada por la presencia de flavonoides (citroflavonoides) que, además, ejercen una actividad vasoprotectora (reducen la permeabilidad capilar y aumentan su resistencia). La pectina tiene un efecto hemostático local, antidiarreico y protector de la mucosa gastrointestinal. Se considera además antianémico, antiemético, antipirético, analgésico, remineralizante y antiesclerótico

En uso externo es antiséptico, cicatrizante, hidratante y demulcente. Tiene indicaciones en várices, hemorroides, fragilidad capilar, flebitis, artropatías, retinopatías, hipertensión. Estados en los que se requiere un aumento de la diuresis: afecciones genitourinarias (cistitis, uretritis, ureteritis, pielonefritis, oliguria, urolitiasis), hiperazoemia, hiperuricemia, gota, hipertensión arterial, edemas, sobrepeso acompañado de retención de líquidos. Resfriados, gripe, convalescencia. Inapetencia, dispepsias hiposecretoras, meteorismo, hiperacidez gástrica, disquinesia hepatobiliar, vómitos, diarrea, oxiuriasis. Prevención del escorbuto. En uso tópico en aftas, estomatitis, anginas, blefaritis, conjuntivitis, otitis, vulvovaginitis, distrofia de la mucosa vaginal, heridas, piel seca, ictiosis, psoriasis (Delgado y Suarez 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio efecto del Extracto de *Citrus aurantifolia* sobre la toxicidad del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* del estado Falcón, es de tipo descriptivo ya que mide de forma independiente las variables. Es una Investigación transversal y experimental ya que se va someter a un objeto o grupo de individuos a determinadas condiciones o estímulos (variable independiente), para observar los efectos que se producen (variable dependiente).

Obtención del Veneno:

El veneno utilizado de *Crotalus durissus cumanensis* fue donado por el T.S.U José Yrausquin a la unidad de ofideología de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda para luego ser liofilizado y conservado a -20°C hasta el momento de su utilización.

Animales experimentales utilizados:

Para evaluar el Efecto del extracto de *Citrus aurantifolia* sobre la toxicidad del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* se usaron 80 ratones Albinos (*Cepa NMRI*) que fueron comprados en el bioterio de Universidad de los Andes (ULA), con un peso entre 21-34 gr, todos del sexo macho.

Obtención de los Sueros Antiofídico Utilizados para las pruebas de toxicidad:

Estos fueron comprados a un veterinario que los poseía para su utilización el mismo posee las siguientes características:

Solución liofilizada de Suero Antiofídico Polivalente liofilizado MASTER SUERO PLUS®, es una solución de inmunoglobulinas específicas, purificadas por digestión enzimática, concentradas y liofilizadas obtenidas del suero de equinos hiperinmunizados con veneno de serpiente de los géneros *Crotalus*, *Bothrops* y *Lanthes*.

Obtención del Extracto del *Citrus aurantifolia*

El *Citrus aurantifolia* fue obtenido en la población de Cumarebo municipio Zamora del estado Falcón, al cual se le quito la cubierta con un cuchillo para separar la piel de la pulpa, luego la piel (la concha del fruto) que se extrajo, fue licuada y tamizada para la realización del extracto total del fruto.

PRUEBAS BIOLÓGICAS:

Toxicidad *In Vivo*

1.- Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀) del veneno *Crotalus durissus cumanensis*: 50 Dosis letal

Se inoculo un pool de veneno liofilizado de *Crotalus durissus cumanensis* diluido con solución salina isotónica (S.S.I). Para determinar la dosis letal 50 a una concentración 10 mg/kg/pv a un grupo de 4 ratones cepa NMRI con un peso promedio de 32.33 gr, a una dosis de 0.1 mg/kg/pv iniciando la inoculación por vía intraperitoneal hasta llegar a la muerte consiguiendo la dosis letal post-inoculación y observado por 60 minutos donde ningún espécimen murió y se repitió el ensayo aumentando la dosis hasta producir la muerte de la mitad del grupo de ratones.

2.- Determinación de la Actividad Hemorrágica del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*:

Se evaluó por el método de (Kondo 1960), que consiste en aplicar, por vía subcutánea 10µg de veneno diluido en 0.1 ml de Solución Amortiguadora Fosfatada (S.A.F.) a tres grupos de cinco ratones albinos (Cepa MNRI) cada uno. 60 minutos después de la aplicación del veneno, se sacrificaron los animales y se midió el área hemorrágica sobre la región interna de la piel, previamente disecada y distendida, adyacente el punto de la aplicación.

PRUEBAS BIOQUIMICAS

Toxicidad *In vitro*:

a) **Determinación de la Actividad Proteolítica del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*:**

Se utilizó una solución de gelatina como sustrato a una concentración final de 10mg/ml (1%), a 1 ml de esta se le añadió 10 µl de solución salina isotónica seguidamente se incubo esta solución a 37 °C durante 30 minutos. Se midió la cantidad de proteína mediante el método de espectrometría UV a 280 nanómetros que consiste en que las proteínas muestran un fuerte grado de absorción debido a los residuos de triptófano y tirosina en las proteínas. El equipo utilizado para esta prueba es Cole Parner.

b) **Determinación de la Actividad fosfolipasa A₂:**

Determinación de la Actividad Fosfolipasa A₂ del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*:

Se manejó el método de titulación propuesto por Yang y King. Como solución tituladora se utilizó NaOH 0,01 N, previamente valorado.

Como sustrato se utilizó una emulsión de yema de huevo en 200 ml de agua destilada, añadiendo 60 µl de timerosal y 20 mM de cloruro de calcio en 100 ml de agua destilada. Para cada determinación se usó 10 ml de sustrato con cantidades ascendentes de veneno (20 µl, 40 µl, 60 µl y 80 µl) en cada determinación. Se define la unidad de actividad enzimática como la liberación de un micromol de ácido graso por minuto.

Pruebas con Extracto de Planta

Las pruebas que se realizaron en este caso con extracto de *Citrus aurantifolia* se utilizaron el método utilizado y descrito por Delgado y Suárez (2002).

1.- Prueba con Extracto de *Citrus aurantifolia*

Para la determinación del extracto de *Citrus aurantifolia*, se utilizaron 3 grupos de ratones identificados como grupo control, grupo experimental, grupo experimental 1, grupo experimental 2 y grupo experimental 3.

El grupo control se conformó con 4 subgrupos con 1 ratón cada uno identificado A0, B0, C0, D0 donde el grupo identificado A0 se le administró 0,1 ml de solución fisiológica isotónica, el B0 se le administró 0,1 ml de DL50 de *Crotalus durissus cumanensis*, C0 con suero antiofídico se le colocó 0,1 ml, D0 se le administró 0,1 de *Citrus aurantifolia* observándose por 60 minutos.

Grupo experimental 1: se subdividió en 4 ratones, donde se inoculó por vía subcutánea un contenido de 0,1 ml de veneno completo contenido de dosis letal 50 (dl50) *Crotalus durissus cumanensis*.

Grupo experimental 2: se subdividió en 4 ratones donde se le inoculó por vía subcutánea una dosis letal 50 en 0,1 ml más 0,1 suero antiofídico que se le aplicó después de 10 minutos en el mismo punto de inoculación.

Grupo experimental 3: se subdividió en 4 ratones donde se inoculó por vía subcutánea una dosis letal 50 0,1ml más 0,1 ml del extracto de *Citrus aurantifolia* que se le aplicó después de 10 minutos en el mismo punto de inoculación.

Cada una de estas mezclas se pre inoculó a 10 min a temperatura ambiente. Para las observaciones se realizaron a los 60 min post inoculación.

2.- Efecto del extracto de la planta *Citrus aurantifolia* sobre de la Actividad Hemorrágica del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*:

Para determinar este efecto se procedió a separar los ratones en un grupo de 5 animales cada uno, designado como grupo A se inoculó con 10 µg de veneno diluido en 0.1 ml de S.A.F. por vía subcutánea, 10 minutos pos inoculación se administrará igual dosis del extracto *Citrus aurantifolia* en el mismo punto de inoculación. Los animales fueron sacrificados 1 hora post-inoculación y se procederá a disecar y distender la piel para la medición del área hemorrágica.

3.- Efecto del extracto de las Planta, *Citrus aurantifolia* sobre la Actividad Proteolítica del veneno *Crotalus durissus cumanensis*.

Se utilizó una solución de gelatina como sustrato a una concentración final de 10mg/ml (1%), a 1 ml de esta se le añadió 10 µl de solución salina isotónica seguidamente se incubo esta solución a 37 °C durante 30 minutos. Se midió la cantidad de proteína mediante el Método de espectrometría UV a 280 nanómetros que consiste en que las proteínas muestran un fuerte grado de absorción debido a los residuos de triptófano y tirosina en las proteínas. El equipo utilizado para esta prueba es Cole Parner.

4.- Efecto del extracto de *Citrus aurantifolia* sobre la Actividad Fosfolipasa A₂ del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*:

Se empleó el método de titulación propuesto por (Yang y King 1977). Como solución tituladora se utilizó NaOH 0,01 N, previamente valorado. Como sustrato se utilizó una emulsión de yema de huevo en 200 ml de agua destilada, añadiendo 60 µl de timerosal y 20 mM de cloruro de calcio en 100 ml de agua destilada. Para cada determinación se usó 10 ml de sustrato con cantidades ascendentes de veneno (20 µl, 40 µl, 60 µl y 80 µl) e igual cantidad de el extracto en la determinación. Se define la unidad de actividad enzimática como la liberación de un micromol de ácido graso por minuto.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para Comparar estadísticamente las variaciones observadas se realizó un análisis de comparación de las medias grupales, de los parámetros evaluados, utilizando los programas estadísticos Infostat y SPSS versión 17. Con el fin de determinar si existen o no diferencias significativas entre los 2 tratamientos (extracto de *citrus aurantifolia* se hizo una comparación de medias y suero antiofídico polivalente) utilizando la prueba no paramétrica **Prueba de Friedman**

Según Harris (2007) El test t se utiliza para comparar dos conjuntos de medidas y decidir si son o no diferentes.

Las Variables Independientes (Factores) que fueron probados son:

Tratamiento 1: Dosis letal 50 + (Citrus aurantifolia)

Tratamiento 2: Dosis letal 50 + Suero Antiofídico Polivalente

Las Variables Dependientes a medir son:

- % de Supervivencia
- % Actividad Proteolítica
- % Actividad Fosfolipasa

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3. Correlación de la Prueba in vitro de la actividad fosfolipasa A2 del veneno liofilizado de *Crotalus durissus cumanensiss* con la actividad hemorrágica, actividad proteolítica, inhibición de proteasas e inhibición de actividad hemorrágica bajo el efecto de los diferentes tratamientos.

	T0	T1	T2	T3
Km (mg/ml)	-	1,43	-1,275	-2,5
Vmax (mg/ml/min)	-	2x10 ⁻⁸	42,173	35,932
Área hemorrágica (cm ²)	0	7,75	8,31	4,92
Proteolisis (%)	0	8,1	8	33,3
% inhibición de proteasas	0	91,9	92	66,7
% Inhibición de hemorragia	0	0	0	42,85

T0: Solución fisiológica isotónica; T1: Veneno; T2: Veneno+Suero antiofídico; T3: Veneno+Citrus aurantifolia.

En la tabla 3, se observa una actividad hemorrágica de 7,75 cm² para el veneno *Crotalus durissus cumanensiss* siendo el 100%. En el tratamiento 2, se observa un valor mayor de 8,31 cm² mayor al del veneno solo, lo que demuestra que existe un sinergismo entre el suero antiofídico y las enzimas presentes en el veneno. Para el tratamiento 3, se encontró una disminución del área hemorrágica a 4,92 cm² representando un 42,85 de inhibición de la actividad hemorrágica correlacionándose con la prueba *in vitro* teniendo un valor de Km de -2,5 representando una afinidad de 6 veces por encima de la afinidad de los valores que muestra los valores de km del veneno con el sustrato y 2 veces por encima de la afinidad que tiene la mezcla del veneno con suero antiofídico.

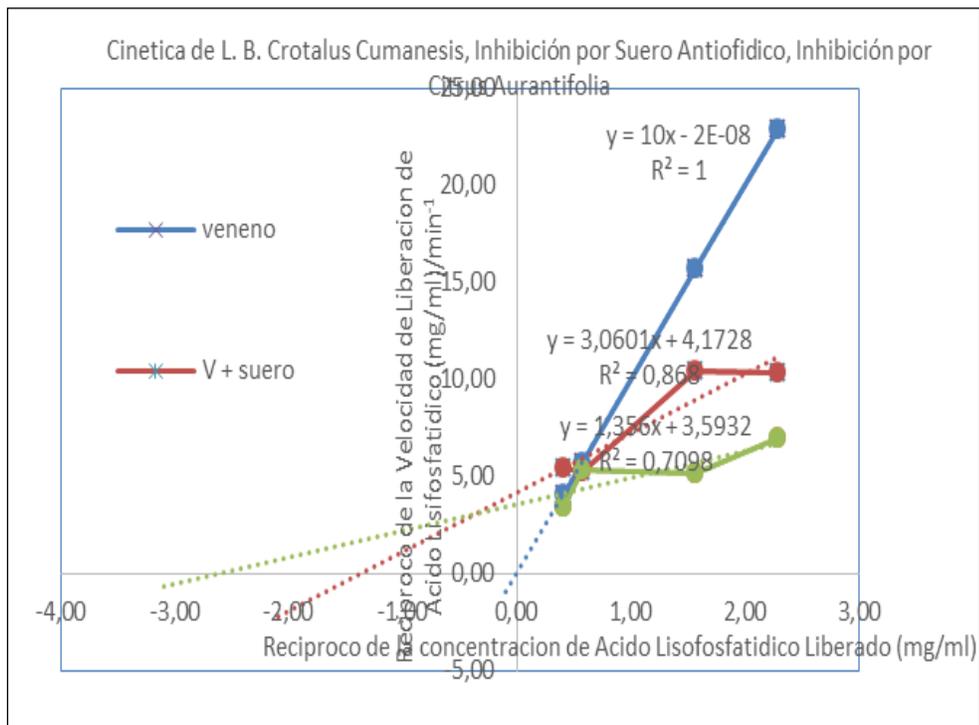


Figura 1. Correlación de la Prueba in vitro

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE VENENO LETAL 50 (DL₅₀)

Para determinar la dosis letal 50 la unidad experimental consistió en grupos de 4 ratones, y se inocularon 13 unidades experimentales con diferentes concentraciones contenida en 100 μ L de volumen de inoculación, en la que se determinó que la dosis de concentración 17 μ g/ μ L reporto una mortalidad de 2 especímenes de la cepa NMRI con peso promedio (21-34 gr), llevándonos a considerar esta como dosis letal 50 (DL₅₀) como se representa en la tabla 4., Para 60 minutos post inoculación.

Tabla 4. Determinación de la Concentración de Veneno Letal 50 (DL50)

Dosis (mg/ml)	Sobrevivencia	Estadístico Friedman	Muerte	Estadístico Friedman	% sobrevivencia
1	4	B	0	A	100
2	4	B	0	A	100
3	4	B	0	A	100
5	4	B	0	A	100
10	4	B	0	A	100
11	4	B	0	A	100
12	4	B	0	A	100
13	4	B	0	A	100
16	4	B	0	A	100
17	2	A	2	A	50
18	0	A	4	B	0
19	0	A	4	B	0
20	0	A	4	B	0

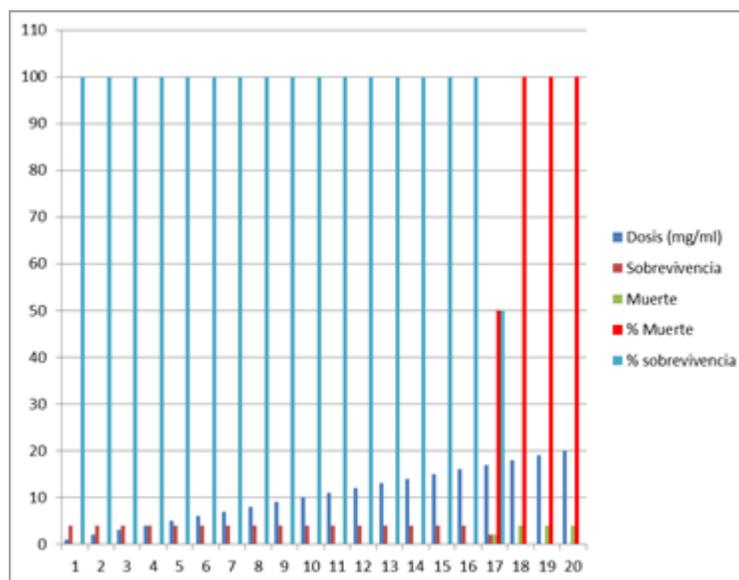


Figura 2. Determinación de la Concentración de Veneno Letal 50 (DL50)

El veneno crotalico presenta un conjunto de péptidos y proteínas tóxicas que presentan actividad hemorrágica coagulante, nefrotóxica y miotóxica que resultan altamente tóxicos al momento de ser inoculados a las víctimas. (Levano et al., 2004; Pérez et al., 2008)

Esta investigación obtuvo como resultado en la determinación de dosis letal 50 guiado por el método descrito por Pereira (1993). Causando la muerte del 50% de los ratones inoculados con una dosis de 17 mg/Kg/ P.V. de veneno observado por 60 min, estos resultados coinciden con los obtenidos por Fuenmayor, y Salazar (2009). Que determinaron Dosis letal 50 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus durissus vegrandis* (Serpentes, Viperidae) en los modelos murinos NMRI y BALB/c con una dosis 15,85 mg/Kg/P.V. y de la *Crotalus durissus vegrandis* para la *Crotalus durissus cumanensis* fue de 19,95 mg/Kg P.V. observado por 60 min.

Para los resultados efecto del extracto crudo de *Citrus aurantifolia* sobre la letalidad del veneno crotalico se obtuvo una inhibición de 91,6 % para una supervivencia del 100% post-inoculación de 60 min al igual que el trabajo realizado por Vitelbina Núñez et al., (2007) que demostraron la capacidad neutralizante de los extractos etanólicos de dichas plantas contra el efecto letal de los venenos de *Lachesis muta*, *Crotalus durissus cumanensis* y *Micrurus mipartitus* registrando un porcentaje de supervivencia durante 48-72 horas. Todos los extractos neutralizaron 100% el efecto letal del veneno de *L. muta*, pero solo 7 de ellos (la excepción es *C. limon*) neutralizaron el efecto letal de los venenos de *C. d. cumanensis* y *M. mipartitus*. *Brownea rosademonte* mostró la mayor capacidad neutralizante frente a todos los venenos así Carvallo (1999) estudió el efecto del extracto *Mikania f. hastata* de esta planta sobre las lesiones histopatológicas inducidas por veneno crotalico en riñón de ratón, obteniendo una inhibición de la hemorragia, también se puede decir que los resultados reportados por Delgado et al. (2002) reportan supervivencia de un 100% en ratones inoculados con DL100 de *Bothrops colombiensis* utilizando extracto acuoso de la planta *Mikania f. hastata*, supervivencia del 60% y 80% con extractos acuoso de las plantas *Persea americana* y *Citrus limón* respectivamente.

Para los resultados obtenidos en la actividad proteolítica del veneno de *Crotalus durissus colombiensis* fue inhibida en un % con el extracto total de *Citrus aurantifolia*, en contraste con un % de inhibición por el suero antiofídico, de acuerdo con Agüero (1999) la actividad proteolítica del veneno crotálico fue inhibida en un 97% con el extracto total de *Mikania f. hastata*, en contraste con un 14% de inhibición alcanzado con el suero antiofídico. La inhibición de tal actividad implica la interrupción de la cascada del sistema de complemento activado por proteasas del veneno crotálico. Por otra parte Pereañez et al., (2008) evaluaron la capacidad inhibitoria de tres especies de plantas de la familia *heliconiaceae* mostrando como resultado efectos proteolítica, coagulantes y hemolíticos inducido por el veneno *Bothrops asper* manifestando un porcentaje de inhibición del efecto hemolítico indirecto e inhibición del efecto proteolítico en dos especies de plantas resultados similares obtuvieron Peres y Morles (2013) con una actividad proteolítica del veneno de *Bothrops colombiensis* fue inhibida en un 69,63% con el extracto total de *Petiveria alliacea*, en contraste con un 56,30% de inhibición por el suero antiofídico.

Las actividad fosfolipasa A₂ del veneno *Crotalus durissus cumanensis* fue inhibida en un % con el extracto total de *Citrus aurantifolia* en contraste con un % de inhibición por el suero antiofídico que estos hallazgos son similares a los encontrados por Agüero et al (1999), donde demostraron que en el extracto total de *Mikania f. hastata*, están presentes compuestos que inhiben la actividad fosfolipasa A₂ en un 80%. Además cita que utilizando los extractos de *Ciacocca alba* sobre la actividad hemolítica indirecta, fosfolipásica, se observó un 80% de inhibición de la hemólisis indirecta producida por 10 µg de veneno crotálico sobre glóbulos rojos humanos y un 60% de inhibición de la actividad fosfolipásica. Los resultados de Pereañez et al., (2008) con el extracto de frutos maduros de *Citrus limon* mostró resultados promisorios como agente neutralizante de algunos efectos del veneno de *B. atrox* (7, 8), el extracto etanólico de las semillas de *C. sinensis* no dio resultados muy prometedores en la inhibición de efectos de los venenos de *B. asper* y *P. nasutum*, posiblemente por las diferencias que existen en la droga utilizada y por el hecho de que aunque dichas plantas pertenecen al mismo género y familia, son especies diferentes el estudio realizado por Ruppelt (1991)

demostró la inhibición de la actividad fosfolipasa A₂ de serpientes de varios géneros, por los extractos de las plantas *Apuleia leiocarpa*, *Casearia sylvestris*, *Brunfelsia uniflora*, *Chiococca brachiata*, *Cynara scolymus*, *Dorstenia brasiliensis*, *Elephantopus scaber*, *Marcipianthes chamadrys*, *Mikania glomerata* y *Trianosperma tayuya*.

Con respecto a otros estudios realizado como el Rico (2010), que los resultados obtenidos en las diferentes pruebas en presencia y ausencia de Antimoniaco Meglumine , a través de la pruebas de T (t de student). Las actividad proteolítica y fosfolipasa A₂ de los venenos de Bothrops y Crotalus fueron incrementadas con el Antimonio Meglumine, sin embargo hubo una disminución eventos secundarios al accidentes ofídicos que conlleven a una disminución de los efectos edemáticos e inflamatorios del veneno crotálico y en consecuencia limita la aparición y fosfolipasa presente en el veneno bothtropico de allí la importancia para la aplicación de compuesto alternativos en la terapia de los accidentes ofídicos al igual que Jara et al., (2004) en el Método para la determinación de la actividad terapéutica de compuestos inhibidores de metaloproteinasas, compuestos inhibidores nuevos y el uso terapéutico de los mismos afirman que los venenos de serpiente, son mezclas complejas que contienen una amplia variedad de enzimas proteolíticas cuya función es digerir la presa o alterar sus funciones fisiológicas, especialmente por lo que respecta al sistema circulatorio. Son alternativas similares que tienen un efecto inhibitorio sobre el veneno crotalico como nuestro trabajo.

La tabla 5 permite observar el área hemorrágica (expresada en cm²) de los diferentes grupos de ratones inoculados con 17 mg de veneno Crotalico por vía subcutánea. En ellas se aprecia que los animales que recibieron unicamente veneno Crotalico, el área hemorrágica tuvo un promedio de 7,5 cm², lo que indica que dicha actividad hemorrágica fue del 42,85 Por su parte, los animales que recibieron veneno con Suero antiofídico fue de 8,31, cm² en comparacion a los que fueron inoculados con el extracto de *Citrus aurantifolia* que obtuvieron un área hemorrágica de 4,92 cm².

Tabla 5. área hemorrágica (expresada en cm 2) de los diferentes grupos de ratones inoculados con 17 mg de veneno Crotalico por vía subcutánea.

Tratamientos	A.H (cm)	% Hemorragia	% Inhibición
T0	0	0	0
T1	7,75		0
T2	8,31		0
T3	4,92		42,85

T0: Solucion fisiologica isotónica

T1: Veneno

T2: Veneno + Suero antiofídico

T3: Veneno + Citrus aurantifolia

CONCLUSIONES

- Se determinó que la Dosis Letal 50 (DL50) del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, donde la concentración de ubicó en $17\mu\text{g}$ ($0,17\text{mg/kg P.V.}$ de veneno).
- En el extracto del *Citrus aurantifolia* se pudo encontrar componentes que son capaces de inhibir la letalidad del veneno Crotalico en un 100% a los 60 minutos luego de la inoculación.
- Gracias a este estudio se puede deducir que el extracto *Citrus aurantifolia* es una alternativa de relativa efectividad para el tratamiento del veneno Crotalico

RECOMENDACIONES

- Continuar con los trabajos de investigación con la misma especie de limón que estimen su efecto inhibitorio sobre la toxicidad del veneno de otras especies
- Seguir en la búsqueda de tratamientos alternativos con plantas que puedan servir como terapias de antivenenos al momento del emponzoñamiento crotalico o de otra especie
- Motivar para que se sigan realizando este tipo de investigaciones, a objeto de darle las herramientas necesarias a los productores para preveer y solventar algunos problemas a nivel de fincas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agüero, N.; González, J. (1999). Efectos del extracto total de la planta *Mikania f. hastata* (guaco) sobre la letalidad y toxicidad del veneno crotálico. Trabajo especial de grado para optar al título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro.
2. Araujo, Y. y Valdespino A. (2006). Alteraciones enzimáticas e Histológicas en ratas (*Rattus norvegicus*) inoculadas con veneno de serpiente *Brotrops venezuelensis*. Trabajo presentado para optar al título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Falcón, Venezuela
3. Brandy, N. (2009) garantizada totalmente producción de antivenina en venezuela disponible en: http://serpientesdevenezuela.blogspot.com/2009_08_30archive.html
4. Boloño. R 1984. Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica. Universidad de Costa Rica, San José (84):17.
5. Burm, L.; Ojeda; G; Morales; V; Gonzales, N, Cabrera S, Ysulbaran, (1998) composition of Venezuela essential all citrus limon (L) Burmf Rev. FAC.AGRO(LUZ) 15:363: - 349
6. Boquet, P. (1992) "History of Snake Venom Research", Chapter 1, pp.3-14 en Lee Chen- Yuan "Snake Venoms", Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 52, Editorial Board G.V.R Born, Cambridge A.;Farah, Rensselear, NY H.; Herken, Berlin; A. D. Welch, Memphis, TN.1992. Disponible en <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/Ofidiologia/ArchivosHTML/ofidiologia.pdf>

7. Balladelli, M (2009). Manual para la identificación, prevención y tratamiento de mordeduras de serpientes venenosas en Centro América Organización Panamericana de la Salud –OPS Organización Mundial de la Salud –OMS Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social –MSPAS Museo de Historia Natural USAC Volumen I: Guatemala

8. Carrillo, R; y Moreno, G. (2007) Importancia de las plantas medicinales en el autocuidado de la salud en tres caseríos de Santa Ana Trujillo, Venezuela disponible en: <https://www.google.co.ve/http%3Awww.buenastareas>.

9. Carvallo, E.; Civada, M. (1999). “Efecto del extracto total de *mikania f. hastata* sobre las lesiones histopatológicas inducidas por veneno crotálico en riñón de ratón”. Trabajo espacial de grado para optar al título de médico veterinario. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro.

10. Castro O., Gutiérrez J., Barrios M., Castro I., Romero M., Umaña E., (1999. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno *Bothrops asper* (Serpientes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. Revista Biologica Tropical. 47 (3): 605-16.

11. Castillon, D; Acosta, J; Hernández, E; Alonso, L. (2007). Envenenamiento ofídico salud uninorte. Barranquilla. Colombia. Pp.96.

12. Chirino, S. y Wetstruck, S (2000) .Efecto del veneno de cascabel (*crotalus terrifucus cumanenssis*) captuirado en el estado Falcón sobre musculatura cardiaca de ratas albinas

13. Chippaux. J. y Goyffon M. (1988). Venoms, Antivenoms and Immunotherapy. Toxicon 36(6): 823-846.

14. Chippaux J.P. (1988). Snake –bites: Appraisal of the global situation. Bull. World Hlth. Org 76:515:524.
15. Dávila. Blanco Navarrete, L. F., J. C López Johnston y a. (s/f) 2009. Guía de las serpientes de Venezuela biología, venenos, conservación y checklist. Gráficas lauki. 75 pp. Disponible en http://www.serpientesdevenezuela.net/sdv_espanol/index.html
16. Delgado B., M, Suárez r., D 2002 Efecto de los extractos de *mikania f. hastata*, *persea americana* y *citrus limon* sobre la toxicidad inducida por el veneno de *bothrops colombiensis*. Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de médico cirujano.
17. Del Carmen R., López J., Hernández J., 2006. Caracterización Toxicológica del Veneno Total de la Serpiente de Cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae), presente en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. Revista Científica. Maracaibo, Venezuela. 16 (3).
18. Fran H., Cardoso S .1995 Clinical toxicology of snakes “Bites in south america in meie J, White j (Eds) Handboor of toxicology of animal venom and poisons, crc press boca rato fl pp 667.688
19. Gamarral. L., Sakanaka, E., Tambourg, F., Cabral, A. 2006. Influence on the quality of essential lemon (*Citrus aurantifolia*) oil by distillation process Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-6632200600010&script=sci_arttext
20. García, G., y García, A. 2009 Fosfolipasa A₂ Grandes familias y mecanismo de acción medicina y cirugía Bogotá Colombia 18(14):199:209.
21. Gutiérrez, J. y Rucavado, A. 2000. Snake venom metalloproteinases: .Thier role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie 82: 841-850.

22. Gutiérrez, J. 1995 Clinical toxicology of snakebites in central America insmeier s white (EDS) Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons crc florida pp 645 -665
23. Gutiérrez, J., Rojas, G. Aymerich, R. 2005; El envenenamiento por mordedura de serpientes en centroamerica universidad de costa rica facultad de microbiología instituto de Clodomiro picado pp26
24. Guillen, A. 2011. Producción y evaluación de anti veneno hiperinmune monovalente antiofídico en gallina ponedoras; trabajo presentado para optar al título de Médico Veterinario de Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda Estado Falcón Venezuela.
25. Hernández, F.; López, J.; Fernández, I.; Rodríguez, S. 2005; Alteraciones ultra estructurales de tejido cardiaco tratado con veneno crudo de serpientes cascabel *Crotalus Durissus Cumanensis* (28-1)
26. Irausquín, J.; Bremo, A. 2000. Casuística del accidente ofídico en el estado falcón, venezuela; avances en terapia alternativa. v congreso nacional de ciencias veterinarias. área ciencias del agro y mar, programa de ciencias veterinarias, universidad nacional experimental francisco de miranda.
27. Jara I, Politi, V; Gavuzzo, E; Gallina, C; Di Stazio, G; D'Alessio, S; Sella, A; Piazza, C; Giordano, C; Gorini, B; Panini, G; Paglialunga P, Cirilli, M; Pochetti, G y Mazza, F. 2004. Inhibidores de metaloproteasa, su empleo terapéutico y procedimiento para la producción del compuesto de partida de su síntesis: disponible en: http://www.espatentes.com/pdf/2206955_t3.pdf
28. Preañez n1 A. Jaime, Arley C. Patiño, Gelmy Ciro, Leidy j. Vargas, Julieta Vásquez, Andrea Salazar, Jessica P. Rey, Vitae, (2009) búsqueda de alternativas terapéuticas para el accidente ofídico en residuos agroindustriales de frutas tropicales; revista de la facultad de química farmacéutica issn 0121-

4004, issne 2145-2660. Volumen 16 número 3, año 2009. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 378-387. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n3/v16n3a12.pdf>

29. Kini M., Evans, H 1990. Effects of snake venom proteins on Blood platelet. *Toxicon*, 28(12): 1387- 1422
30. Kondo, H.; Kondo, S.; Ikasawa, H.; Murata, R. y Osaka, A. 1960. "Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom". *Jpn J Med Sci Biol* 13: 43-51.
31. Lancini A. 1986. Serpientes de Venezuela; Segunda Edición. Editor Ernesto Arimitano. Pp 10-21
32. Lemus, Luis. 2014. Catálogo de nombres científicos, nombres vulgares y algunos usos medicinales de las plantas del Estado Falcón: 1era parte: Dicotiledoneas (Magnoliophytas). Trabajo especial de ascenso, UNEFM. 560pp.
33. Levano J.; Fernandez R. 2004. Diagnóstico y Tratamiento de los Accidentes por Animales Ponzosñosos Accidentes ofídico. Centro Nacional de Productos Biológicos; Instituto Nacional de Salud (INS). Lima, Peru. Pp. 78.
34. López, J. y Rodríguez, A. Metaloproteasas – desintegrinas en el campo de la ofidiología. Disponible en <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/vitaediecisiete/articulos/ofidiologia/pdf/ofidiologia.pdf>
35. López, J. (2000). Consideraciones sobre los venenos de las serpientes, ms. 78-92 http://www.serpientesdevenezuela.net/sdv_espanol/index.html.
36. López, J. (2011) Los venenos de las serpientes en Venezuela, la Revista Río Verde de Exploración, Geografía, Naturaleza y Turismo Alternativo de

Venezuela disponible en <http://revistarioverde.blogspot.com/2011/04/los-venenos-de-las-serpientes-en.html>

37. Nuñez V; Patiño R 1999 Resistencia natural a los venenos de serpiente MEDNAB programa de ofidismo, facultad de medicina, universidad de Antioquia, Medellín Colombia 2(5).
38. Moreira I., Borkowg., Ovidiam., Gutierrez J.M 1994 Pathological changes induce by bah1 a hemorrhagic metalloproteianase isolated from *bothrops asper* (terciopelo) snake venom on mouse capillary blood vessels toxicology 32:977:987.
39. McLane M., Marcinkiewicz C., Vijay-Kumar S., Wierzbick-Patynowski I., Niewirowski S. 1998. Viper Venoms Disintegrins and Related Molecules. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 219(2): 109-119.
40. Molina J 2012 quimioterapia: limonada sin azúcar + bicarbonato.*tomar limonada como agua, todos los días y mejor si le agrega una cucharillita de bicarbonato; disponibles en <http://lamatrixholografica.wordpress.com/2012/07/09/el-zumo-de-limon-es-10-000-veces-mas-efectivo-contra-el-cancer-que-la-quimioterapia-por-que-no-sabemos-esto/>
41. Navarrete L 2003 Taxonomía e historia de las serpientes de Venezuela .mineo. Jornada de actualización manejo básico de accidentes con animales venenosos en Venezuela instituto de medicina tropical, UCV Caracas Venezuela disponible en [http //serpientesdevenezuela,ve/archivo.html](http://serpientesdevenezuela,ve/archivo.html) historia natural.htm 4-8 p
42. Navarrete L, López J, Blanco A., 2009. Guía de las serpientes de Venezuela. Biología, venenos, conservación y listado de especies. Listado de las Serpientes de Venezuela. Pág. 66.

43. Núñez V, Otero R, Fonnergra R, Barona J, Jimenez S, Osorio R.. 1999 .Capacidad neutralizante de ocho plantas usadas por los curanderos en Antioquia y Chocó (Colombia) frente al efecto letal de los venenos de *Lachesis muta*, *Crotalus durissus cumanensis* y *Micrurus mipartitus*. Programa de ofidismo escorpionismo universidad de Antioquia.
44. Facultad de química farmacéutica Universidad de Antioquia. Disponible en: <http://www.botanica-alb.org/Publicaciones/Otros/9Etnobot.pdf>
45. Newsholme, E. 1987 Bioquímica medicina interamericana MC Granw –Hill, Madrid España 3er edición 9-37.
46. Omoira, Paul Otto Huber 2008 Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela, editorial fundación botánico de Venezuela DR Tobia lasser caracas Venezuela pág. 598.
47. Okumura K., Inoue S., Ikeda K., Hayashi K. 2002 Identificación of b-type Phospholipase A₂ Inhibitor in a Nonvenomous Snake, *Elaphe quadrivirgata*. Arch Biochem Biophys. 408: 124-130.
48. Ohno M., Chijiwa T., Oda-Ueda N., Ogawa T. y Hattori S. 2003. Molecular Evolution of Myotoxic Phospholipases A₂ from Snake Venom. Toxicom 42(8):841-854
49. O.M.S. 1971 Comité de Expertos de la O.M.S en Patrones Biológicos. Normas para los sueros antiponzoñosos (Mordeduras de Serpientes) O.M.S Ginebra.
50. Otero P., R.; Fonnergra G., R. y Jiménez R., S. 2000 Plantas utilizadas contra mordeduras de serpientes en Antioquia y Chocó, Colombia. (Primera Edición). Medellín. Universidad de Antioquia.

51. Otero, R.; Nuñez, V.; Barona, J.; Díaz, A. y Saldarriaga, M. 2002,. "Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó". *Iatreia* 15 (1): 5-15.
52. Pereira, N.; Ruppelt, B.; Do Nascimento, M.; Paz, J. y Mors, W. 1993. "Pharmacological screening of plant recommended by folk medicine as snake venom antidote; IV protection against Jararaca venom by isolated constituents". *Plant Med* 60.
53. Pérez N. Rojas. Ruiz V, Cerezo E 2008. Estudio veneno de serpientes : tipo y tratamientos; departamento de toxicología y farmacia , facultad de veterinaria complutense de Madrid 2(2) : 100-104
54. Pérez Abigail y Morles Elinel 2013. efecto del extracto total de la planta anamú (*petiveria allaces*) sobre la letalidad y toxicidad del venenode *bothrops colombiensis*. ; trabajo presentado para optar al título de médico veterinario Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda Estado Falcón, Venezuela.
55. Preañez J. Jiménez S., Quintana J Núñez V., Fernández M., Restrepo Y. 2008. Inhibición de las actividades proteolítica, Coagulante y hemolítica Indirecta inducida por el veneno *Bothrops asper* por extractos etanolitos de tres especie de Heliconias. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 15(1):157-164.
56. Prieto, A; Ocampo, A; Fernández, A; y Pérez, M. 2005. El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y

potencialidades de uso en cuba y méxico disponible en :
<http://www.redalyc.org/pdf/432/43200805.pdf>

57. Ramírez M; 2006 .Intoxicaciones agudas en adultos aspecto básico para el diagnóstico y tratamiento universidad centro occidental Lisandro Alvarado sección de farmacología Barquisimeto Venezuela.
58. Rico A. 2010. Efectividad del Antimonio de Meglumine en la inhibición de la Toxicidad del Veneno de Serpiente de los Géneros Bhotrops y Crotalus. Trabajo presentado para optar al Título de Médico Veterinario .Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda Falcón, Venezuela.
59. Rodríguez A., Rengifo C 2005. Serpientes, Veneno y Tratamiento Médico en Venezuela. Fondo Editorial de la Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. 8-24.
60. Rodríguez, A; 2010. Serpientes Venenosas de Venezuela. Disponible en: <http://serpientesdevenezuela.blogspot.com/2010/04/las-serpientes-venenosas-en-venezuela.html>
61. Ruiz, A. 1.999 .Productores de antiveneno de las Américas. Boletín informativo sobre los sueros antiponzoñosos (Mordeduras de serpientes), de la Organización de Estados Americanos (O.E.A) O.E.A Editions, U.S.A
62. Russell, F. E., 1983. Snake Venom Poisoning, Scholium International, Great Neck, New York <http://ceih.org/Archives/Ofidismo.html>
63. Ruppelt, B.; Pereira, E.; Goncalves, L.; Pereira, N.; (1991). Pharmacological screening of plants recommended by Folk medicine as antsnake venom. 1. Analgesic and Antiinflammatory Activities. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.** 86(2):203-205.

64. Silva, J. 1989. Las serpientes de genero Bthrops en la Amazonia Colombiana A.C. Med colombo. 148 -165. Disponible <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo//03-1989-04.pdf>
65. Sáez, J. y Soto A 2009 .Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra picaduras de serpientes venenosas Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/listaarticulos?&revistaDe>
66. Sadner–Montilla, F. (1994). Serpientes Venezolanas. Instituto venezolano de Ofidiología. Caracas, Venezuela.
67. Tietz, 1994 N.W. (Ed).1994. Fundamentals of Clinical Chemistry, 2nd ed., W.B. Saunders CO. Philadelphia. Pp. 653-654.
68. Tizard I.1995. Inmunología Veterinaria. Interamericana Mc Graw- Hill. Mexico
69. Yang, C.; King, K. 1977. “Chemical modification of the histidine residue in phospholipase A₂ from *Hemachatus haemachatus* snake venom”. Toxicon. 18:529-547.
70. Yoshida E, Navarrete L Rodriguez A 2003 On the hemorrhagic and necrotic activities cuased by the rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) in a Venezuela.
71. Yrausquín, J.; Bremo, A. 2008. Casuística del accidente ofídico en el estado falcón, Venezuela; avances en terapia alternativa. V Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Área Ciencias del Agro y Mar, Programa de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda.
72. Zug y Carl, 1999. Disponible en: www.serpientesvenezuela.net/sdv_espanol.