UEA Biología
PrePrint UEA

Sección Biología
Vol. BIO2324. ep02–12

| Recibido: 13/03/2024 |
| Aceptado: 15/04/2024 |
| Publicado: 04/11/2026 |

Evaluación *in vitro* de la capacidad antihemolítica de extractos de *Columnea villosissima* Mansf. respecto al veneno de *Bothrocophias microphthalmus*

In vitro evaluation of the antihemolytic capacity *of Columnea villosissima* Mansf. extracts against *Bothrocophias microphthalmus* venom

Jeshua Mateo Viera Almache[1], Kayla Stephanie Cambizaca Pozo[1] Luis Ramón Bravo Sánchez[1]

https://doi.org/10.59410/PREPRINT-UEA-vBIO2324ep02-12 Crossref

Resumen

Para obtener información acerca de los metabolitos secundarios que pudieran contribuir a la actividad antiofídica atribuida a *Columnea villosissima* se realizó el tamizaje fitoquímico de dicha planta. Posteriormente, se llevaron a cabo dos experimentos de actividad antihemolítica, el primero consistió en la observación comparativa de la hemólisis al microscopio óptico y el segundo fue un bioensayo de hemólisis mediante espectrofotometría. Como resultados fundamentales se puede destacar que los metabolitos secundarios a los que se les pudiera atribuir la actividad antihemolítica, se extrajeron en mayor medida en las hojas secas de *Columnea villosissima*, como flavonoides y otros compuestos fenólicos, además de otros metabolitos como los alcaloides y triterpenos, que se repiten en otras plantas utilizadas como antiofídicas; estos compuestos junto a los alcaloides detectados, al poseer actividad analgésica, antiinflamatoria y antimicrobiana, podrían estar vinculadas a los efectos antihemolíticos y a la actividad antiofídica en general. Se demostró que *Columnea villosissima* posee actividad antiofídica, dado que el principal efecto del veneno de *B. microphthalmus* es la hemólisis; en los bioensayos realizados la sangre mostró estabilidad en sus glóbulos rojos ante el veneno durante un determinado lapso luego de aplicar los extractos de la planta, el etanólico más que el acuoso, acercándose en parte al comportamiento obtenido con el antiofídico comercial utilizado durante los tiempos evaluados, es así que se infiere que las hojas de *Columnea villosissima* presentan capacidad antihemolítica.

Palabras clave

antiofídico, compuestos fenólicos, inhibición, eritrocitos

Abstract

To obtain information about the secondary metabolites that could contribute to the antivenom activity attributed to *Columnea villosissima*, phytochemical screening of said plant was carried out. Two antihemolytic activity experiments were carried out, the first consisted of the comparative observation of hemolysis under optical microscopy and the second was a bioassay of hemolysis using spectrophotometry. It can be highlighted that the secondary metabolites to which the antihemolytic activity could be attributed were extracted to a greater extent in the dry leaves of *Columnea villosissima*, such as flavonoids and other phenolic compounds, in addition to other metabolites such as alkaloids and triterpenes, which are repeated in other plants used as antivenom; these compounds, together with the alkaloids detected, having analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial activity, could be linked to the antihemolytic effects and antivenom activity in general. It was demonstrated that *Columnea villosissima* has antivenom activity, given that the main effect of *B. microphthalmus* venom is hemolysis. In the bioassays carried out, the blood showed stability in its red blood cells against the poison for a certain period of time after applying the plant extracts, the ethanolic one more than the aqueous one, approaching in part the behavior obtained with the commercial antivenom used during the evaluated times. It is thus inferred that the leaves of *Columnea villosissima* have antihemolytic capacity.

Keywords

antivenom, phenolic compounds, inhibition, erythrocytes

Direcciones

[1]Universidad Estatal Amazónica. Pastaza, Ecuador. Email: jm.vieraa@uea.edu.ec, ks.cambizacap@uea.edu.ec, lbravo@uea.edu.ec

Autor para la correspondencia

Jeshua Mateo Viera Almache. Universidad Estatal Amazónica. Pastaza, Ecuador. Email: jm.vieraa@uea.edu.ec

Cómo citar

VIERA ALMACHE, Jeshua Mateo, CAMBIZACA POZO, Kayla Stephanie and BRAVO SÁNCHEZ, Luis Ramón 2026. **Evaluación *in vitro* de la capacidad antihemolítica de extractos de *Columnea villosissima* Mansf. respecto al veneno de *Bothrocophias microphthalmus*** . PrePrint UEA. Vol. BIO2324. p. ep02–12. https://doi.org/10.59410/PREPRINT-UEA-vBIO2324ep02-12

Editores Académicos Elizabeth Del Carmen Ramírez Iglesias

Editorial Editorial de la Universidad Estatal Amazónica 2026

Copyright

Derechos de autor 2026 | PrePrint UEA.
Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución 4.0.
Los autores del artículo autorizan a la RACYT a que este artículo sea compartido bajo las condiciones de la Licencia Creative Commons 4.0 (CC-BY 4.0).

1. Introducción

En Ecuador, el conocimiento tradicional se ha ido transmitiendo a través de las generaciones, el papel de las plantas y su uso han evolucionado [1]. En este contexto, la vasta diversidad de flora en Ecuador, ha sido destacada por ser rica en cuanto a sus plantas útiles [2]. Existen 5172 especies útiles en Ecuador, de las cuales, el 30 % son comestibles, el 60 % son medicinales, el 20 % son de uso social (ritos religiosos o similares) y el 55 % es utilizado para la construcción [2].

La variedad de funciones en el reino vegetal se debe a diversas rutas bioquímicas y sustancias, un grupo en particular ha captado el interés moderno por sus características y propiedades únicas en las plantas [3]. Estos compuestos reciben el nombre de metabolitos secundarios; son sustancias fabricadas por las plantas que le proporcionan mayor competitividad en el entorno, actuando como antimicrobianos, repelentes, atrayentes y proporcionan diferentes cualidades de tipo medicinal [4]. Estos componentes se clasifican en diferentes grupos, entre los que se encuentran los compuestos

aromáticos, alcaloides, glucósidos, flavonoides y terpenoides [3].

Bajo esta perspectiva, una de las utilidades que poseen estos compuestos y que ha generado interés en la sociedad, es que algunos metabolitos secundarios, separados de las plantas, mitigan los efectos y la nocividad derivada del veneno de serpiente [5, 6, 7]. En este contexto, López y Pérez [5], indican que un grupo con estas características son los polifenoles, donde genéricamente, ciertos isoflavonoides resultan efectivos respecto a las toxinas de los crotálidos [5]. El edunol, las cabenegrinas presentes en ciertas leguminosas, o la wedolactona que se aísla de *Eclicpta prostrata*, son isoflavonoides activos en serpientes como la *Bothrops atrox* y *Crotalus durissus* [5]. Otro grupo de compuestos con actividad antivenómica son los ácidos fenólicos, grupos de reputación antivenómica de los cuales deriva el ácido cinámico, el hidroxibenzoico y el clorogénico [5]. Algunos taninos poseen efectos activos y detoxificantes para algunas serpientes de mar. Esta propiedad se debe a su capacidad de formar complejos con las proteínas de los venenos ofídicos [5].

Los alcaloides, como el ácido aristolóquico presente en las raíces de algunas especies del género *Aristolochia,* o el schumaniofósido de cortezas de *Schumanniophyton magnificum,* son efectivas en venenos de serpientes como la cobra africana (*Naja melanoleuca*) [5]. Otros alcaloides como la atropina, presentes en algunas solanáceas, resultan efectivos en elápidos como la mamba negra y verde [5]. A su vez, otros metabolitos con características antivenómicas son los triterpenoides esteroídicos, como el estigmasterol, derivados del ácido gimnémico o el sitosterol, y los muchos otros triterpenos pentacíclicos como el ácido betulínico, quinóvico, echinocístico y ursólico [6].

En Ecuador, aproximadamente el 70 % del territorio presenta climas tropicales y subtropicales, esta condición favorece el crecimiento y la diversidad de especies de serpientes [8]. En 2018, Ecuador registró 1450 casos de mordedura de serpiente, en 2019, 1489 casos, en 2020, 1438 casos y hasta la semana 22 del 2021, 623 casos de los cuales 7 resultaron en muerte [8]. El problema se enfoca en la Amazonía Ecuatoriana, pues comparando los datos del Ministerio de Salud Pública en cada uno de los años mencionados, con el resto de las provincias, el número de accidentes ofídicos las lideran provincias amazónicas. En 2022, hasta la semana 48, se registraron 1181 casos por mordedura de serpiente (658 leves, 342 moderadas y 189 graves), donde 497 ocurrieron en la Amazonía [10], y en el año 2023, de la semana 1 a la 7, se presentaron 138 casos (75 leves, 35 moderadas y 22 graves) de los cuales 49 ocurrieron en la Amazonía [11].

Al analizar los datos mencionados, se observa como las cifras en todos los periodos de tiempo han permanecido altas, por lo que resulta lógico pensar en la necesidad e importancia, de la disponibilidad y accesibilidad a sueros antiofídicos. Además, estos accidentes tienen mayor ocurrencia en zonas rurales, donde por lo general la pobreza es extrema y el acceso a centros de salud es escaso [12]. Por ende, el acceso a un suero antiofídico comercial se vuelve difícil, sin contar con las barreras de negligencia que presentan los sistemas públicos [12, 13, 14]. Por si fuera poco, Ecuador pasó de ser un país productor de sueros antiofídicos, con potencial de abastecer a otros países, a cerrar sus plantas de producción y depender de sueros importados de países como Costa Rica, país que posee serpientes distintas y por ende presenta una respuesta clínica inferior a la que se necesita [12].

En el territorio ecuatoriano existe la presencia de 36 especies de serpientes venenosas, estos reptiles se encuentran distribuidos a lo largo de diversas regiones del país [15, 16]. Los ofidios presentan principalmente tres tipos de venenos, neurotóxico, hemotóxico y miotóxico, el primero contiene componentes que interfieren con la transmisión de señales nerviosas, perturbando los canales iónicos o los neurotransmisores del sistema nervioso de sus presas, resultando en parálisis y, o la muerte misma [5]. El veneno hemotóxico por otro lado, afecta principalmente la sangre y los tejidos circundantes, resultando en hemorragias internas, necrosis de tejidos y síntomas sistémicos como la coagulación intravascular diseminada [5]. Por último, el veneno miotóxico afecta específicamente a los músculos, las toxinas del veneno pueden interferir con la función normal de las células musculares, lo que resulta en la degradación de las fibras [5].

Los accidentes ofídicos, son el resultado de mordeduras de serpientes venenosas, destacándose como un problema de salud global de importancia significativa. En Ecuador estos eventos no solo afectan a comunidades rurales en áreas de mayor biodiversidad, como la Amazonía y regiones costeras, que representan el 36,23 % y 43,48 %, respectivamente del total de accidentes registrados en el país en el primer semestre del último año [11], sino que también representan una carga considerable para los sistemas de atención médica [17]. La incidencia de accidentes ofídicos revela la interacción compleja entre las poblaciones humanas y la fauna silvestre, resaltando la necesidad de estrategias preventivas y de tratamientos efectivos [18].

Una de las familias de serpientes venenosas y que han ocasionado varios accidentes ofídicos en Ecuador, es la familia Viperidae con 17 especies, estas poseen colmillos retráctiles que les permiten mantenerlos plegados cuando no los están utilizando, evitando el desgaste, en general, presentan una cabeza triangular y una coloración camuflada que les permite mimetizarse con su entorno [19]. Su veneno contiene diversas enzimas y proteínas con efectos hemotóxicos, miotóxicos y, en algunos casos, necrotizantes [20].

Existen varios registros de plantas alexitéricas en el país, es decir, plantas que han sido empleadas para combatir los efectos producidos por animales venenosos [5]. Estas han sido objeto de investigación en el campo de la medicina tradicional, y algunas de ellas han mostrado potencial para neutralizar los efectos tóxicos causados por las mordeduras de serpientes venenosas [5].

Una familia vegetal que posee varias especies útiles en el ámbito médico, además de presentar registros como posibles neutralizantes de accidentes ofídicos, son los miembros de la familia Gesneriaceae [21]. Estas especies, son comúnmente bejucos con periantos notables o hierbas suculentes situadas en el sotobosque [21], las cuales poseen inflorescencias que pueden encontrarse en las axilas o en la parte terminal de la planta [22]. Muchas especies de esta familia se

caracterizan por contar con registros de tipo medicinal en las comunidades [23].

El género *Columnea*, perteneciente a las Gesneriaceae, posee cinco especies que se han caracterizado por tener registros respecto a diferentes cualidades de interés para las sociedades humanas [24]. Se ha comprobado que especies como *C. parviflora* y *C. consanguinea* poseen actividad antibacteriana [24], a su vez, se han hecho análisis fitoquímicos con el fin de observar qué tipos de metabolitos poseen estas plantas, tales son los casos como de *C. cruenta*, especie a la que se le atribuye funciones como el alivio en afecciones renales [25], o el de *C. picta,* una de las especies a la que comunidades como la Awá-cuaiquier utiliza como antiofídico [26]. Bajo esta perspectiva, una especie que despierta el interés para estudiar es *C. villosissima,* ejemplar botánico que según los registros de Schultes y Raffauf [27], se ocupa en diferentes grupos sociales, al igual que *C. picta,* como antiofídico.

El presente artículo toma como referencia a *Bothrocophias microphthalmus* o comúnmente conocida como "macanchi", por su distribución en una de las zonas de incidencia (Pastaza) [28]. Esta especie se distribuye a lo largo de la vertiente oriental de los Andes de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, a una altura de entre los 1000-2350 msnm [28]. En Ecuador posee registros en las provincias de Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe y Tungurahua [28, 29].

El veneno de *B. microphthalmus* es bioquímicamente complejo, conteniendo enzimas como proteasas y fosfolipasas, que descomponen proteínas y membranas celulares [30]. La presencia de metaloproteinasas agrega un efecto hemorrágico, caracterizando su veneno como hemotóxico [30]. Su composición es similar a la de *Bothrox atrox*, debido a que los efectos fisiológicos que presentan las presas de ambas especies son hemorragias y necrosis [20, 30]. Además, de compartir similitudes morfológicas también comparten hábitats, especialmente en zonas de bosque piemontano, lugar de transición entre la región litoral y la Amazonía, lo que suele generar confusión en la identificación de las especies [19, 31]. Esto ha llevado a que accidentes atribuidos a *B. atrox*, una especie con altos registros de mordeduras, puedan en realidad haber sido causados por *B. microphthalmus*, lo que a su vez ha ocasionado que a ambas se las denomine comúnmente como serpiente "X" [32].

En este contexto, una alternativa antiofídica que presenta registros de su actividad antivenómica, además de tener ancestros evolutivos también medicinales, es *C. villosissima*, planta nativa andina y amazónica, de entre los 0 y 2000 msnm [33], su área de distribución abarca desde el norte de Perú hasta el sur de Colombia, se la puede encontrar esencialmente en el bioma tropical húmedo [34]. En Ecuador, se la ha encontrado principalmente en las provincias de Tungurahua, Pastaza, Morona Santiago, Napo y Sucumbíos [33].

El presente artículo tiene como objetivos caracterizar fitoquímicamente la planta *Columnea villosissima* con vistas a encontrar posibles metabolitos secundarios que puedan contribuir a la actividad antiofídica, y comprobar la capacidad antihemolítica del extracto de las hojas de *C. villosissima* ante el veneno de *B. microphthalmus* a través de ensayos *in vitro*, para evidenciar de manera científica las propiedades antiofídicas que comúnmente se le atribuye.

2. Metodología

Los procesos que se describen a continuación, incluyendo la obtención del veneno y la recolección de los especímenes, se llevaron a cabo en estricta conformidad con la ley, normativas y permisos establecidos. El Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, mediante el permiso N° MAATE-ARSFC-2023-0383, autorizó formalmente la colecta de los recursos biológicos, garantizando así la legalidad y ética de todas las actividades relacionadas con este estudio.

2.1. Colección y preservación de muestras botánicas

Las muestras *C. villosissima* se colectaron en la provincia de Pastaza, en sendero ecológico Alpayacu, a una altura de 1086 msnm, latitud: 1°27'46.3"S y longitud: 78°06'14.3"W. Se tomaron dos tipos de muestras de la planta, la primera fue el espécimen completo fértil, desde la base, con flores desarrolladas, raíces aéreas y hojas bien definidas, a esta se la prensó para su conservación; una vez seca, se llevó la muestra al herbario ECUAMZ, donde se realizó la identificación taxonómica con en coordinación con los técnicos del lugar, y se ingresó la muestra al herbario para su preservación. La segunda muestra constó netamente de hojas que fueron transportadas al laboratorio de Química de la Universidad Estatal Amazónica, la mitad de las hojas colectadas se pusieron en una estufa Barnstead International modelo 3513 a una temperatura de 35°C para así secarlas por completo.

2.2. Obtención y conservación del veneno

El veneno liofilizado utilizado en este estudio fue adquirido en la provincia de Pastaza, Cantón Mera, del Centro de Investigación Waska Amazonía, ubicada a una latitud: 1°27'19.00"S y longitud: 78°6'41.77"W. Se transportó el veneno al laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica y se almacenó en ultracongeladora Daihan scientific a -80°C.

2.3. Obtención y conservación de la sangre

Se extrajo una muestra de 5 mL de sangre humana que fue cedida de forma voluntaria por uno de los integrantes de la investigación, la muestra se depositó en un tubo Vacutech con citrato de sodio al 3.2%. La muestra se etiquetó y se conservó en un refrigerador convencional a 4 °C.

2.4. Preparación de extractos

Se prepararon dos extractos para las hojas frescas y secas de *C. villosissima*, uno con agua destilada, y otro con etanol al 70%. Para la muestra de hojas frescas se trituró manualmente 10 gramos de estas, luego se mezclaron en 100 mL de los dos disolventes indicados respectivamente en matraces Erlenmeyer, una vez hecha la mezcla, se tapó el orificio de los matraces con papel Parafilm y se dejó macerar durante 72 horas. Para la muestra de hojas secas, estas se pulverizaron en un triturador marca Oster y se mezclaron 5 gramos de hojas pulverizadas en 100 mL de ambos disolventes, las muestras se sellaron y se dejaron macerando al ambiente por 72 horas. Los extractos etanólicos reposaron a temperatura ambiente, mientras que los extractos acuosos en un

refrigerador convencional a 4°C [35, 36].

2.5. Tamizaje fitoquímico

Se realizó el estudio cualitativo de 9 metabolitos secundarios, en el extracto alcohólico y acuoso tanto de muestras de hojas frescas y secas de *C. villosissima*.

Para la determinación de saponinas, a 1 mL de extracto, alcohólico y acuoso respectivamente, se adicionaron 9 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente 30 segundos y se dejó reposar 10 minutos. Si se forma espuma y se mantiene es positivo [37].

Se realizaron tres pruebas para determinar la presencia de alcaloides: Dragendorff, Wagner y Mayer. Para los tres ensayos se tomó 1 mL de extracto, a la cual se le agregaron tres gotas de H2SO4 al 10%. Posteriormente, se añadieron cinco gotas del reactivo correspondiente para cada prueba [38, 39]; es positivo para Dragendorff, si la mezcla muestra un precipitado naranja rojizo, para Wagner si aparece una coloración rojo-intensa o púrpura, y para Mayer si se observa un precipitado o turbiedad blanca.

Para la determinación de flavonoides se empleó dos métodos, para el primero, a 1 mL de extracto se adicionó 1 mL de HCl (concentrado) más una pequeña porción de granallas de zinc, se dejó reposar por un tiempo hasta observar cambios, el ensayo es positivo si se observa una coloración rojo-púrpura, rosa o café, la coloración roja púrpura indica presencia de dihidroflavonoides mientras que la coloración rosa o café indican la presencia de otros flavonoides. Para el segundo método, a 1 mL de extracto se añadió tres gotas de NaOH al 20%, se agitó y se dejó en reposo, el ensayo es positivo si observa algún cambio de coloración.

Para compuestos fenólicos y/o taninos, también se ocuparon dos métodos, en el primero, se adiciona 1.5 mL de FeCl3 a 1 mL de extracto en un tubo de ensayo, se agitó y se dejó en reposo, si aparece un color rojo-vino es positivo para compuestos fenólicos en general, si el color es verde intenso es positivo para taninos pirocatecólicos y si la coloración azul, es positivo para taninos derivados del ácido gálico. Para el segundo método, a 1 mL de extracto se le añadieron cinco gotas de acetato de plomo y se agitó, si aparece turbiedad o un precipitado blanco el ensayo es positivo para taninos.

Para los triterpenos y esteroides se aplicó en el ensayo de Liebermann-Burchard, aquí a un 1 mL de extracto se le adicionó 1 mL anhídrido acético y tres gotas de H2SO4 (concentrado), un cambio de coloración rápida de rosa a azul es muy positivo (+++), una coloración verde intenso es evidente positivo (++) y una coloración es verde oscuro – negro al final es positivo (+).

Se aplicó el ensayo de ninhidrina para los observar aminoácidos libres o aminas, donde a 1 mL de extracto, se le adicionaron 2 mL de ninhidrina al 2%, se lo calentó de 5 a 10 minutos en baño de agua, el ensayo resulta positivo si se observa una coloración azul violeta.

Para quinonas se empleó el ensayo de Borntrager, esta prueba se evapora mediante un baño de agua 1 mL de extracto alcohólico y acuoso en un tubo de ensayo cada uno, el residuo se disolvió en 1 mL de CHCl3 (cloroformo) y se adicionó 1 mL de NaOH al 5% en agua, se agitó y se dejó en reposo hasta que se separen las fases, si aparece una coloración rosada en la fase superior es positivo, mientras que si aparece una coloración roja en la fase superior es muy positivo.

El ensayo de Fehling se utilizó para azúcares reductores; a 1 mL de extracto se le añadió la mezcla de 1 mL de reactivo Fehling A con 1 mL del reactivo Fehling B, el tubo de ensayo con las muestras se calentó en baño de agua de 5 a 10 minutos, es positivo si aparece una coloración roja o naranja o aparece un precipitado rojo.

Para antocianidinas, se añadió 1 mL de HCl (concentrado) a 1 mL de extracto, se calentó por 10 minutos en baño de agua y luego se le dejó enfriar, una vez frío se adicionó 1 mL de agua destilada y 2 mL de alcohol amílico, se agitó y se dejó en reposo hasta que se separen las fases, el ensayo resulta positivo si aparece un color rojo-marrón.

Puesto que a los compuestos fenólicos se les puede atribuir una gran capacidad antiofídica, se cuantificaron los mismos, luego de concentrar el extracto etanólico y acuoso. Para la concentración de los extractos, las hojas pulverizadas de *C. villosissima* se dividieron en dos porciones de 36.8 gramos, la primera porción se mezcló en 500 mL de agua destilada y la segunda en 500 mL de etanol al 70%, ambos frascos se sometieron a un proceso extractivo en un baño ultrasónico Branson 3800 a 60°C durante 1 hora, los extractos obtenidos se filtraron con papel filtro Walmart N°4, una vez filtrado, se trasladó ambos extractos a un baño maría Thermo Precision 2870 a 80°C y se mantuvo ahí hasta que con la evaporación el volumen total de los extractos disminuya a la mitad del mismo.

2.6. Cuantificación de compuestos fenólicos

Para esta cuantificación se utilizó el enfoque metodológico descrito por García et al. [40] y Luna et al. [41], tomando 0.5 mL del extracto acuoso y etanólico concentrado de las hojas secas de *C. villosissima*, y se lo diluyó en un matraz 10 mL con agua destilada, añadiendo 0.5 mL del reactivo *Folin-Ciocalteu* con agua destilada, dejándolo en reposo por 10 minutos, posterior a ello, se añadió a la mezcla 0.5 mL de carbonato de sodio al 20%, dejándolo en reposo 2 horas a temperatura ambiente, después se sometieron las muestras a un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 25 Perkin Elmer, midiendo la absorbancia a 765 nm, los ensayos se realizaron por triplicado. La determinación de la concentración de fenoles totales que tenían las muestras de los extractos de *C. villosissima* se midió con la referencia de la curva de calibración de ácido gálico, utilizando la **Ecuación 1** previamente por Arteaga et al. [42] que se muestra a continuación:

$$A = 0{,}0734C - 0{,}0028 \tag{1}$$

Donde:

A: Absorbancia de la muestra

C: Concentración de la muestra ($mg \cdot L^{-1}$)

El blanco se preparó con 0.5 mL de agua destilada, 0.5 mL de *Folin-Ciocalteu,* se añadió 0.5 mL de carbonato de sodio al 20% y finalmente se aforó con agua destilada [41].

2.7. Bioensayo de hemólisis mediante microscopía óptica

Se realizaron cinco ensayos a través de un microscopio binocular marca Motic tomando como referencia la metodología de Chang [43] para verificar la actividad hemolítica del veneno de *B. microphthalmus* y la inhibición de su actividad luego de usar el extracto etanólico y acuoso de las hojas de *C. villosissima*. Se agregó en un portaobjetos una cantidad determinada de sangre, de manera inmediata veneno y antiofídico, según sea el caso (**Tabla 1**), se realizó un frotis a cada tratamiento con una espátula y se hicieron dos observaciones a una visión de 40X, la primera al minuto y la segunda en un lapso de 20 a 30 minutos.

Tabla 1 | Bioensayos de hemólisis microscópicos

Blanco 1	10 µL Sangre
Control negativo	10 µL sangre + 10 µL veneno
Control positivo	10 µL sangre + 10 µL antiofídico comercial
Prueba control 1 (extracto acuoso)	10 µL sangre + 10 µL veneno + 80 µL extracto acuoso
Prueba control 2 (extracto alcohólico)	10 µL sangre + 10 µL veneno + 80 µL extracto alcohólico

2.8. Bioensayo de hemólisis por espectrofotometría

Se empleó la metodología de Chang [43] y Ayres et al. [44]; mediante un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 25 Perkin Elmer, utilizando como blanco 16 μL de sangre humana más 1 mL de disolución salina fisiológica (NaCl 0.9%), se tomaron las absorbancias a 700 nm por 16 minutos, realizando mediciones en cada minuto, para cada tratamiento (**Tabla 2**).

Tabla 2 | Bioensayo de hemólisis por espectrofotometría

Curva	Sangre (µL)	Solución Salina (µL)	Veneno (µL)	Antiofídico Comercial (µL)	Extracto acuoso (µL)	Extracto alcohólico (µL)
Control negativo	16	10	20			
Control positivo	16	10	20	50		
Inhibición 1	16	10	20		50	
Inhibición 2	16	10	20			50

3. Resultados y discusión

3.1. Resultados

3.1.1. Análisis fitoquímico

Al realizar el tamizaje fitoquímico, se identificaron qué metabolitos secundarios de los 9 propuestos estaban presentes en cada tipo de extracto, como se muestra en la **Tabla 3.**

En cuanto a los resultados a partir de extractos con hojas frescas, los alcaloides fueron el grupo que presentó mayor abundancia en general, los flavonoides por otra parte únicamente mostraron poca abundancia en la prueba con NaOH en extracto acuoso, de la misma forma sucedió con los compuestos fenólicos y/o taninos en la prueba con acetato de plomo y en el extracto etanólico de ambas pruebas de este tipo de metabolito. Cabe mencionar que en la prueba con $FeCl_3$, puesto que presentó una coloración verde intensa.

Tabla 3 | Tamizaje fitoquímico de la muestra de hojas frescas y secas de C. villossisima

Hojas frescas			
Metabolito	Prueba/reactivo	Agua	Etanol
Saponinas	Espuma	-	-
Alcaloides	Dragendorf	+++	+++
	Wagner	+++	++
	Mayer	+	++
Flavonoides	HCl	-	-
	NaOH	+	-
Compuestos fenólicos/ taninos	$Fecl_3$	-	+
	Acetato de Plomo	+	+
Aminoácidos libres o aminas	Ninhidrina	-	-
Quinonas	Ensayo de Borntrager	-	-
Azúcares reductores	Fehling	-	-
Antocianidinas		-	-
Triterpenos y esteroides	Liebermann-Burchard	-	-
Hojas secas			
Metabolito	Prueba/reactivo	Agua	Etanol
Saponinas	Espuma	-	+++
Alcaloides	Dragendorf	+	+
	Mayer	+	+
	Wagner	++	+
Flavonoides	HCl	++	+
	NaOH	+	-
Compuestos fenólicos/ taninos	$Fecl_3$	+++	++
	Acetato de Plomo	+++	++
Aminoácidos libres o aminas	Ninhidrina	+++	++
Quinonas	Ensayo de Borntrager	+++	++
Azúcares reductores	Fehling	+++	+++
Antocianidinas		++	+
Triterpenos y esteroides	Liebermann-Burchard	-	+

3.2. Cuantificación de compuestos fenólicos

Los resultados de la cuantificación de los compuestos fenólicos en los 2 extractos de las hojas de *C. villosissima* muestran una cantidad significativa de polifenoles, siendo notablemente superior los polifenoles totales en extracto etanólico en comparación con los encontrados en extracto acuoso **(Tabla 4).** La diferencia en los niveles de polifenoles entre los dos extractos puede atribuirse a las propiedades únicas de cada disolvente; el etanol, debido a su polaridad relativa, podría haber extraído una mayor cantidad de compuestos fenólicos de mediana polaridad presentes en las hojas de la planta que el agua, lo que podría explicar la observación de valores entre 1248,86 a 1283,42 mg/100g.

Tabla 4 | Cuantificación de compuestos fenólicos

Extracto	MG EAG/100 G MS
Acuoso	898,15
	921,84
	906,11
Alcohólico	1263,67
	1283,42
	1248,86

3.3. Bioensayo de hemólisis mediante microscopía óptica

Se denota con claridad los glóbulos rojos en la sangre bajo condiciones normales luego de 1 minuto y su evolución luego de 20 a 30 minutos, en ambos casos se visualiza los glóbulos rojos juntos de forma homogénea representando a la sangre

en condiciones normales **(Figura 1)**.

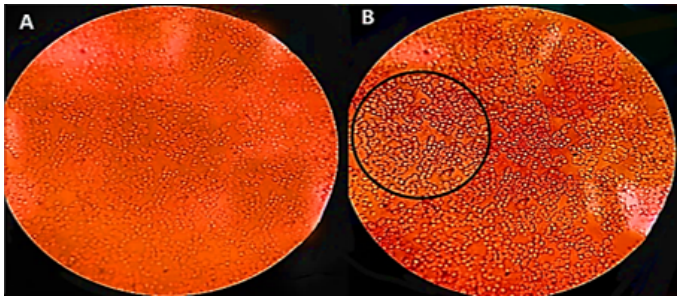


Figura 1 | Bioensayo bajo el microscopio con sangre humana

Por otro lado, la sección donde ya se le añade veneno a la sangre **(Figura 2., parte C)**, aunque no se observa cambios significativos, se aprecia espacios vacíos entre las células, lo que quiere decir que hubo una reducción parcial de la cantidad original de eritrocitos, producto del rompimiento y por ende desaparición de algunos glóbulos rojos de manera instantánea al contacto con el veneno, la falta de actividad del mismo se debe a su tiempo activación o de actuación, este depende de varios factores como la cantidad de veneno, dieta de la serpiente o a su vez edad o cantidad de eritrocitos que la persona afectada presenta, la parte D de la **Figura 2**, es evidencia de esto, ya que luego de 30 minutos la hemólisis ya es evidente y se nota la lisis total de los glóbulos rojos comprobándose la letalidad del veneno.

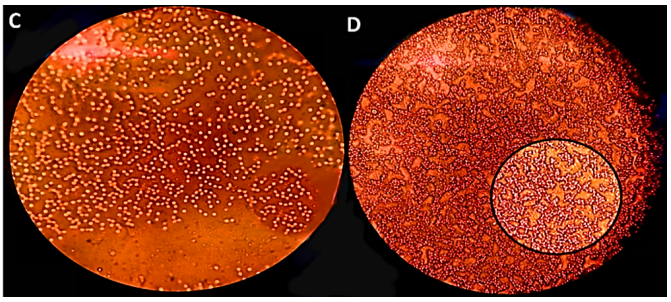


Figura 2 | Bioensayos bajo microscopio con sangre + veneno de B

Por otra parte, se obtuvo una inhibición positiva luego de aplicar el suero antiofídico comercial al tratamiento **(Figura 3)**, se apreció que los eritrocitos en la parte F mostraron mayor estabilidad en los glóbulos rojos, aunque que hay una reducción de aproximadamente el 60% del total de glóbulos rojos iniciales, no se observa eritrocitos lisados. Los sueros antiofídicos detienen la evolución del envenenamiento [45]. Es por esto que, con ayuda del antiofídico, los glóbulos rojos restantes que aún están sanos tenderán a agruparse, llenando aquellos espacios vacíos para detener un desangramiento interno o externo producto de la hemólisis contrarrestando así los efectos del veneno y encontrando estabilidad tal como se hallaban las células la sangre pura **(Figura 2)**, esto coadyuvaría a detener una posible hemorragia interna y externa.

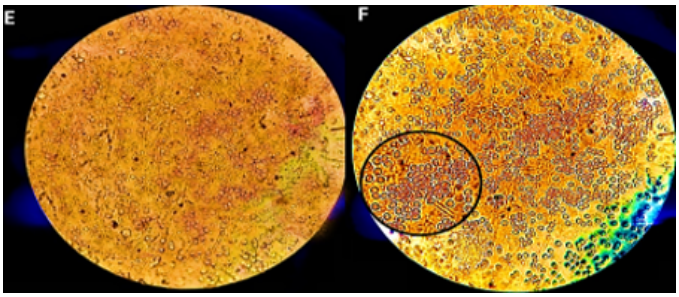


Figura 3 | Bioensayos bajo microscopio con sangre + veneno de B. microphthalmus + antiofídico comercial

El resultado obtenido con la aplicación del extracto acuoso de las hojas de *C. villosissima*, tuvo una inhibición positiva ante la actividad venómica, en esta parte no se denotan signos de hemólisis y a su vez, muestra mayor estabilidad que en la **Figura 3**, aunque sí hay una reducción del contenido inicial de células, también se observó como las células restantes se juntaban ocupando los espacios vacíos.

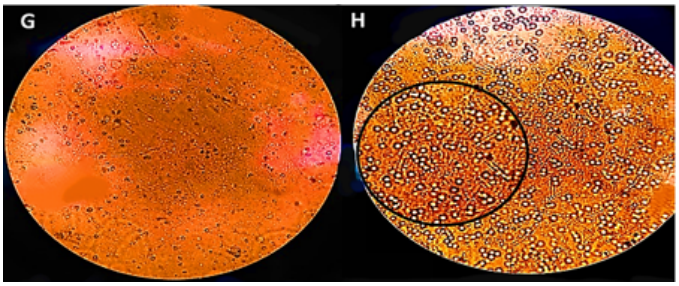


Figura 4 | Bioensayos bajo microscopio con sangre + veneno de B. microphthalmus + extracto acuoso C. villosissima

El último ensayo con el extracto alcohólico dio como resultado una inhibición positiva, mostrando una mejor respuesta que la obtenida con el extracto acuoso. Este resultado destaca la mayor estabilidad e incremento en el número de células "sobrevivientes.[en] la sangre como se observa en la **Figura 4**, además, sus glóbulos rojos mantienen una uniformidad y casi no se notan signos de hemólisis, sin embargo, es pertinente señalar que, a diferencia de la respuesta con el antiofídico comercial, las células restantes del ensayo del extracto alcohólico y acuoso mostraron reducción en su tamaño lo que indicaría una pequeña pérdida de su contenido intracelular.

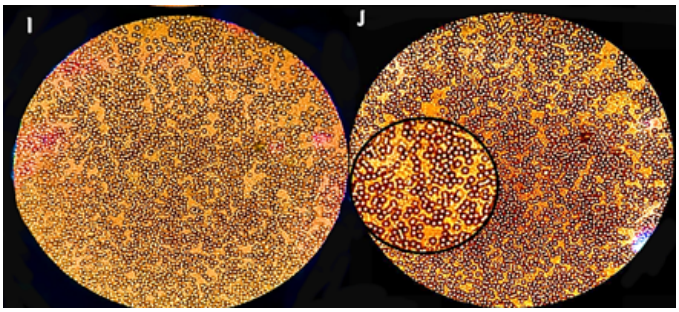


Figura 5 | Bioensayos bajo microscopio Sangre + veneno de B. microphthalmus + extracto alcohólico de C. villosissima.

3.4. Bioensayo de hemólisis mediante medición espectrofotométrica

En este bioensayo se demuestra comparativamente el efecto de añadir los extractos de las hojas de *C. villosissima*, res-

pecto a la hemólisis producida por el veneno de la serpiente *B. microphthalmus*. Los resultados se contrastan con el comportamiento de la sangre durante el intervalo de tiempo que duró el experimento (16 minutos) y el efecto de añadir el antiofídico comercial **(Figura 5)**.

Si se compara la sangre con la mezcla de sangre y veneno, se puede observar una disminución importante de la absorbancia hasta llegar al valor cero al cabo de los 16 minutos (Figura 6), lo cual indica un efecto de hemólisis total. Al adicionar el antiofídico comercial a la mezcla sangre con el veneno se observa un claro efecto protector respecto a la hemólisis durante el tiempo de medición de la absorbancia; en cambio la adición del extracto acuoso solo preservó de la hemólisis durante los primeros 7 u 8 minutos y luego la absorbancia disminuyó hasta un valor cercano a cero **(Figura 6)**. El extracto alcohólico por su parte ofreció una protección similar al antiofídico comercial, por lo que pudiera ser utilizado con estos fines destacando su capacidad para mitigar los efectos del veneno de manera más efectiva en comparación con el extracto acuoso.

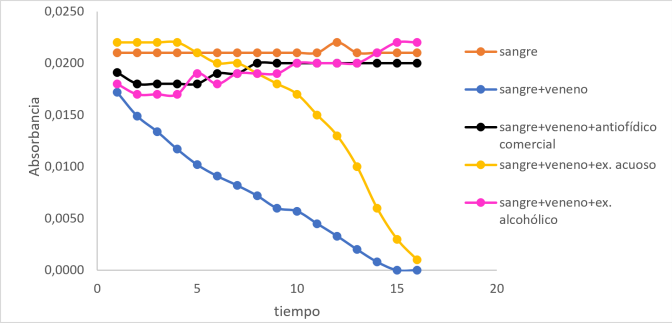


Figura 6 | Comportamiento de absorbancias en función del tiempo de las mezclas evaluadas.

3.5. Discusión

La literatura carece de investigaciones previas sobre los estudios fitoquímicos o la actividad antiofídica específicamente de *C. villosissima,* sin embargo, este estudio revela que el extracto de las hojas de esta planta muestra efectos positivos como antiofídico contra el veneno de *B. microphthalmus*, en estado alcohólico más que en acuoso. Por otro lado, hay caracterizaciones químicas de otras especies de *Columnea*, como *C. picta,* que también se consideran antiofídicas, contrastando los resultados obtenidos con los de Ospina y Bacca [20], se observa que *C. picta* tiene una cantidad considerable de flavonoides, al igual de *C. villosissima*, lo cual se muestra en la **Tabla 3**., aunque *C. picta* posee más que *C. villosissima*. Sin embargo, *C. villosissima* muestra una mayor abundancia de alcaloides, saponinas y quinonas en comparación con *C. picta,* pero al comparar ambos resultados se observó que *C. villosissima* presenta notablemente mayor abundancia de alcaloides, saponinas y quinonas.

Morales [46] por otra parte, quien caracterizó los metabolitos de *Columnea maculata*, *Columnea nicaraguensis* y *Columnea zebrina* consiguió resultados más alentadores en relación con *C. villosissima,* ya que obtuvo una mayor cantidad o presencia de saponinas, triterpenos, esteroides, flavonoides y relativamente los taninos en las tres especies respectivamente, el único grupo que demostró poseer mayor presencia en *C. villosissima* fueron los alcaloides, es así que se puede asumir que aunque las tres especies podrían tener mayor actividad biológica, *C. villosissima* sería capaz de contar con mayor actividad analgésica por presentar mayor contenido de alcaloides, cabe mencionar que el autor no indica una actividad específica para las tres especies, únicamente hace alusión a que todas poseen un uso de índole medicinal, sin embargo, otros autores como Barranco [47], aunque no han caracterizado fitoquímicamente a otras especies de este género, sí lo ha hecho con otras plantas de uso antiofídico, como el caso de *Equisetum bogotense*, especie que al igual que *C. villosissima* demostró poseer alcaloides, triterpenos-esteroides y taninos, o a su vez *Copaifera reticulata,* otro antiofídico natural al que Haro [48] demostró que poseía azúcares reductores, flavonoides y terpenos, metabolitos que se repiten en *C. villosissima.*

La cuantificación de los compuestos fenólicos es consistente con investigaciones previas que destacan la eficacia del etanol como disolvente para la extracción de compuestos fenólicos como lo menciona Pérez et al. [49]. Por ejemplo, en el estudio de Ordoñez et al. [50], se encontró que el etanol proporcionaba una extracción más eficaz de polifenoles en comparación con la extracción acuosa en cuanto a la especie *Psydium guajava,* demostrando de esta manera un mayor efecto antioxidante en el extracto etanólico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, donde se evidencia una cantidad notablemente mayor de compuestos fenólicos en el extracto alcohólico en comparación con el extracto acuoso **(Tabla 4)**

Pese a los pocos estudios sobre compuestos fenólicos en las especies de la familia *Columnea*, es importante mencionar que sí se han llevado a cabo análisis en otras plantas con propiedades alexitéricas. En un estudio realizado por Morales [51], se identificó que la especie *Piper umbellatum* poseía una concentración de 14,51 mg/100g de polifenoles en la planta. Este hallazgo sugiere que *Piper umbellatum* podría desempeñar un papel significativo en el ámbito farmacéutico debido a su contenido de polifenoles, sin embargo, contrastando tales resultados respecto a los encontrados en los extractos *C. villosissima*, donde el valor más alto fue de 1283,42 mg/100g, se puede verificar que el contenido de compuestos fenólicos presentes en la especie estudiada sobrepasa significativamente a los encontrados en *P. umbellatum*; Morales [51] realizó investigaciones adicionales en *P. umbellatum,* donde sometió sus extractos a pruebas de inhibición de la hialuronidasa, enzima que facilita la difusión de las toxinas provenientes del veneno de la serpiente [52], y que resultan en efectos como disgregación del tejido conectivo [53], usando el veneno de *N. naja* y *B. atrox,* en diferentes concentraciones, sin embargo, ninguno de los tratamientos logró superar el 50 % de inhibición, solo el ensayo realizado con el veneno de *Naja naja* únicamente alcanzó una inhibición del 23,754 %, tomando como referencia una concentración de 250 mg/kg de veneno. Bajo este contexto, puesto que *C. villosissima* posee una proporción de compuestos fenólicos muy altos en comparación con *P. umbellatum,* y recordando que estos metabolitos poseen capacidades antiofídicas en muchos casos, resulta lógico afirmar que la posible capacidad de inhibición de la hialuronidasa en *C. villosissima* podría ser mayor al 50 % de la efectividad comprobada con *P. umbellatum.*

En cuanto al bioensayo de hemólisis, Chang [43] realizó un experimento similar mediante la implementación de una infusión de alcaloides de *Tradescantia spathecea* y *Sansevieria trifasciata.* En cuanto a la inhibición de la hemólisis con ambas especies, se notó que los eritrocitos, aunque en gran parte muestran estabilidad, tamaño y una forma estable, otros pocos también se encuentra con ciertas distorsiones en su forma o presentan tamaños más pequeños a los de una célula sana, contrastando tales resultados respecto a *C. villosissima*, se apreció que el extracto tanto acuoso como etanólico de *C. villosissima* mantiene mayor estabilidad en cuanto a la morfología celular, pues las células no presentan distorsiones ni una simetría dañada, sin embargo lo que sí se puede rescatar de los bioensayos de Chang [43] es que la mayoría de sus eritrocitos no exhiben una reducción en el tamaño tan notable como en las células evaluadas con los extractos de *C. villosissima.*

Finalmente, en lo que respecta al bioensayo de hemólisis por medición espectrofotométrica, se destacó que el estudio de Chang [43] arrojó curvas similares a las de este artículo. En su publicación, se evidenció una marcada disminución en la curva de inhibición durante la prueba de sangre más veneno, indicando un impacto negativo en la estabilidad de los eritrocitos, tal efecto fue idéntico en este artículo, en ambos casos el veneno generó un efecto hemolítico respecto a los glóbulos rojos, un fenómeno similar ocurrió al añadir el antiofídico comercial a los tratamientos puesto que las curvas registraron una reducción en la absorbancia durante los primeros minutos, seguida de una estabilización, la única diferencia se basó en el tiempo en el que llegó esta estabilización ya que Chang [43] la registró en los primeros cinco minutos y en este caso fue a los ocho minutos, esto puede deberse a la composición química de los sueros. Cabe mencionar que la estabilización de las absorbancias indica una neutralización del efecto hemolítico en la sangre. En el mismo artículo, Chang [43] ejecutó sus pruebas de inhibición de hemólisis con el extracto de *Atropoides mexicanus*, sus resultados mostraron absorbancias favorables ya que se obtuvo una estabilidad notable, aunque con pequeños descensos, por otra parte con el extracto alcohólico de las hojas de *C. villosissima,* como se observa en la figura 6, mantiene una constancia e incluso aumentó la absorbancia, lo que refiere a una mejor actividad antihemolítica, indicando la neutralización de la hemólisis con la aplicación de este extracto respecto al veneno, lo que respalda a su vez los resultados cualitativos obtenidos previamente. Si bien se puede destacar la importancia y aplicabilidad del extracto de *A. mexicanus* en el ámbito de la protección antiofídica, también se puede destacar el resultado obtenido en este trabajo para el extracto alcohólico de las hojas de *C. villosissima,* ya que fue superior a los obtenidos por Chang [43]. Cabe mencionar que ambos estudios se hicieron en lapsos de 15 y 16 minutos respectivamente por lo que se recomienda evaluar las reacciones en periodos mayores de tiempo con el fin de verificar cuál es punto hasta donde el extracto tiene efecto en relación con el veneno.

4. Conclusiones

Se demostró que *Columnea villosissima* posee actividad antiofídica, dado que el principal efecto del veneno de *B. microphthalmus* es la hemólisis; en todas las pruebas la sangre mostró estabilidad en sus glóbulos rojos ante el veneno durante un determinado lapso luego de aplicar los extractos, el etanólico más que el acuoso, acercándose en parte al comportamiento obtenido con el antiofídico comercial utilizado durante los tiempos evaluados, es así que se infiere que las hojas de *Columnea villosissima* presentan capacidad antihemolítica, lo que a su vez podría respaldar el por qué diferentes grupos sociales utilizan tal planta en accidentes ofídicos.

Los metabolitos secundarios a los que se les pudiera atribuir la actividad antihemolítica, se extrajeron en mayor medida en las hojas secas de *Columnea villosissima*, entre los cuales están flavonoides y los otros compuestos fenólicos, además de otros metabolitos como los alcaloides y triterpenos, que se repiten en aquellas otras plantas también etiquetadas como antiofídicas, estos compuestos junto a los alcaloides detectados, al poseer actividad analgésica, antiinflamatoria y antimicrobiana, podrían estar vinculadas a los efectos antihemolíticos y por ende a la actividad antiofídica en general.

Contribuciones de los autores

Jeshua Mateo Viera Almache: Adquisición, y análisis de los datos; redactó el manuscrito, aprobó la versión enviada y la versión sustancialmente editada

Kayla Stephanie Cambizaca Pozo: Adquisición, y análisis de los datos; redactó el manuscrito, aprobó la versión enviada y la versión sustancialmente editada

Luis Ramón Bravo Sánchez: Concepción del trabajo; aprobó la versión enviada y la versión sustancialmente editada

Todos los autores aporbaron la version enviada y editada.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

5. Referencias

1) RIOS, M. Plantas útiles del Ecuador: uso y abuso. En: M., RIOS, R., DE LA CRUZ y A., MORA. Conocimiento tradicional y plantas útiles del Ecuador [en línea]. Ecuador: Abya-Yala, 2008, pp. 7-29 [fecha de consulta: 09 diciembre 2023]. Disponible en: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=HZU_zQOH3jMC&oi=fnd&pg=PA5&dq=plantas+utiles+del+ecuador&ots=ih-58XgRPx&sig=LfdZRlediAmngut8rPd_tsGoneY#v=onepage&q=plantas%20utiles%20del%20ecuador&f=false

2) DE LA TORRE, L. et al. Enciclopedia de plantas útiles de Ecuador [en línea]. Ecuador: Herbario QCA y Herbario AAU, 2008 [fecha de consulta: 09 diciembre 2023]. Disponible en

3) REYES, J., SALAZAR A. y RÍOS, H. Metabolitos secundarios de las plantas (angiospermas y algunos usos interesantes. Uno sapiens boletín científico de la escuela preparatorita N°1 [en línea]. 2020, **2**(4), 16-18 [fecha de consulta: 09 diciembre 2023]. ISSN 2683-2054. Disponible en:

4) TEOH, E., Medicinal orchids of Asia [en línea]. [s.l] [s.n] 2016 [fecha de

consulta: 09 diciembre 2023]. Disponible en:

5) LOPEZ, A. y PÉREZ, J. Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. Medicina naturista [en línea]. 2009, **3**(1), 17-24 [fecha de consulta: 09 diciembre 2023]. ISSN 1576-3080. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2867907.pdf

6) REYES, R. y JIMÉNEZ, M. Química de las plantas alexitéricas. Interciencia [en línea]. 1995, **20**(5), 257-264 [fecha de consulta: 09 diciembre 2023]. ISSN 0378-1844. Disponible en:

7) MORS, W. et al. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. Phytochemistry [en línea]. 2000, **55**(6), 627-642 [fecha de consulta: 09 diciembre 2023]. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11130675/

8) VARGAS, L., et al. Perfil epidemiológico de los pacientes con emponzoñamiento por ofidios en el hospital José María Velasco Ibarra, Ecuador. Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica [en línea]. 2021, **40**(3), 322-324 [fecha de consulta: 21 diciembre 2023]. ISSN 0798-0264. Disponible en:

9) MINISTERIO DE SALUD PUBLICA. Dirección Nacional de vigilancia epidemiológica. MSP [en línea]. Ecuador, 2021[fecha de consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en:

10) MINISTERIO DE SALUD PUBLICA. Dirección Nacional de vigilancia epidemiológica. MSP [en línea]. Ecuador, 2022[fecha de consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en:

11) MINISTERIO DE SALUD PUBLICA. Dirección Nacional de vigilancia epidemiológica. MSP [en línea]. Ecuador, 2023[fecha de consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en:

12) MENA, M., MALDONADO, X. y ROJAS, G. Mordedura de serpiente, una enfermedad en el olvido. Rev. ecuat. med. Eugenio Espejo [en línea]. 2015, **4**(5), 7-15 [fecha de consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en:

13) HANSSON, E. et al. Using geographical information systems to identify populations in need of improved accessibility to antivenom treatment for snakebite envenoming in Costa Rica. PLoS neglected tropical diseases [en línea]. 2013, **7**(1), 1-13 [fecha de consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en:

14) CORDOVA, G. y SANTO, D. Factores asociados con las complicaciones de un accidente ofídico en pacientes que ingresaron al Hospital General Puyo de la provincia de Pastaza en el periodo enero 2007 a diciembre 2013 [en línea]. Tesis (Título de Médico Cirujano). Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2013 [fecha de consulta: 18 diciembre 2023]. 157 pp. Disponible en:

15) YAÑEZ, C. et al. Estimating geographic patterns of ophidism risk in Ecuador (Squamata: Boidae) by Porocephalus (Pentastomida: Porocephalidae) in Ecuador. Neotropical Biodiversity [en línea]. 2018, **4**(1), 55-61 [Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2023]. Disponible en: https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/23766808.2018.1454762?needAccess=true

16) VALENCIA, J., GARZON, K. Male-male combat in the coralsnake Micrurus mipartitus decussatus (Duméril et al., 1854) (Squamata: Elapidae). Herpetology Notes [en línea]. 2020, 13(1), 329-332. [Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/340818994_Male-male_combat_in_the_coralsnake_Micrurus_mipartitus_decussatus_Dumeril_et_al_1854_Squamata_Elapidae

17) SARMIENTO, K. Aspectos biomédicos del accidente ofídico. Universidad Médica [en línea]. 2011, **53**(1), 68-92 [fecha de consulta: 12 de diciembre de 2023]. ISSN 0041-9095. Disponible en: https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/view/16123

18) GIL-ALARCÓN, G. et al. Tratamiento prehospitalario del accidente ofídico: revisión, actualización y problemática actual. Gaceta Médica de México [en línea]. 2011, Vol. 147, 195-208 [fecha de consulta: 12 de diciembre de 2023]. ISSN 0016-3813. Disponible en: https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=29935

19) CISNEROS, D. et al. Distribution and natural history of the Ecuadorian Toad-headed Pitvipers of the genus Bothrocophias (Squamata: Serpentes: Viperidae: Crotalinae). Herpetozoa [en línea]. 2006, **19**(1/2), 17-26 [fecha de consulta: 12 diciembre 2023]. Disponible en: https://cisneros-heredia.org/2006/08/21/bothrocophias-of-ecuador/

20) LOMONTE, B. & CALVETE, J. Strategies in "snake venomics" aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases [en línea]. 2017, **23**(26). [fecha de consulta: 15 de diciembre de 2023] ISSN 1678-9199. Disponible en: https://jvat.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40409-017-0117-8

21) CLARK, J. y STOG, L. Gesneriaceae. En: S., LEÓN, et al. Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador [en línea]. Ecuador: Publicaciones del Herbario QCA, 2011, p. 344 [fecha de consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/318970039_Libro_Rojo_de_las_Plantas_Endemicas_del_Ecuador

22) INSTITUTO NACIONAL DE BIODIVERSIDAD. Una guía que reporta alrededor de 208 imágenes, 74 especies y 15 géneros de Gesneriaceae en la provincia de Pichincha. INABIO. [en línea]. Ecuador, 23 febrero 2021 [fecha de consulta: 09 diciembre 2023]. Disponible en: .

23) TITUAÑA, M. y YANEZ, O. Análisis Florístico y Etnobotánico de la Comunidad Shuin Mamus – Taisha, Amazonía del Ecuador [en línea]. Tesis (Título de Ingeniero Ambiental). Ecuador: Universidad Estatal Amazónica, 2020 [fecha de consulta: 18 diciembre 2023]. 80 pp. Disponible en:

24) PINO, N., LEDESMA, E. y MARTÓNEZ, L. Actividad antibacteriana de extractos de siete especies de la Familia Gesneriaceae. Revista Salud Uis [en línea]. 2008, **40**(2), 137-139 [fecha de consulta: 21 diciembre 2023]. ISSN 0121-0807. Disponible en:

25) PINO, N. Botánica y screening fitoquímico de doce plantas usadas en medicina tradicional en el Departamento del Chocó, Colombia. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales [en línea]. 2006, **2**(1), 33-44 [fecha de consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en: https://biblat.unam.mx/hevila/Revistalatinoamericanaderecursosnaturales/2006/vol2/no1/4.pdf

26) OSPINA, J., OSPINA, J. y BACCA, C. Análisis fitoquímico preliminar de las hojas de la especie Columnea picta (Capitana), planta utilizada por la comunidad Awá Cuaiquier como antiofídica. Revista cubana de Química [en línea]. 2007, **19**(2), 59-63 [fecha de consulta: 21 diciembre 2023]. ISSN 0258-5995. Disponible en:

27) SCHULTES, R. & RAFFAUF, R. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes – xxxviii: ethnopharmacological and alkaloidal notes on plants of the northwest amazon. Caldasia [en línea]. 1986, **15**(71-75), 331-363 [fecha de consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en:

28) GUTBERLLET, R. & CAMPBELL, J. Generic Recognition for a Neglected Lineage of South American Pitvipers (Squamata: Viperidae: Crotalinae), with the Description of a New Species from the Colombian Chocó. American Museum Novitates [en línea]. 2001, **3316**(1), 1-16, [fecha de consulta: 14 diciembre 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/281151597_Generic_recognition_for_a_neglected_lineage_of_South_American_pitvipers_Squamata_Viperidae_Crotalinae_with_the_description_of_a_new_species_from_the_Colombian_Choco

29) VACA, J. Biogeografía del Género Bothrocophias (Serpentes: Viperidae: Crotalinae), mediante Modelamientos de Nicho Ecológico [en línea]. Tesis (Licenciatura en Ciencias Biológicas y Ambientales). Quito: Universidad Central del Ecuador, 2012. [fecha de consulta: 14 de diciembre de 2023]. 134 pp. Disponible en http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/591

30) MACAS, M. Caracterización bioquímica y efectos del veneno de Bothrocophias microphthalmus en preparaciones neuromusculares [en línea]. Tesis (Ingeniera en Biotecnología). Tena: Universidad Regional Amazónica IKIAM, 2021. [fecha de consulta: 15 de diciembre de 2023]. Disponible en: http://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/549

31) CAMPBELL, J. y LAMAR, W. The Canadian Field-Naturalist [en línea]. Wilderness & Environmental Medicine, 2004 [fecha de consulta: 26 marzo 2024]. Disponible en: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1580/10806032(2005)16[e13a:BR]2.0.CO2

32) OCHOA, A. et al. Viperidae snakebites in Ecuador: A review of epidemiological and ecological aspects. Toxicon:X [en línea]. 2020, vol. 7 [fecha de consulta: 12 de diciembre de 2023]. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590171020300291

33) JORGENSON, P. & LEÓN, S. Catalogue of the Plants of Ecuador [en línea]. USA: Missouri Botanical Garden Press, 1999 [fecha de consulta: 22 diciembre 2023]. Disponible en:

34) ROYAL BOTANIC GARDENS KEW. Columnea villosissima MANSF. RBG. [en línea]. Londres, [s.a] [fecha de consulta: 09 diciembre 2023]. Disponible en:

35) VERDE, S., GARCÍA, S. y RIVAS C. Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En: C. RIVAS, et al. Investigación en plantas de importancia médica [en línea]. España: Universidad Autónoma de Nuevo

León, 2016, pp. 1-40 [fecha de consulta: 2 de enero de 2023]. Disponible en:

36) PANDEY, A. & TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry [en línea]. 2014, **2**(5), 115-119 [fecha de consulta: 2 de enero de 2023]. ISSN 2278-4136. Disponible en: https://www.phytojournal.com/archives/2014.v2.i5.255/concept-of-standardization-extraction-and-pre-phytochemical-screening-strategies-for-herbal-drug

37) GARCIA, A. et al. Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta Sapindus saponaria L que crece en Cuba. Revista bionatura. [en línea]. 2020, **5**(3), 1209-1214 [fecha de consulta: 04 enero 2024]. Disponible en:

38) KANCHERLA, N. et al. Preliminary Analysis of Phytoconstituents and Evaluation of Anthelminthic Property of Cayratia auriculata (In Vitro). Maedica [en línea]. 2019, **14**(4), 350-356 [fecha de consulta: 10 enero 2024]. Disponible en: doi:10.26574/maedica.2019.14.4.350

39) DAHANAYAKE, J., PERERA, P. & GALAPPATTY, P. Comparative Phytochemical Analysis and Antioxidant Activities of Tamalakyadi Decoction with Its Modified Dosage Forms. Evid Based Complement Alternat Med. [en línea]. 2019, vol. 2019, [fecha de consulta: 2 de enero de 2023]. Disponible en:

40) GARCÍA, E., FERNÁNDEZ, I. y FUENTES, A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. RIUNET [en línea]. 2015 [fecha de consulta: 2 febrero 2024]. Disponible en:

41) LUNA, S. et al. Compuestos polifenólicos, contenido mineral y tamizaje fitoquímico de extractos acuosos de Simira cordifolia obtenidos mediante ultrasonidos. Polo del Conocimiento [en línea]. 2023, **9**(1), 418-437. [fecha de consulta: 2 febrero 2024]. ISSN 2550-682X. Disponible en:

42) ARTEAGA, Y. et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from Ilex guayusa Loes leaves using response surface methodology. Heliyon [en línea]. 2020, **6**(1). [fecha de consulta: 2 de febrero de 2024]. Disponible en:

43) CHANG, J. Inhibición in vitro del efecto hemolítico del veneno de la serpiente mano de piedra (Atropoides mexicanus) causado por alcaloides de Sansevieria trifasciata y tradescantia spathacea [en línea]. Tesis (Licenciado en Bioquímica y Microbiología). Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala, 2017 [fecha de consulta: 2 enero 2023]. 73 pp. Disponible en:

44) AYRES, L. et al. Bothrops snake venoms and their isolated toxins, an L-amino acid oxidase and a serine protease, modulate human complement system pathways. Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases [en línea]. 2015, vol. 21. [fecha de consulta: 2 febrero 2024]. Disponible en:

45) GARCÍA, F. El mundo de los venenos y antivenenos. Elementos [en línea]. 2020, **31**(118), 3-8. [fecha de consulta: 2 febrero 2024]. ISSN 0187-9073. Disponible en: .

46) MORALES, O. Determinación de Metabolitos Secundarios en Hojas y Tallos de especies del género Columnea spp. (Gesneriaceae) utilizadas en la Medicina Tradicional, Corregimiento de Kankintu, Comarca Ngäbe Buglé, 2017-2019 [en línea]. Tesis (Maestría en Biología con especialización en biología vegetal). Panamá: Universidad Autónoma de Chiriquí, 2019 fecha de consulta: 29 enero 2023]. 122 pp. Disponible en:

47) BARRANCO, W. Especies vegetales de uso antiofídico en las estribaciones de la sierra nevada de Santa Marta: inventario etnobotánico y evaluación biológica [en línea]. Tesis (Magíster en Bosques y conservación ambiental). Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2010 [fecha de consulta: 29 enero 2023]. 45 pp. Disponible en:

48) HARO, J. y MORENO K. Caracterización fisicoquímica y toxicidad in vitro de la oleorresina de Copaifera reticulata "copaiba" [en línea]. Tesis (Química farmacéutica). Perú: Universidad del Perú, 2021 fecha de consulta: 29 enero 2023]. 119 pp. Disponible en:

49) PÉREZ, V. et al. Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (Citrus limetta risso) y determinación de su actividad antioxidante. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud [en línea]. 2013, **15**(3), 18-22. [fecha de consulta: 10 de febrero de 2024]. ISSN 1665-1456. Disponible en:

50) ORDOÑEZ, E. et al. Cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante en hojas, corteza, flores y fruto de dos variedades de guayaba (Psidium guajava l.). Investigación y Amazonía [en línea]. 2011, **1**(2): 48- 52. [fecha de consulta: 10 de febrero de 2024]. ISSN 2223-8492. Disponible en:

51) MORALES, A. Evaluación de la capacidad inhibitoria de la hialuronidasa del extracto hidroalcohólico de Piper umbellatum L. [en línea]. Tesis (Bioquímica Farmacéutica). Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2020 [fecha de consulta: 28 de febrero de 2024]. 85 pp. Disponible en:

52) ULESIA, M. Indicaciones y uso de la hialuronidasa en medicina estética. Medicina Estética [en línea]. 2014, **40**(3), 30-35 [fecha de consulta: 1 marzo de 2024]. Disponible en:

53) VALLEDOR, A. Envenenamientos por animales [en línea]. España: Ediciones Díaz Santos, S. A., 1994 [fecha de consulta: 5 marzo de 2024]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=gISwxQhBw0cC&oi=fnd&pg=PP21&dq=Envenenamientos+por+animales+animales+venenosos+y+urticantes+del+mundo&ots=Hk6US6TncA&sig=xqWABsQTOhOnNC_-fvb-FWulrmI&redir_esc=y#v=onepage&q=Envenenamientos%20por%20animales%20animales%20venenosos%20y%20urticantes%20del%20mundo&f=false