

Conference Paper

Actividad Inhibitoria De La Hialuronidasa Del Extracto Hidroalcohólico De *Piper Peltatum*

Hyaluronidase Inhibitor Activity in Hydroalcoholic Extracts of *Piper Peltatum*

G Pilco, D Vinueza, K Acosta, and A Torres

Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Panamericana Sur km 1 ½, CP 060155, Riobamba - Ecuador

Resumen

Ecuador se ubica en una zona geográfica privilegiada, presenta zonas climáticas bien definidas con características ambientales y geográficas únicas. Estas particularidades hacen que cada región posea sus propios ecosistemas, existiendo así muchas especies vegetales y animales sin investigar. La población hace uso de estos recursos para tratar diversas dolencias como por ejemplo, *Piper peltatum* utilizada en caso de mordedura de serpiente. El objetivo del estudio fue determinar si los extractos de esta especie presentaban efectos inhibitorios sobre la hialuronidasa, para lo cual se identificó los metabolitos secundarios presentes mediante el tamizaje fitoquímico, se cuantificó la cantidad de fenoles y flavonoides totales a través de métodos espectrofotométricos y se determinó el porcentaje de inhibición tanto sobre la hialuronidasa bovina como la hialuronidasa presente en el veneno de *Naja naja atra* y *Botrox atrox*. Se identificó en *P. peltatum* alcaloides con potencial actividad antimitótica, cumarinas, terpenos, compuestos fenólicos y flavonoides. La cantidad de fenoles totales fue de $14,49 \pm 1,2$ mg equivalente de ácido gálico/g extracto seco y $14,53 \pm 0,208$ mg equivalente de Quercetina/g extracto seco de flavonoides. Respecto a la actividad inhibitoria se concluyó que existe mayor inhibición sobre la hialuronidasa bovina, seguida del veneno de *Naja naja atra* y no de manera significativa sobre *B. atrox*.

Abstract: Ecuador is located in a privileged geographical area, it has strongly defined climatic zones with unique environmental and geographical characteristics. These particularities mean that each region has its own ecosystems, so many plant and animal species exist without investigating. The population makes use of these resources to treat various ailments such as *Piper peltatum* used in case of snakebite. The objective of the study was to determine if extracts of this species has inhibitory effects on hyaluronidase. The secondary metabolites present were identified by phytochemical screening, the amount of phenols and total flavonoids was quantified by spectrophotometric methods, as well as the determination of the inhibition of bovine, *Naja naja atra* venom and *Botrox atrox* hyaluronidase. *P. peltatum* contains alkaloids with potential antimitotic activity, coumarins, terpenes, phenolic compounds

Corresponding Author:

G Pilco

gisel_apb@yahoo.es

Received: 10 January 2020

Accepted: 17 January 2020

Published: 26 January 2020

Publishing services provided by
Knowledge E

© G Pilco et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons](#)

[Attribution License](#), which

permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Selection and Peer-review under the responsibility of the VI Congreso Internacional Sectei 2019 Conference Committee.

OPEN ACCESS

and flavonoids. The amount of total phenols was 14.49 ± 1.2 mg gallic acid equivalent / g dry extract and 14.53 ± 0.208 mg Quercetin equivalent /g dry flavonoid extract. Regarding the inhibitory activity, it was concluded that there is greater inhibition on bovine hyaluronidase, followed by *Naja naja atra* venom and not significantly on *B. atrox*.

Palabras claves: *Piper peltatum*, hialuronidasa, *Naja naja atra*, Extracto, *Bothrops atrox*.

Keywords: *Piper peltatum*, hialuronidase, *Naja naja atra*, extract, *Bothrops atrox*.

1. Introducción

A pesar de su limitada extensión territorial, Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad del mundo. El país se ubica en una zona geográfica privilegiada, presenta 4 zonas climáticas bien definidas con características ambientales y geográficas únicas. Estas particularidades hacen que cada región posea sus propios ecosistemas (1). Ecuador posee un 10% de todas las especies de plantas, el 18% de todas las aves y el 8% del total de especies animales que existen en el planeta. De estos últimos, 3800 especies de vertebrados se han identificado (2).

La fauna ofídica es prevalente en ciertas zonas del país como Manabí y Morona Santiago siendo éstas las dos provincias con un mayor reporte de accidentes ofídicos (3). De los casos reportados, un gran porcentaje termina en muerte, y no sólo en el Ecuador sino en la mayoría de regiones rurales de las zonas tropicales del mundo (4,5). Esta elevada mortalidad se presenta a pesar de existir antídotos (inmunoglobulinas procedentes de caballos y ovejas inmunizados con veneno) con alta efectividad que neutralizan los componentes presentes en el veneno de serpiente (6,7).

Sin embargo, la eficacia de estas terapias está ampliamente restringida, ya que los antídotos solo sirven contra las especies de serpientes de las cuales se extrajo el veneno. Las limitaciones aumentan aún más debido a la variabilidad en la composición química de los venenos incluyendo la inter e intra especificidad taxonómica e incluso por la ontogenia (8--11). A esto debe sumarse, la debilidad de los sistemas de salud, los pocos países productores y sobre todo el costo que conlleva su elaboración (12).

En la mordedura de serpiente están involucrados un sinnúmero de procesos enzimáticos, debido a la composición química del veneno, que contiene enzimas de carácter

proteolítico como: hialuronidasas, fosfolipasas A2, peptidohidrolasas, fosfodiesterasas y L- amino oxidasas, las cuales una vez inoculadas lesionan los diferentes tejidos (13).

Gonzáles y otros purificaron y caracterizaron una proteína presente en el veneno de *Bothrops atrox* (especie común en el Ecuador) la enzima presentaba actividad de hialuronidasa. Dicha enzima se sometió a pruebas de estabilidad y se identificó que después de 150 horas a pH de 5.0 perdió el 60% de su efecto y se inactivó a una temperatura mayor a 40°C (14).

En Ecuador es frecuente que la población use más la medicina tradicional que la sintética, de todas las especies vegetales que se emplean, se encuentra la familia Piperaceae que incluye 14 géneros (15,16), siendo los más abundantes *Piper* y *Peperomia* con 700 y 600 especies, respectivamente (17,18). En el país se han reportado 4 géneros con 215 especies, 75 de ellas endémicas (19), éstas especies son ampliamente usadas en la medicina tradicional por sus efectos antibacterianos, antifúngicos y desinfectantes, además previenen el dolor de estómago, alivian los síntomas de la gastritis, gripe, reumatismo, tos, dolor de cabeza, problemas de piel y próstata (20--22).

Matico de monte (*Piper ecuadorensis*) es empleado en caso de resaca, como desinfectante y cicatrizante por las comunidades de las Provincias de Loja y Zamora. Los curanderos de la comunidad Saraguro lo usan en combinación con otras plantas para el tratamiento de "mal de aire" (23). Del extracto crudo y flavanones aislados de *P. ecuadorensis* se comprobó su eficacia contra *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*. La concentración mínima inhibitoria (the minimum inhibitory concentration MIC por sus siglas en inglés), definida como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe un crecimiento visible después de la incubación (24), fue de 31.25 µg/mL para *T. mentagrophytes*, de 62.5 µg/mL para *T. rubrum*, y 125 µg/mL de pinocembrin para ambos hongos. El pinostrobin no mostró actividad antifúngica (16).

Piper peltatum es una especie conocida en la Amazonía y Sierra Ecuatoriana como Santa María o cordoncillo. Las hojas de esta especie son empleadas como emolientes, analgésicas, antigripales, antiinflamatorias, antisépticas e incluso en rituales, así por ejemplo, en Esmeraldas las aplican en el cuerpo para calmar a los niños cuando hay luna llena. En el oriente la usan en combinación con otras especies para combatir la mordedura de serpientes, sin embargo el manejo de esta costumbre sin su comprobación científica podría complicar la situación del paciente acelerando el daño tisular y hasta favorecer una sepsis. Por otro lado, el uso de los extractos vegetales podría detener la actividad enzimática y otorgar el tiempo necesario para que los pacientes lleguen a los centros de atención primaria de salud. Por lo que el objetivo de la presente

investigación fue comprobar el efecto del extracto de *P. peltatum* sobre las enzimas que actúan en la mordedura de serpientes.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Hojas de *Piper peltatum* recolectadas en Ecuador, provincia de Sucumbíos, cantón Shushufindi. Coordenadas 0°10'55.9"S 76 °41'23.5"W

2.1.1. Tamizaje fitoquímico

30 g de hojas secas y pulverizadas se sometieron a extracciones sucesivas con: éter etílico, alcohol y agua. A las soluciones obtenidas se añadió los reactivos de Dragendorff, Mayer, Wagner, Baljet, Borntrager, Liebermann -- Buchard, Fehling, se realizó además la prueba de catequinas y resinas, para la identificación de los diferentes metabolitos secundarios.

2.1.2. Extracto hidroalcohólico

Se maceró 20 g de material vegetal seco y molido en etanol 50% v/v por 48 horas se sometió a reflujo durante 2 horas. A continuación, el filtrado fue concentrado.

2.1.3. Cuantificación de fenoles totales mediante el reactivo de Folin Ciocalteu

Se usó soluciones de ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L como estándar. 250 µL de las muestras y el estándar fueron tomadas y diluidas en 15 mL de agua destilada, a los que se añadió 1.25 mL del reactivo de Folin -- Ciocalteu. Se mezcló y se dejó en reposo durante 8 minutos en un ambiente cubierto de luz, luego de este periodo se agregó 3.75 mL de solución de carbonato de sodio al 7.5%, se aforó a un volumen de 25 mL, se mezcló nuevamente y se dejó en reposo por 2 horas. Se registró la absorbancia a 765 nm, y los datos de absorbancia de la muestra se interpolaron en la curva de calibración de ácido gálico (concentración vs absorbancia). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramos de extracto seco (25)

2.1.4. Cuantificación de flavonoides totales mediante método colorimétrico con AlCl_3

Quercetina se usó como estándar a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L. Se tomó 1 mL de la muestra, se añadieron 4 mL de agua destilada, se agregó 300 μL de nitrito de sodio al 5%, después de 5 min se añadió 300 μL de tricloruro de Aluminio al 10%, se esperaron 5 min y se agregaron 2 mL de hidróxido de sodio 1 M, se mezcló y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente protegido de la luz. La absorbancia de la mezcla fue registrada a 510 nm, se realizó el mismo procedimiento y se trazó la curva de concentración vs absorbancia (26)

2.2. Inhibición de hialuronidasa

2.2.1. Inhibición de la hialuronidasa bovina

Este método permite determinar mediante espectrofotometría la cantidad liberada de N-acetilglucosamina derivada de la degradación del hialuronato de sodio (27)(28)(29). 50 μL de hialuronidasa bovina se disolvieron en buffer acetato de sodio 0.1 M (pH 3.6). Se añadió 50 μL de dimetilsulfóxido al 5% (DMSO) a las diferentes concentraciones del extracto (6.25, 12.5, 25, 50, 250 y 1000 mg/m) a continuación fueron incubadas a 37°C durante 20 min. El DMSO al 5% fue usado como grupo control. Posteriormente, se agregaron 50 μL de cloruro de calcio a una concentración de 12.5 mM necesario para activar la enzima, se incubó a 37 °C por 20 min adicionales. La reacción inició al añadir 250 μL de hialuronato de sodio 1.2 mg/mL, se incubó la mezcla por 40 min a la misma temperatura. Se agregó 50 μL de NaOH 0.4 M y 100 μL de K_3BO_3 0.2 M, la mezcla se colocó a un baño de agua hirviendo por 3 min. Se dejó enfriar y se añadieron 1.5 mL de p-dimetilaminobenzaldehído, nuevamente se incubó hasta que desarrolló color (30,31). En un espectrofotómetro se midió la absorbancia a 585 nm, el resultado fue expresado como porcentaje de inhibición (27) siguiendo la fórmula (1):

$$\% \text{ de Inhibicin} = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

Ac= absorbancia del control

As= absorbancia de la muestra a diferentes concentraciones

2.2.2. Inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja atra* y *Bothrops atrox*

Se disolvió 100 µg de veneno en 20 µL de solución salina, la mezcla se incubó a 37 °C con 50 µg de ácido hialurónico disuelto en 250 µL de buffer acetato de sodio 0.2 M (pH 5.0) que simultáneamente contenía NaCl 0.15 N. Se midió la absorbancia a 585 nm y se aplicó la fórmula anterior (1) (31--33).

2.3. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el test de Fisher y posteriormente se aplicó el test de Tukey.

3. Resultados y discusión

Fueron pocos los metabolitos secundarios identificados en *Piper peltatum* mediante el tamizaje fitoquímico, los cuales variaron en dependencia del solvente en el cual se encontraba la muestra. La presencia de alcaloides se determinó en el extracto acuoso y alcohólico coincidiendo con varios estudios en donde mencionan que el principal componente de las especies de Piper es el alcaloide piperina (34). Siendo las semillas el lugar de mayor concentración de estos compuestos. La zona geográfica donde crecen y se desarrollan las especies hace fluctuar el contenido de piperina (35). Se identificó de igual forma terpenos a través del ensayo de Lieberman- Burchard tanto en el extracto alcohólico y etéreo y cumarinas únicamente en el extracto alcohólico. Además de compuestos fenólicos y flavonoides. Resultados que coinciden con los obtenidos por Parma que indica la presencia de neolignanós y lignanos, alcaloides, terpenos y propenilfenoles aislados a partir del extracto clorofórmico de *P. betle*, los últimos presentan actividad fungicida y nematocida (36).

De los compuestos identificados en *P. peltatum*, los alcaloides presentan una variedad de efectos ejercen sobre otros organismos. Por ejemplo, la creencia más extendida de la función de los alcaloides es que actúan como venenos o repelentes hacia los depredadores, parásitos y competidores (37), pero no solo eso, actualmente, son usados como poderosos analgésicos, antiespasmódicos, inmunomoduladores etc. El extracto alcohólico de las frutas de *P. longum* y su componente la piperina fueron estudiados por su actividad antitumoral e inmunomoduladora, el extracto resultó ser 100% tóxico a concentraciones de 500 µg/mL en el linfoma de Dalton (DLA) y en

concentraciones de 250 µg/mL frente a las células del carcinoma de Ehrlich (EAC) (38).

El primer alcaloide aislado de las especies de Piper fue la piperina, el cual actúa como: depresor del sistema nervioso central, antipirético, analgésico y antiinflamatorio (36). Miyakado y otros aíslan la pipericida de *P. nigrum*, responsable del efecto insecticida, larvicida, además de obtener el (2E,8E)-N-9-(3,4-Metilenedioxifenil) nonadienoilpiperidina con efecto dilatador sobre el corazón de conejos (36,39).

El contenido de fenoles totales de *Piper peltatum* fue de 14.49 mg GAE/g extracto seco. No existen investigaciones relacionadas a esta especie. No obstante, estudios realizados en especies de la Familia Geraniaceae reportaron valores de aproximadamente 109.8 mg GAE/g extracto y de 84.1 mg GAE/g extracto, según la parte usada de la especie vegetal en el extracto metanólico, mientras que en el extracto acuoso cantidades de 60.76 mg GAE/g extracto (40). En especies de la Familia Myrtaceae, se obtuvo un valor de 45.63 mg GAE/g extracto (41). Por lo que se puede decir, que la cantidad de fenoles no es representativa en la familia Piperaceae.

Para la cuantificación de flavonoides mediante el método colorimétrico, se usó una curva de calibración con estándar de quercetina, se obtuvo en las hojas 14.53 ± 2 mg QE/g extracto, de igual forma especies de la familia Geraniaceae presentan valores entre 71.2 - 78.4 mg QE/g extracto según la parte usada (40); mientras que en *Myrcianthes hallii* perteneciente a la familia Myrtaceae el valor obtenido de flavonoides fue de 11.64 mg QE/g extracto (41). Una mayor cantidad de flavonoides que de compuestos fenólicos puede deberse al método usado, que es muy susceptible. La presencia de dobles enlaces entre el C2 y C3 de los flavonoides, grupos OH no sustituidos en el C5, C7 o C4' y grupo cetona en el C4 aumentan el efecto inhibitor sobre la hialuronidasa bovina (42).

Como se observa en la Tabla No 1, a la concentración de 250 mg/mL de extracto de *P. peltatum* se obtuvo un porcentaje de inhibición de hialuronidasa bovina de 81.14%, mientras a una concentración de 6.25 mg/mL presentó un 72.78%, y a la concentración más alta de 1000 mg/mL se obtuvo un 69.75%. Comparando con otras investigaciones realizadas en *Pelargonium x domesticum* se obtuvo un porcentaje de inhibición de 90.89% a concentraciones de 0.625 mg/mL (31). En este caso resulta que *P.peltatum* es un inhibidor menos potente que *P. domesticum*. Además, se observa que la relación no es inversamente proporcional entre la concentración del extracto y el efecto inhibitorio como en otros casos, posiblemente debido a que en la familia Piperaceae hay mayor contenido de alcaloides y no de compuestos fenólicos.

De la misma manera en la tabla No 1, se observa los resultados obtenidos de la inhibición de la hialuronidasa en los venenos de *Bothrops atrox* y *Naja naja atra*, evidenciando que a mayores concentraciones existe un menor efecto inhibitorio. Siendo dos veces más el porcentaje de inhibición frente a *Naja atra* que frente a *B. atrox*. El extracto a una concentración de 6.25 mg/mL inhibe en un 40.17% a la hialuronidasa contenida en *Naja naja atra*, mientras que a ese mismo valor inhibe únicamente un 23.05% a la *Bothrox atrox*. Este resultado aparentemente bajo, podría deberse a que en la Amazonía, en caso de mordeduras de serpientes usan una combinación de plantas entre ellas *P. peltatum* para controlar e incluso detener el avance de las toxinas (43). Siendo la especie *B. atrox* la que se puede localizar en Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam, Guyana Francesa, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil (44). En este estudio se valoró el efecto inhibitorio de *P. peltatum* sólo y no en combinación con otras especies como lo utilizan en la Amazonía.

TABLE 1: Porcentaje de inhibición de los extractos a diferentes concentraciones de *P. peltatum* sobre las diferentes hialuronidasas

Hojas	Concentración (mg/mL)	Porcentaje de Inhibición		
		Bovina	<i>Bothrops atrox</i>	<i>Naja naja atra</i>
	1000	69,75	4,69	14,59
	250	81,14	17,18	30,12
	50	79,62	23,53	35,05
	25	77,72	23,80	37,12
	12,50	74,05	24,07	37,92
	6,25	72,78	23,05	40,17

Pithayanuku y otros en el 2005, analizan extractos acuosos de polifenoles vegetales (*Pentace burmanica*, *Pithecellobium dulce*, *Areca catechu* y *Quercus infectoria*) para determinar sus actividades inhibitorias contra el veneno de *Naja kaouthia* (NK) mediante el método de neutralización *in vitro*. Los tres primeros extractos inhiben completamente la letalidad del veneno a una concentración de 4 LD50 y la actividad necrotizante del veneno a la dosis necrotizante mínima, además que también inhibe hasta el 90% de la actividad de acetilcolinesterasa del veneno NK a concentraciones de taninos mucho más bajas que la de *Quercus.infectoria*. La DE50 de los taninos que inhibe las actividades del veneno NK varía según los taninos condensados y su contenido en los extractos. Al parecer puede existir un acoplamiento molecular de los complejos entre α -cobratoxina y los taninos hidrolizables o condensados en sus configuraciones energéticas más bajas. Se plantea que estos polifenoles podrían actuar bloqueando de

manera selectiva el receptor nicotínico de acetilcolina y no precipitando las proteínas del veneno (45). Con estos resultados se define nuevamente que los compuestos fenólicos son los responsables del efecto inhibitorio.

En función del tiempo, los extractos alcanzaron el máximo efecto inhibitorio entre los 180 segundos en *B. atrox*, y 200 segundos frente a *Naja naja atra*, mientras que *Pelargonium x domesticum* a una concentración de 0.625 mg/mL alcanzó el mayor valor inhibitorio a los 150 segundos sobre la hialuronidasa de veneno de cobra. Todos los datos tienden a disminuir una vez que alcanzan los máximos efectos inhibitorios (31). Los taninos condensados son los que mayor efecto inhibitorio poseen, seguido de luteolina, apigenina y kaempferol (46)

Del análisis estadístico se concluye que los valores obtenidos de la inhibición de la hialuronidasa en el veneno de *Naja naja atra* difieren significativamente de los valores obtenidos en *B. atrox*. Señalando que los extractos de *P. peltatum* actúan de forma importante sobre la hialuronidasa bovina y la *Naja naja atra*

4. Conclusiones

1. *Piper peltatum* conocida también como Santa María o Cordoncillo presenta entre sus metabolitos secundarios a los alcaloides, los cuales son responsables de una variedad de efectos que van desde la analgesia a la estimulación o depresión del Sistema Nervioso Central pero sobre todo son reconocidos por actuar como venenos o repelentes hacia los depredadores, parásitos y competidores. En el caso de la Familia Piperaceae la piperina es el alcaloide característico de este grupo de especies vegetales y actualmente es estudiado por su potencial anti-inflamatorio.
2. Además se logró identificar y cuantificar los compuestos fenólicos representados como fenoles totales y flavonoides ($14,49 \pm 1,2$ mg equivalente de ácido gálico/g extracto seco y $14,53 \pm 0,208$ mg equivalente de Quercetina/g extracto seco de flavonoides respectivamente) en *P. peltatum*. Al comparar éstos valores con los presentados por otras especies del país, la cantidad de fenoles totales en *P. peltatum* es relativamente bajo. Por lo que probablemente su efectividad contra heridas y cortes se deba a la combinación de metabolitos y no a una fracción aislada.
3. En la Amazonía *P. peltatum* es usado en combinación con otras plantas para contrarrestar las reacciones bioquímicas que se producen en la mordida de serpiente,

en esta investigación se concluye que *P. peltatum* no es el responsable de esa inhibición debido a que según revisión bibliográfica los metabolitos responsables de tal efecto son principalmente los compuestos fenólicos. *P. peltatum* en combinación con otras especies probablemente ejerza un efecto sinérgico más no es el responsable del efecto individual. El porcentaje de inhibición de la hialuronidasa bovina es relativamente alto, por lo que *P. peltatum* puede ser usado con fines cosméticos con el fin de evitar el envejecimiento.

Agradecimientos

Se agradece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por las facilidades brindadas para realizar esta investigación. Especialmente a la Facultad de Ciencias.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

References

- [1] Bravo E. La biodiversidad en el Ecuador [Internet]. 2014. Available from: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6788/1/LaBiodiversidad.pdf>
- [2] Ecuador E del. Flora y Fauna [Internet]. Available from: <http://www.embassyecuador.eu/site/index.php/es/turismo-inf-general-2/turismo-flora-fauna#>
- [3] MSP. Gaceta epidemiológica semanal [Internet]. 2017. Available from: <http://www.salud.gov.ec/wp-content/uploads/2013/02/Gaceta-General-SE50.pdf>
- [4] Kasturiratne A. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med*. 2008;5(11):218.
- [5] Harrison R, Hargreaves A, Wagstaff S, Faragher B, Lalloo D. Snake envenoming: A disease of poverty. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(12):569.
- [6] Abubakar I, Group N-UES. Randomised controlled double-blind non-inferiority trial of two antivenoms for saw-scaled or carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming in Nigeria. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7):767.
- [7] Williams D. Ending the drought: New strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. *J Proteomics*. 2011;74(9):1735--67.
- [8] Chippaux J, Williams V, White J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 1991;29(11):1279--303.

- [9] Durban J. Profiling the venom gland transcriptomes of Costa Rican snakes by 454 pyrosequencing. *BMC Genomics*. 2011;12:259.
- [10] Durban J. Integrated "omics" profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. *BMC Genomics*. 2013;14:234.
- [11] Gibbs H, Sanz L, Sovic M, Calvete J. Phylogeny-based comparative analysis of venom proteome variation in a clade of rattlesnakes (*Sistrurus* sp.). *PLoS One*. 2013;8(6):67220.
- [12] Salud OM de la. Morderduras de serpientes venenosas [Internet]. Notas descriptivas. 2018. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
- [13] Zúñiga I, Lozano J. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México. *Evid médica e Investig en salud*. 2013;6(4):125--36.
- [14] González É, Ortiz C, Sandoval G, Lazo F, Delgadillo J, Rodríguez E, et al. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UN FACTOR DE DIFUSIÓN PRESENTE EN EL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops atrox* (JERGON). *Rev Soc Quím Perú*. 2013;79(1):3--12.
- [15] Mabberley D. *The Plant-book. A Portable Dictionary of the Higher Plants*. New York: Cambridge University Press; 1997.
- [16] Ramirez J, Cartuche L, Morocho V, Aguilar S, Malagon O. Antifungal activity of raw extract and fl avanons isolated from *Piper ecuadorensis* from Ecuador. *Rev Bras Farmacogn*. 2013;23(2):370--3.
- [17] Joly A. *Botânica: Introdução a Taxonomía vegetal*. São Paulo: Companhia Editora Nacional; 1991.
- [18] López A, Sheng D, Towers N. Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaefolium*. *J Nat Prod*. 2002;65:62--4.
- [19] Jorgensen PM, León-Yáñez S. *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. USA: Missouri Botanical Garden Press; 1999. 779-783 p.
- [20] Terreaux C, Gupta M, Hostettman K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry*. 1998;38:350--3.
- [21] Dyer L, Richards J, Dodson C. Isolation, synthesis, and evolutionary ecology of Piper amides. In: *Piper: A model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2004. p. 117--39.
- [22] Tene V, Malagón O, Vita Finzi P, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. *J Ethnopharmacol*. 2006;111:63--81.

- [23] Andrade M, Armijos C, Malagón O, Lucero H. Plantas medicinales silvestres empleadas por la etnia Saraguro en la Parroquia San Lucas, Provincia de Loja-Ecuador. Loja: Editorial UTPL; 2009.
- [24] Andrews J. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(1):5--16.
- [25] Rover MR, Brown RC. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *J Anal Appl Pyrolysis.* 2013;104:366--71.
- [26] Raj K. Evaluation of anti-oxidant activities and total phenol and flavonoid content of the hydro- alcoholic extracts of *Rhodiola* sp. *Pharmacogn J.* 2010;2(11):431--5.
- [27] Ipek Süntar, Ibrahim Tumen, Osman Ustün, Hikmet Keleş EKA. Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of *Pinus* species by in vivo and in vitro experimental models. *J Ethnopharmacol.* 2011;139(2):533-- 540.
- [28] Lee, K.K. Choi JD. The effects of *Areca catechu* L. extracts on anti ageing. *Int J Cosmet Sci.* 1999;21:285--294.
- [29] Sahasrabudhe A, Deodhar M. Anti-hyaluronidase, anti-elastase activity of *Garcinia indica*. *Int J Bot.* 2010;299--303.
- [30] Ratnasooriya WD, Abeysekera WP. KM, Ratnasooriya CTD. In vitro anti-hyaluronidase activity of Sri Lankan low grown orthodox orange pekoe grade black tea (*Camellia sinensis* L.). *Asian Pac J Trop Biomed [Internet].* 2014;4(12):959--63. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115301118>
- [31] Pilco G, Vinueza D, Acosta K, Sánchez S, Abdo S. Actividad inhibitoria del extracto de geranio (*Pelargonium x domesticum*) sobre hialuronidasa. In: Libro de memorias V Congreso Internacional de la Ciencia, Tecnología, emprendimiento e innovación. Riobamba; 2018. p. 821--30.
- [32] Wu SJ, Ng LT. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *LWT - Food Sci Technol.* 2008;41:323--30.
- [33] Boukhris M, Simmonds MSJ, Sayadi S, Bouaziz M. Chemical Composition and Biological Activities of Polar Extracts and Essential Oil of Rose-scented Geranium, *Pelargonium graveolens*. 2013;1213(April 2012):1206--13.
- [34] Scott IM, Jensen ÆHR, Philoge BJR, Arnason ÆJT. A review of *Piper* spp. (*Piperaceae*) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. 2008;65--75.
- [35] Semler U, Gross G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. *Phytochemistry.* 1988;27:1566--7.

- [36] Parmar V et al. Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*. 1997;46(4):597--673.
- [37] Robinson T. *Metabolism and Function of Alkaloids in Plants* Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/1738505> Linked references are available on JSTOR for this article: *Metabolism and Function of Alkaloids in Plants*. 2016;184(4135):430--5.
- [38] Sunila E., Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. *J Ethnopharmacol*. 2004;90(2--3):339--46.
- [39] Oizumi Y, Kajiwara A, Shoji N, Takemoto T. *Chemical Abstracts*. 1988. P68970 p.
- [40] Boukhris M, Simmonds MSJ, Sayadi S, Bouaziz M. Chemical Composition and Biological Activities of Polar Extracts and Essential Oil of Rose-scented Geranium, *Pelargonium graveolens*. *Phyther Res*. 2013;27:1206--13.
- [41] Mirallas G. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE YANTIINFLAMATORIA in vitro DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE HOJAS DE *Myrcianthes hallii*. ESPOCH; 2018.
- [42] Kuppusamy U., Das N. Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. *Experientia*. 1991;47:13--7.
- [43] Torres A. COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDRO- ALCOHÓLICO DE *Piper peltatum* SOBRE HIALURONIDASA. 2018.
- [44] McDiarmid R, Campbell J, Touré T. *Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Herpetologists' League; 1999. 511 p.
- [45] Pithayanukul P, Ruenraroengsak, Pakatip. Bavovada R, Pakmanee N, Suttisri R, Saen-oon S. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols. *J Ethnopharmacol*. 2005;97(3):527--33.
- [46] Kuppusamy UR, Khoo HE, Das N. Structure - activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochem Pharmacol*. 1990;40(2):397--401.