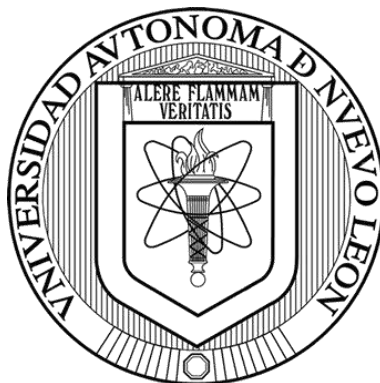


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD ANTIUROLÍTICA, CAPACIDAD DE CAPTURA DE  
RADICALES LIBRES Y TOXICIDAD DEL EXTRACTO  
METANÓLICO DE *Berberis trifoliata*.

Por

QBP RAYMUNDO ALEJANDRO PÉREZ HERNÁNDEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Acentuación  
en Química de Productos Naturales

Agosto 2017

ACTIVIDAD ANTIUROLÍTICA, CAPACIDAD DE CAPTURA DE  
RADICALES LIBRES Y TOXICIDAD DEL EXTRACTO  
METANÓLICO DE *Berberis trifoliata*.

Comité de tesis

---

Dra. Catalina Rivas Morales  
Presidente

---

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna  
Secretario

---

Dr. Eduardo Sánchez García  
Vocal

---

Dra. Catalina Leos Rivas  
Vocal

---

Dr. Moisés Armides Franco Molina  
Vocal

---

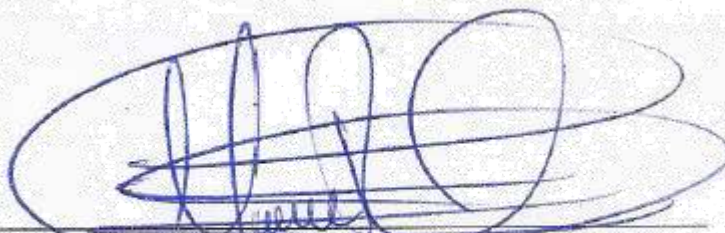
ACTIVIDAD ANTIUROLÍTICA, CAPACIDAD DE CAPTURA DE  
RADICALES LIBRES Y TOXICIDAD DEL EXTRACTO  
METANÓLICO DE *Berberis trifoliata*.

Dirección de Tesis



---

Dra. Catalina Rivas Morales  
Directora



---

Dra. María Luisa Ramos Ibarra  
Directora externa

*“EL SEÑOR ES MI ESCUDO Y FORTALEZA, QUIEN SOSTIENE MI CABEZA EN ALTO, EN QUIEN CONFÍA MI CORAZÓN”*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis amados padres Sra. Francisca Hernández Moreno y Mayor Raymundo Pérez Gaytán, así como a todos y cada uno de los integrantes de mi querida y apreciada familia les agradezco infinitamente su apoyo, muy en especial a mi hermano Sergio Joel quien ha sido y seguirá siendo un ejemplo a seguir.

A quienes contribuyeron a la realización del presente trabajo: mi mentora Dra. Catalina Rivas Morales, Dra. Catalina Leos Rivas, Dr. Moisés Armides Franco Molina, Dra. María Luisa Ramos Ibarra y en especial a la MEC Silvia Guadalupe Treviño, Dr. Eduardo Sánchez García, Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna y MVZ Gilberto Arévalo Martínez.

Amigos y compañeros tanto de la comunidad estudiantil como de la planta docente y administrativa de la Facultad de Ciencias Biológicas

Gracias bendito Dios al guiarme por la senda en la que voy, iluminándola con tu amor y protección, brindándome la oportunidad de disfrutar un logro más en la vida.

Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo otorgado por medio del proyecto PAICyT No. CN359-15.

Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Departamento de Química, Laboratorio de Química Analítica y Facultad de Medicina, UANL, Departamento de Fisiología, Bioterio.

Universidad de Guadalajara, Departamento de Salud Pública, División Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado mediante el programa de Becas para Estudios de Posgrado con número (CVU/Becario) 472592/280258.

## **DEDICATORIA**

En memoria del Capitán Roberto Solís Castro.

# ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	3
2.1.-Urolitiasis	3
2.2.- Radicales libres	6
2.3.- Actividad antimicrobiana	8
2.4.- Ensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i>	9
2.5.- <i>Berberis trifoliata</i>	10
3.- DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	11
4.- HIPÓTESIS	12
5.- OBJETIVO DEL TRABAJO	13
6.- OBJETIVOS PARTICULARES	13
7.- MATERIAL Y MÉTODOS	14
7.1.- Material vegetal	14
7.2.- Obtención del extracto	15
7.3.- Actividad antiurolítica <i>in vitro</i>	16
7.4.- Capacidad de captura de radicales libres	17
7.5.- Actividad antimicrobiana	17
7.6.- Tamizaje Fitoquímico	19

7.7.- Ensayo de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	21
7.8.- Actividad antiurolítica <i>in vivo</i>	22
7.9.- Fraccionamiento del extracto	25
8.- RESULTADOS	27
8.1.- Identificación taxonómica	27
8.2.- Obtención del extracto	27
8.3.- Actividad antiurolítica <i>in vitro</i>	27
8.4.- Capacidad de captura de radicales libres	28
8.5.- Actividad antimicrobiana	30
8.6.- Tamizaje Fitoquímico	30
8.7.- Ensayo de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	31
8.8.- Actividad antiurolítica <i>in vivo</i>	32
8.9.- Fraccionamiento del extracto	34
9.- DISCUSIÓN	35
10.- CONCLUSIONES	47
11.- PERSPECTIVAS	47
12.- REFERENCIAS	48
13.- RESUMEN BIOGRÁFICO	63



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Resultados tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de <i>B. trifoliata</i>	31
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Sitio de colecta del material vegetal	14
Figura 2.- Obtención del extracto a partir del material vegetal	15
Figura 3.- Ensayo actividad antiurolítica <i>in vitro</i>	16
Figura 4.- Evaluación de la capacidad de captura de radicales libres	17
Figura 5.- Activación de las bacterias	18
Figura 6.- Evaluación actividad antimicrobiana	19
Figura 7.- Ensayo letalidad <i>Artemia salina</i>	22
Figura 8.- Evaluación actividad antiurolítica <i>in vivo</i> .	25
Figura 9.- Fraccionamiento del extracto	26
Figura 10.- Porcentaje de inhibición del extracto metanólico de <i>B. trifoliata</i> sobre la nucleación de cristales de oxalato de calcio	28
Figura 11.- Porcentaje de inhibición del citrato de potasio ( $C_6H_5K_3O_7$ ) sobre la nucleación de cristales de oxalato de calcio	28
Figura 12.- Capacidad de captura (%) de radical libre DPPH del extracto metanólico de <i>B. trifoliata</i>	29

Figura 13.- Capacidad de captura (%) de radical libre DPPH por parte de la vitamina "E"	29
Figura 14.- Concentración media efectiva (EC <sub>50</sub> ) del extracto metanólico de <i>B. trifoliata</i> y vitamina "E"	30
Figura 15.- Monitoreo por rayos x de la deposición de cristales alrededor del disco de zinc insertado en los animales de experimentación	33
Figura 16.- Discos de zinc extraídos de los animales de experimentación	33
Figura 17.- Estadística descriptiva (media ± error estándar) de la deposición de cristales sobre el disco de zinc	34

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

cm	Centímetros
Lat.	Latitud
N	Norte
°	Grados
'	Minutos
''	Segundos
Long	Longitud
O	Oeste
m	Metros
msnm	Metros sobre nivel del mar
g	Gramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
µm	Micrómetros
°C	Grados Celsius
min	Minutos
rpm	Revoluciones por minuto
DO	Densidad óptica
nm	Nanómetros

DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
EC <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
Lb	Libras
h	horas
UFC	Unidades formadoras de colonias
DFNH	Dinitrofenilhidrazina
EtOH	Etanol
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
NOM	Norma Oficial Mexicana
Kg	Kilogramo
<i>i.m</i>	Intramuscular
RF	Relación de frentes
UV	Ultravioleta
<i>v.o.</i>	Vía oral
<i>i.p</i>	Intraperitoneal
<i>i.m</i>	Intramuscular
EEM	Error Estándar de la Media

## RESUMEN

La urolitiasis es una condición caracterizada por la presencia de cálculos en el aparato urinario cuyo tratamiento disponible no es efectivo o presenta efectos secundarios adversos. Es un padecimiento en el cual existe el riesgo de desarrollar complicaciones importantes tales como infecciones urinarias en las que en algunos casos, el agente etiológico ha desarrollado mecanismos de resistencia en contra de antibióticos, dificultando su tratamiento. Por otra parte, diversos estudios sugieren que las reacciones que generan radicales libres juegan un papel muy importante como una de las causas de la urolitiasis. Las plantas medicinales contienen constituyentes químicos que pueden ofrecer un tratamiento alternativo efectivo y seguro frente a la urolitiasis, infecciones del tracto urinario y al estrés oxidativo. En el presente trabajo se evaluó la actividad antiurolítica, antimicrobiana, capacidad de captura de radicales libres, toxicidad y composición fitoquímica del extracto metanólico de *B. trifoliata*, utilizando técnicas tanto *in vitro* e *in vivo*. En cuanto a resultados, se obtuvo un rendimiento por parte del extracto de 5.40 % p/p; El extracto en estudio inhibió *in vitro*  $93 \pm 0.01$  % la nucleación de cristales a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , en tanto que *in vivo* redujo significativamente la formación de cálculos. Así mismo exhibió capacidad de captura de radicales libres con una  $\text{CE}_{50}$  de 12.84  $\mu\text{g/mL}$ ; no presentó actividad antimicrobiana frente a aislados clínicos responsables de infecciones en tracto urinario; referente a toxicidad presentó una  $\text{DL}_{50}$  de 925  $\mu\text{g/mL}$ . En consideración a su composición fitoquímica se determinó la presencia de compuestos y grupos funcionales tales como: carbohidratos, cumarinas, dobles enlaces, flavonoides, grupos carboxilo, sesquiterpenlactonas, alcaloides y taninos.

## ABSTRACT

Urolithiasis is a condition characterized by the presence of stones in the urinary tract whose treatment is ineffective or has adverse side effects. It is also a condition in which there is a risk of developing important complications such as urinary infections in which, in some cases, the etiological agent has developed mechanisms of resistance against antibiotics, making it difficult to treat. On the other hand, several studies suggest that the reactions that generate free radicals play a very important role as one of the causes of urolithiasis. Medicinal plants contain chemical constituents that can offer effective and safe alternative treatment against urolithiasis, urinary tract infections, and oxidative stress. In the present study the anti-lytic activity, antimicrobial, free radical capture capacity, toxicity, and phytochemical composition of the methanolic extract of *B. trifoliata* were evaluated, using both *in vitro* and *in vivo* techniques. In terms of results, a yield was obtained from the extract of 5.40% w/w; The extract under study inhibited *in vitro* 93 ± 0.01% crystal nucleation at a concentration of 1000 µg/mL, while *in vivo*, it significantly reduced the formation of calculi. It also exhibited free radical capture capacity with an EC<sub>50</sub> of 12.84 µg/mL; and did not present antimicrobial activity against clinical isolates responsible for infections in the urinary tract; -In terms of toxicity, it presented a LD<sub>50</sub> of 925 µg/mL. As regards its phytochemical composition, the presence of compounds and functional groups such as carbohydrates, coumarins, double bonds, flavonoids, carboxyl groups, sesquiterpenolactones, alkaloids and tannins was determined.

## 1.- INTRODUCCIÓN

La urolitiasis, también denominada litiasis renal o nefrolitiasis, es una condición caracterizada por la presencia de cálculos en el aparato urinario superior. La formación de un cálculo se debe a un nivel de sobresaturación de la concentración de los componentes de la orina en el que resulta imposible su solubilización (González, 2009).

La urolitiasis es el tercer padecimiento más común del tracto urinario, y debido a su magnitud representa un serio problema de salud pública. Este padecimiento afecta a la población dependiendo de la zona geográfica y de las condiciones socioeconómicas; en Asia el factor de riesgo a padecerlo va del 2-5 %, en Europa y América 8-15 % y en Medio Oriente alrededor de un 20 %. Se manifiesta habitualmente en forma de crisis reiteradas de cólico renal y genera un elevado número de consultas médicas y de ingresos hospitalarios, por lo tanto representa una gran repercusión económica y social. El riesgo promedio de formación de cálculos en la población oscila entre el 10-23% al año, 50 % en 5-10 años y 75% en 20 años. Con la posibilidad de desarrollar complicaciones importantes y frecuentes, como infección urinaria y sepsis, obstrucción urinaria y anuria, fracaso renal agudo o insuficiencia renal crónica (Khan *et al.*, 2011; Martínez, 2012).

El manejo quirúrgico de la urolitiasis incluye diversos procedimientos, los cuales causan diversos efectos secundarios, tales como: daño renal, disminución de la función renal, aumento en el índice de recurrencia en la formación de cálculos, aunado al riesgo de desarrollar una infección. A pesar de los grandes avances en el área de la medicina, no se dispone actualmente de algún fármaco eficaz para el tratamiento de los cálculos renales (Patel, *et al.*, 2012). Debido a los diversos factores involucrados en la patogénesis de la urolitiasis, se requieren agentes que posean actividades diversas tales como antiespasmódica, antioxidante y antiinflamatoria por mencionar algunas (Khan, *et al.*, 2012).

Diversos estudios sugieren que múltiples efectos en las reacciones fisiológicas generan radicales libres, los cuales juegan un papel importante en la formación de

cálculos renales. Bajo ciertas condiciones patológicas la formación de radicales libres se incrementa, disminuyendo las defensas antioxidantes de las células, lo que eventualmente da lugar a daño celular oxidativo (Ramasamy, 2002). La formación de cálculos renales puede ser la causa en el daño celular de la membrana, ya que de esta manera se facilita la fijación y acumulación de cristales, dando lugar a la formación del urolito (Grases, *et al.*, 1998).

Por otro lado, la litiasis renal favorece la incidencia de infecciones urinarias, ya que obstruye el flujo de la orina y por lo tanto favorece las condiciones para el crecimiento bacteriano (Zanetti, *et al.*, 2008).

Este tipo de infecciones del tracto urinario (ITU) son ocasionadas por microorganismos patógenos, de los cuales del 80% al 90% de estas infecciones son causadas por bacterias. En más del 95% de los casos, un microorganismo es el responsable de la ITU; el agente etiológico más frecuente es *Escherichia coli*, responsable del 75% a 80% de casos; el 20% a 25% restante incluye microorganismos tales como: *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella sp.*, *Streptococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Echeverria, *et al.*, 2006). Existen diversos microorganismos, entre ellos algunas bacterias que han desarrollado diferentes mecanismos de defensa en contra de los agentes antimicrobianos, lo que se conoce como resistencia, que dificulta el tratamiento de las infecciones del tracto urinario. Ésta resistencia ha contribuido a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos (Anjana, *et al.*, 2009).

Las plantas medicinales son una alternativa terapéutica al no causar o ser menores los efectos secundarios adversos comparado con algunos fármacos sintéticos, además de ser más accesibles para la población. Éstas contienen múltiples constituyentes químicos que pueden ofrecer un tratamiento efectivo y seguro tanto para la urolitiasis e infecciones del tracto urinario, aunado a esto algunas contienen concentraciones relevantes de metabolitos secundarios con actividad antioxidante que protegen al organismo del estrés oxidativo.



## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1.- Urolitiasis

La urolitiasis es una condición caracterizada por la presencia de cálculos en el aparato urinario superior, es consecuencia de complejos procesos fisicoquímicos que se resumen en tres etapas importantes denominadas nucleación, crecimiento y agregación (Atmani., 2000). La urolitiasis inicia con la formación de un cristal litiásico y el cual finalmente da como resultado la formación de un cálculo renal. Dicho cálculo se forma cuando la orina se encuentra sobresaturada con respecto a sus constituyentes cristalinos lo cual se puede presentar por una serie de factores entre los que se destacan la concentración, sobre excreción, alteración de la fuerza iónica de los solutos factibles a cristalizar y pH urinario (Patel, *et al.*, 2012).

La orina es una solución en la que existen sustancias tales como: sales de calcio, oxalato, ácido úrico, fosfato y cistina, dependiendo de su concentración, cada sustancia puede alcanzar diversas situaciones en cuanto a su saturación. Cuando las sustancias están en bajas concentraciones, la orina está infrasaturada; si la concentración de los componentes antes mencionados se incrementan progresivamente se alcanza un punto denominado sobresaturación urinaria (González, 2009). Ésta última da lugar a la formación de cristales debido a la combinación de los iones en solución lo cual propicia la formación de una fase sólida, proceso denominado nucleación, la cual puede ser de dos tipos: homogénea cuando los componentes del cristal se unen entre sí y heterogénea cuando la fijación y orientación de los componentes cristalinos se presenta sobre la superficie de otro cristal; posterior a éste proceso se lleva a cabo el crecimiento del cristal y finalmente agregación de otros cristales (Gamarra, *et al.*, 2003).

La litiasis urinaria es una enfermedad multifactorial cuya etiología implica aspectos epidemiológicos, raciales, geográficos y hereditarios. (Khan *et al.*, 2012). Las personas de raza blanca tienen mayor probabilidad de padecer litiasis renal, así como

cuando viven o laboran en climas cálidos. Según datos recientes, ésta enfermedad se incrementa por herencia hasta en un 45%. (González, 2009).

Este padecimiento ha afectado a la humanidad a lo largo de la historia (Gürocak, 2006). Se tiene registro de diversos hallazgos arqueológicos, como el papiro de Ebers, en los que se hace referencia al tratamiento de enfermedades del tracto urinario, incluyendo cólico renal y extracción de cálculos (Eknoyan, 2004).

Hipócrates en el siglo IV a.C fue el primer médico occidental en referir la dificultad para orinar que solía presentarse en varones de edad avanzada a causa de cálculos y abscesos renales, a lo que denominó mal de piedra (Gürocak, 2006). En 1901, el arqueólogo inglés E. Smith encontró una momia egipcia que data del año 4800 a.C con litiasis en vejiga urinaria (López, 2010).

La prevalencia de litiasis en el mundo contemporáneo varía de acuerdo a la localidad. Estudios epidemiológicos revelan que afecta principalmente a países desarrollados observándose un aumento significativo en la incidencia y prevalencia en los últimos años (Knoll, 2010; Patel, 2011). La franja etaria más afectada es de 20 a 40 años con un predominio mayor en hombres que en mujeres con 12 % y 6 % respectivamente. Su tasa recidiva es alta; a los 5 años de un primer episodio litiásico un 50% de los pacientes ha recaído; la mitad de los individuos sufrirán nueva crisis litiásica en un plazo inferior a 5 años, el 60 % a los 8 y a los 25 años la cifra puede ser del 90 % (Gürocak, 2006; Ramesh, 2012).

En México se han realizado pocos estudios epidemiológicos sobre la urolitiasis. Este padecimiento representa el 13 % de las hospitalizaciones por enfermedad renal en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Otra encuesta nacional efectuada en este mismo instituto reportó una prevalencia de 2.4 casos de urolitiasis por cada 10 000 habitantes derechohabientes de los estados de Yucatán, Puebla y Quintana Roo como áreas endémicas (Medina, *et al.*, 2002).

En la actualidad se disponen de técnicas para la extracción de cálculos renales tales como: la litotricia extracorpórea por ondas de choque, ureteroscopia para cálculo y nefrolitotomía percutánea, sin embargo, son procedimientos quirúrgicos que pueden tener diversos efectos secundarios (Ramesh, 2012), tales como: hipertensión, insuficiencia renal, hematuria, pancreatitis, infecciones y fragmentos residuales persistentes que pueden dar lugar a la formación de nuevos cálculos; por otra parte no existe un fármaco eficaz para el tratamiento de esta patología (Khan, 2011; Atmani, 2000).

A lo largo de la historia de la humanidad las plantas han sido utilizadas para el tratamiento de patologías diversas, algunas de ellas han demostrado ser eficaces para el tratamiento de la urolitiasis (Gürocak, 2006). Lo anterior es debido a que contienen metabolitos secundarios, que poseen diversas actividades biológicas que ayudan al tratamiento de la urolitiasis (Khan, *et al.*, 2011).

A este respecto, se realizó un estudio *in vitro* donde evaluaron la actividad antiurolítica del extracto etanólico de las semillas de *Celosia argentea*, el cual resultó ser efectivo, ya que inhibió la formación de precipitados de calcio y fosfato (Patel, *et al.*, 2011).

En otra investigación se evaluó la actividad antiurolítica del extracto acuoso y clorofórmico de *Sellaginella lepidophylla*, en donde los resultados sugieren que ambos extractos presentaron dicha actividad biológica (Estévez, 2009),

Ramesh, *et al.*, en el 2012, evaluaron *in vitro* la actividad antiurolítica de los extractos metanólicos de *Nymphaea odorata* y *Dolichos lablab*. En donde los resultados mostraron que *N. odorata* presentó mayor actividad comparada con *D. lablab* (Ramesh, *et al.*, 2012).

Por otra parte Khan, *et al.*, 2012, evaluaron el efecto antiurolítico de *Holarrhena antidysenterica* con técnicas *in vitro* e *in vivo* mediante las cuales se demostró que el extracto presentó actividad biológica significativa contra la formación de cálculos (Khan, *et al.*, 2012).

En otro estudio se determinó que el extracto crudo de *Origanum vulgare* presentó actividad antiurolítica tanto *in vivo* como *in vitro* (Khan, *et al.*, 2011),

Debido a lo anterior, en el presente trabajo de investigación se decidió evaluar la actividad antiurolítica de *Berberis trifoliata* tanto en un modelo *in vitro* así como *in vivo*, cabe mencionar que no se encontraron referencias científicas que sustenten dicha actividad, sin embargo, existen reportes en la medicina tradicional para el tratamiento de la litiasis.

## **2.2.- Radicales libres y antioxidantes**

Un radical libre es una especie química que contiene un electrón desapareado en su orbital más externo. A consecuencia de poseer tal configuración, presenta un alto grado de inestabilidad, confiriéndole reactividad oxidante para otras especies químicas que se encuentren cercanas las cuales reaccionan rápidamente con esta especie formando otros radicales libres por reacciones químicas en cadena (Emin, 2012; Maldonado, *et al.*, 2010).

El organismo en sus procesos fisiológicos, tales como: el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio produce radicales libres, o bien son generados por factores ambientales como la contaminación industrial, el tabaco, la radiación, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y los pesticidas (Grases, *et al.*, 1998).

Actualmente se aplica el término de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o que son fácilmente convertidos a radicales. Recientemente existen evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático. Sin embargo cuando las especies reactivas del oxígeno sobrepasan las defensas antioxidantes de la célula se produce estrés oxidativo (Gutierrez, 2006), éste puede ocasionar daño a estructuras celulares, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Valko, *et al.*, 2007). El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo al desarrollo de patologías diversas tales como:

aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas, cáncer y litiasis renal (Avello and Suwalsky, 2006).

A este respecto, un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar los radicales libres, mediante la liberación de electrones que son captados de manera natural por éstos evitando su acción nociva (Avello and Suwalski, 2006), pero en algunas situaciones como momentos de estrés, alimentación inadecuada, enfermedad o depresión, su producción es insuficiente por esto es recomendable el aporte exógeno de antioxidantes (Stevens, 2003).

La búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes, preferentemente de origen vegetal, que pueden disminuir o eliminar las reacciones de degradación oxidativa en sistemas biológicos ha ido en aumento en los últimos tiempos (Puertas, *et al.*, 2009).

Se han realizado numerosos estudios sobre plantas medicinales que demuestran que algunos componentes de éstas presentan actividad antioxidante y son capaces de ejercer efectos protectores contra el estrés oxidativo en los sistemas vivos (Cao, *et al.*, 1996). Por lo tanto, existe un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes de origen natural para prevenir el daño ocasionado por el estrés oxidativo producto de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Mosquera, *et al.*, 2007).

Una de las técnicas más utilizadas para evaluar la actividad antioxidante *in vitro* es la de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH); Almeida, *et al.*, (2009) evaluaron ésta capacidad del extracto acuoso de hojas de *Eucalyptus globulus* donde se menciona que el extracto presentó una notable capacidad de captura de radicales.

Otros investigadores, Pereira, *et al.*, (2007), utilizaron la misma técnica (DPPH) y realizaron un estudio para determinar la actividad antioxidante de las hojas de nogal, (*Junglans regia*), cultivados en Portugal presentando buena actividad antioxidante.

También por la técnica anterior, Topal, *et al.*, (2008), determinaron la actividad antioxidante de las plantas *Melissa officinalis L.*, *Rosmarinus officinalis L.*, *Cuminum cuminum L.*, *Piper nigrum L.*, *Lavandula stoechas spp.*, *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum L.*, *Thymus serpyllum* y *Liquidamber orientalis* Mill, de acuerdo a

los resultados obtenidos los aceites esenciales de *R. officinalis*, *Cuminum C.*, *P. anisum*, *serpyllum T.* y *L. orientalis* mostraron mayor capacidad de captura de radicales libres.

### **2.3.- Actividad antimicrobiana**

La infección del tracto urinario (ITU) es considerada generalmente como la existencia de microorganismos patógenos en el tracto urinario con o sin presencia de síntomas. En más del 95% de los casos, un único microorganismo es el responsable de la ITU. El agente etiológico más frecuente es *Escherichia coli*, Sin embargo, existen otros microorganismos que pueden verse involucrados en este padecimiento como: *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Serratia* y *Neisseria spp* (Amit, et al., 2012).

En los últimos años se ha descrito un aumento progresivo de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias causantes de ITU, fundamentalmente en *Escherichia coli* y otras bacterias Gram negativas (Vallano, et al., 2006).

La resistencia a antimicrobianos es un fenómeno por el cual un microorganismo deja de verse afectado por un compuesto al que anteriormente era sensible. Representa un problema de salud pública, que afecta al tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por una gran variedad de microorganismos, incluidas las bacterias. Actualmente se considera que el proceso de adquisición de resistencia es ocasionado por cambios en la permeabilidad y reorganización de la membrana, así como una respuesta a nivel genético, como mutaciones, transferencia horizontal de genes o activación de las respuestas de señalización celular como el quorum sensing y la formación de biopelículas (Martins, et al., 2013).

La resistencia a los antibióticos ha complicado el tratamiento de las infecciones del tracto urinario, por tal motivo ha incrementado la búsqueda de nuevas fuentes con actividad biológica frente a microorganismos patógenos. Las plantas medicinales

contienen una gran variedad de metabolitos secundarios que pueden ofrecer un tratamiento más efectivo y seguro (Bours, *et al.*, 2010).

Se han realizado múltiples estudios para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales; Gutiérrez, *et al.*, (1996), valoraron 31 extractos obtenidos de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana, de las cuales mostraron que 5 de los 31 extractos presentaron la actividad biológica.

Parsaeimehr, *et al.*, (2010), evaluaron la actividad bactericida de los extractos metanólicos de tres especies del género *Ephedra* contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus nigra*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*; de las cuales los 3 extractos poseen actividad bactericida.

Otros investigadores evaluaron esta misma actividad, Sharma, *et al.*, (2009), frente a patógenos responsables de infecciones del tracto urinario (ITU) de extractos acuosos, etanólicos y acetónicos de 15 plantas utilizadas en la medicina tradicional, los resultados mostraron que los extractos acetónicos y etanólicos de las 15 plantas presentaron actividad bactericida relevante frente a patógenos causantes de ITU.

#### **2.4.- Ensayo de toxicidad con *Artemia salina***

El uso de plantas como agentes terapéuticos es una práctica que ha ido en aumento entre la población. Lo anterior ha derivado en una gran cantidad de investigaciones científicas en las cuales se evalúa su actividad biológica, aportando evidencia del contenido de compuestos fitoquímicos con potencial terapéutico (Apu, *et al.*, 2010). Sin embargo, es necesario determinar los efectos tóxicos de dichos compuestos naturales (Nguta, *et al.*, 2012). La toxicidad indica los efectos adversos derivados de la interacción entre agentes tóxicos y las células. Es de suma importancia ya que se debe evitar el daño a órganos vitales tales como el hígado y riñón. El ensayo de letalidad de *Artemia salina* se considera útil para la evaluación preliminar de la toxicidad de extractos vegetales (Syahmi, *et al.*, 2010). *A. salina* es un crustáceo muy

sensible a un amplio rango de compuestos químicos con actividad biológica. Es un método que ha demostrado proporcionar una alternativa viable a bioensayos que involucra el uso de animales de experimentación, lo cual es costoso y está asociado con restricciones éticas. Además, es un método rápido, simple, reproducible y económico (Déciga, *et al.*, 2007).

### **2.5.- *Berberis trifoliata***

*B. trifoliata* pertenece a la familia de las berberidáceas, son arbustos densos de 1 a 4.5 m de altura con tronco amarillo, hojas rígidas alternadas de 3 a 5 cm de longitud, pinadas, usualmente dentadas a menudo con punta espinada. Posee flores amarillas y frutos rojos en forma de grano con pocas semillas. Se le conoce con diferentes nombres vulgares tales como agrito, agrillo y palo amarillo.

En la medicina tradicional se utiliza para el tratamiento de infecciones causadas por hongos y bacterias, sinusitis, faringitis estreptocócica, intoxicaciones por alimentos, giardiasis, amibiasis, psoriasis, inflamación hepática, fiebre, inflamación.

En cuanto a composición fitoquímica, los principales compuestos encontrados en especies del género *Berberis*, son alcaloides como la berberina y la berbamina, además se ha reportado la presencia de taninos, esteroides, triterpenos y compuestos fenólicos.

Se ha reportado capacidad de captura de radicales libres en plantas pertenecientes a la familia Berberidaceae atribuido a la presencia de pigmentos flavonoides denominados antocianinas. Por otra parte, existen reportes en los que se atribuye actividad antimicrobiana a extractos hidroalcohólicos de diversas plantas de la familia Berberidaceae (Agata, *et al.*, 2014; Li, *et al* 2007).



### **3.- DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

La litiasis urinaria es el tercer padecimiento más común del tracto urinario que constituye un problema de salud pública por su alta morbilidad, ocasionando un elevado número de consultas médicas e ingresos hospitalarios, con repercusión económica y social. Es un padecimiento en el cual existe el riesgo de desarrollar complicaciones importantes y frecuentes, como: obstrucción urinaria y anuria, fracaso renal agudo o insuficiencia renal crónica e infección urinaria. Ésta última generalmente ocasionada por bacterias que en algunas ocasiones han desarrollado mecanismos de defensa frente a los agentes antimicrobianos. Por otra parte, el tratamiento disponible para la litiasis urinaria no es efectivo o presenta efectos secundarios adversos; diversos estudios sugieren que bajo ciertas condiciones patológicas, la formación de radicales libres se incrementa confiriéndoles un papel muy importante en la formación de cálculos renales. Con base a lo anterior las plantas medicinales son una alternativa para el tratamiento de la urolitiasis y sus posibles complicaciones, ya que algunas de ellas contienen metabolitos secundarios con actividad antiurolítica, antioxidante y antimicrobiana.

#### **4.- HIPÓTESIS**

El extracto metanólico de *Berberis trifoliata* presenta actividad antiurolítica, antimicrobiana, capacidad de captura de radicales libres y no presenta toxicidad.

## **5.- OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antiurolítica, antimicrobiana y capacidad de captura de radicales libres del extracto metanólico de *Berberis trifoliata* mediante técnicas *in vitro* e *in vivo* e identificar parcialmente los principios activos.

## **6.- OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Obtener el extracto metanólico de *B. trifoliata* por maceración con agitación a temperatura ambiente.
- 2.- Evaluar la actividad antiurolítica, antimicrobiana y la capacidad de captura de radicales libres mediante técnicas *in vitro* del extracto metanólico crudo de la planta en estudio.
- 3.- Determinar la toxicidad del extracto obtenido sobre *Artemia salina*.
- 4.- Realizar un fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto metanólico de la planta en estudio.
- 5.- Evaluar la actividad antiurolítica, antimicrobiana y capacidad de captura de radicales libres mediante técnicas *in vitro* de las fracciones obtenidas del extracto de la planta en estudio.
- 6.- Evaluar la actividad antiurolítica en un modelo *in vivo* del extracto metanólico de *B. trifoliata* en un modelo animal en el que se inducirá la litiasis mediante inserción de cuerpo extraño en vejiga urinaria.
- 7.- Identificar parcialmente los componentes bioactivos mediante pruebas químicas.

## 7.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1.- Material vegetal

*Berberis trifoliata*

#### Clasificación taxonómica material vegetal

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

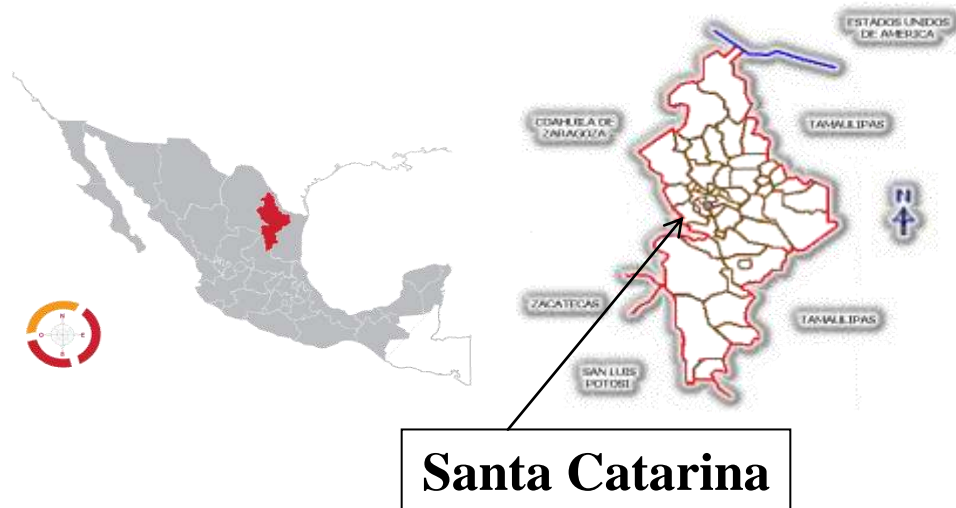
Orden: Ranunculales

Familia: Berberidaceae

Género: *Berberis*

Especie: *trifoliata*

#### Colecta del material vegetal



**Figura 1.-** Sitio de colecta del material vegetal.

El sitio de colecta del material vegetal (Figura 1) se llevó a cabo en la localidad de Casa Blanca ubicada en el municipio de Santa Catarina, Nuevo León. (25°39'08.23''

Lat. N, 100°42'40.14'' Long. O. 1169 msnm) en los meses de marzo y abril. Se depositó una muestra en el herbario de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Nuevo León, a cargo del Dr. Eduardo Estrada Castellón para identificación taxonómica y asignación de número de voucher.

## 7.2.- Obtención del extracto

En la figura 2 se describe el procedimiento para la obtención del extracto metanólico de *B. trifoliata*. Para lo cual, el material vegetal fue secado a temperatura ambiente y posteriormente triturado utilizando un molino para grano manual (Victoria). La extracción del material vegetal se llevó a cabo mediante maceración en frío con agitación constante durante 48 horas utilizando 71.5 g de planta y 300 mL de metanol como solvente primario de extracción. El extracto fue filtrado y concentrado mediante presión reducida en un rotavapor (Yamato Scientific CO. LTD. RE 200). Una vez eliminado el solvente en su totalidad, se procedió a obtener el rendimiento del extracto utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\% p/p)} = \frac{PE}{PI} \times 100$$

Donde:

*PE* = Peso obtenido después de la extracción

*PI* = Peso inicial del material vegetal a extraer

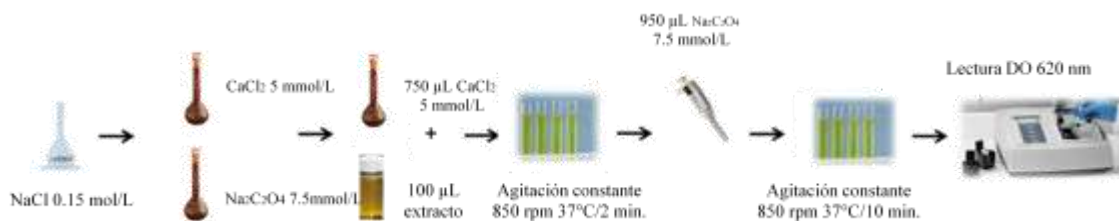


**Figura 2.-** Obtención del extracto a partir del material vegetal.

### 7.3.- Actividad antiurolítica *in vitro*

La capacidad inhibitoria del extracto sobre la nucleación de cristales de oxalato de calcio se determinó mediante un método espectrofotométrico (Figura 3) para lo cual se prepararon dos soluciones; una con cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich), a una concentración de 5 mM y otra de oxalato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) (Sigma-Aldrich), a una concentración de 7.5 mM, posteriormente fueron ajustadas a un pH de 6.5. Ambas soluciones fueron filtradas por triplicado, utilizando un filtro de membrana con tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore). El ensayo de inhibición de la nucleación de cristales de oxalato de calcio se llevó a cabo mezclando 1450  $\mu\text{L}$  de la solución de cloruro de calcio, con diferentes concentraciones (100-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) del extracto de *B. trifoliata*. Paralelo a esto se empleó citrato de potasio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7$ ) de 1000-4000  $\mu\text{g/mL}$ , (Sigma-Aldrich) el cual fue utilizado como control positivo. Una vez preparadas, las mezclas se mantuvieron a 37°C en agitación constante durante 10 min a 800 rpm utilizando barras magnéticas de 2 x 7 mm (Bel-Art), posteriormente se añadieron 1450  $\mu\text{L}$  de oxalato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) como agente precipitante, manteniendo las condiciones antes descritas. Por último se midió la densidad óptica (DO) a 620 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific Genesys 20). El porcentaje de inhibición de la nucleación fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

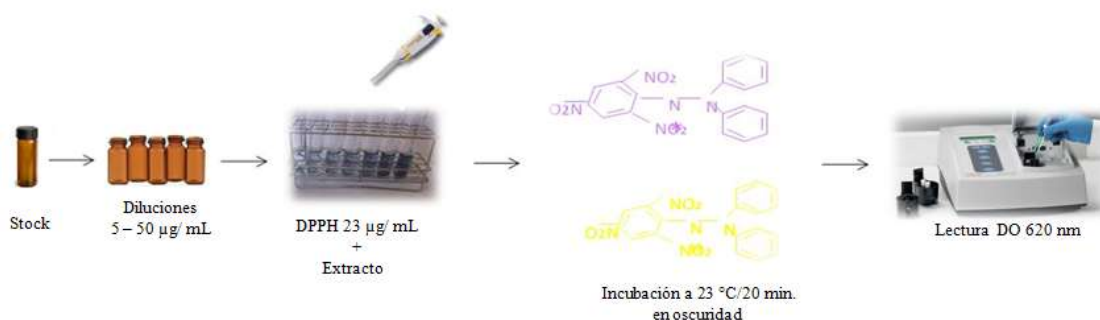
$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(1 - \frac{\text{DO}_{\text{muestra}}}{\text{DO}_{\text{control}}}\right) \times 100$$



**Figura 3.-** Ensayo actividad antiurolítica *in vitro*.

#### 7.4.- Capacidad de captura de radicales libres

La capacidad de captura de radicales libres se determinó utilizando el método del 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Figura 4). Para este ensayo, se vertieron 1900  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de una solución metanólica del reactivo DPPH (Sigma-Aldrich Chemistry), en tubos de ensayo de 12 x 75 mm, los cuales contenían 100  $\mu\text{L}$  del extracto a diferentes concentraciones (5-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o 100  $\mu\text{L}$  de una solución (5-25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de vitamina E (Sigma-Aldrich Chemistry), utilizada como control positivo. A continuación se procedió a incubar las muestras a temperatura ambiente durante 20 min en oscuridad, transcurrido el tiempo de incubación los cambios en la densidad óptica fueron monitoreados a 517 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific Genesys 20). La disminución en la densidad óptica de la mezcla de la reacción, indicó la capacidad de captura de radicales libres. Finalmente los resultados se expresaron como la concentración media efectiva ( $\text{EC}_{50}$ ) en la cual una muestra causa un decremento del 50% de la concentración inicial de DPPH.



**Figura 4.-** Evaluación de la capacidad de captura de radicales libres.

#### 7.5.- Actividad antimicrobiana

Se utilizaron aislados clínicos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, bacterias Gram negativas responsables de infecciones en tracto urinario. Las cepas bacterianas se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Química Analítica y Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Las cepas bacterianas fueron activadas en tubos de ensaye de 12 x 75 mm que contenían 3 mL de caldo de cultivo C. Rivas (patente No. 9810892), el medio fue preparado pesando 8.5 g por cada 100 mL de agua destilada y el pH fue ajustado a  $7.0 \pm 0.2$ , el medio se esterilizó bajo condiciones estándar (15 lb/15 min) para posteriormente ser sometido a prueba de esterilidad en una incubadora (Felisa) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 h (Figura 5).



**Figura 5.-** Activación de las bacterias.

La actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *B. trifoliata*, fue evaluada mediante el método de difusión del pozo en agar (Figura 6); para lo cual se tomaron  $100 \mu\text{L}$  de los cultivos previamente activados ( $1 \times 10^6$  UFC/mL en la escala de McFarland), los cuales fueron sembrados por extensión con la ayuda de un asa Drigalski. Posteriormente se realizaron pozos en el agar, de aproximadamente 5 mm de diámetro, utilizando un tubo de ensayo invertido, el agar fue retirado con la ayuda de una espátula estéril y posteriormente en los pozos se colocaron  $50 \mu\text{L}$  a diferentes concentraciones (20, 40 y 60 mg/mL) del extracto. Como control positivo se utilizaron  $50 \mu\text{L}$  de gentamicina (0.04 mg/mL) y como blanco  $50 \mu\text{L}$  de metanol. Las placas fueron incubadas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 h, después de este tiempo se procedió a medir los halos de inhibición, los datos fueron expresados en milímetros, considerando el diámetro total del halo sin restar el diámetro del pozo.





**Figura 6.-** Evaluación actividad antimicrobiana.

### 7.6.- Tamizaje fitoquímico

Se realizó el Análisis fitoquímico cualitativo para determinar la presencia de compuestos y grupos funcionales en el extracto, utilizando las siguientes pruebas químicas: 2, 4-dinitrofenilhidrazina (grupo carbonilo), antrona (carbohidratos), Baljet (sesquiterpenlactonas), bicarbonato de sodio (grupo carboxilo), cloruro férrico (taninos), Dragendorff (alcaloides), Liebermann-Burchard (esteroles y triterpenos), permanganato de potasio (dobles enlaces), Shinoda (flavonoides), así como para coumarinas, quinonas y saponinas.

**2, 4-dinitrofenilhidrazina (grupo carbonilo):** Se preparó la solución de reacción con 100 mg de 2,4, DFNH + 10 mL de EtOH + 3 mL de HCl y se aforó a 100 mL con agua destilada, de ésta se añadieron unas gotas a la muestra disuelta en etanol, la formación de un precipitado amarillo, rojo o naranja indicó la presencia de un grupo carbonilo.

**Antrona (carbohidratos):** En un tubo de ensaye se colocarán 1-2 mg de la muestra disuelta en agua, se adiciona por las paredes del tubo una solución recientemente preparada de antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico concentrado; la prueba es positiva si en la interfase se presenta un anillo azul-verdoso o violeta.

**Alcaloides (Prueba de Dragendorff):** Se corre una cromatografía en capa delgada con el extracto y se revela con reactivo de Dragendorff, esta será positiva si se produce una mancha color naranja que debe persistir más de 24 h y también se realiza la prueba directamente en el extracto: se coloca una pequeña cantidad de

muestra disuelta en etanol y se agrega una o dos gotas del reactivo Dragendorff, la prueba es positiva si se produce un precipitado color naranja.

Preparación del reactivo:

Solución A: Se disolverán 0.85 g de nitrato de bismuto en una mezcla de 10 mL de ácido acético y 40 mL de agua.

Solución B: Se disolverán 8.0 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada.

**Cumarinas.**- Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en una solución de hidróxido de sodio al 10 %; si se produce una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular, la prueba es positiva.

**Dobles enlaces (Prueba de permanganato de potasio):** Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol y se adicionó gota a gota una solución de permanganato de potasio al 2 % en agua; la prueba es positiva si se observa decoloración o formación de un precipitado café de bióxido de manganeso.

**Esteroles y triterpenos (Prueba de Liebermann-Burchard):** El reactivo se preparará mezclando 1 mL de anhídrido acético más 1 mL de cloroformo y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Una gota del reactivo se le añadirá a la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de cloroformo o sin disolver, la presencia de un color azul o morado, será positiva para esteroides y de color rojizo para triterpenos, en el lapso de 1 h, particularmente los insaturados.

**Flavonoides (Prueba de Shinoda):** Se disolverá 1-2 mg de la muestra en 1 mL de etanol agregando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y una o dos limaduras de magnesio; si la solución se torna de color rojo intenso, la prueba es positiva, otro color como anaranjado, verde o azul pueden estar presentes, flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.

**Grupo carboxilo (Prueba de bicarbonato de sodio):** Se agregarán unas gotas de la solución de bicarbonato de sodio al 10 % en agua a la muestra (1-2 mg) disuelta en 1

mL de agua o etanol. La prueba es positiva si se observa el desprendimiento de burbujas de anhídrido carbónico.

**Quinonas:** 2 a 3 mg de muestra se le añadirán 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico, será positiva para quinonas si se colorea de rojo y se confirma al añadir 2-3 gotas de hidrosulfito de sodio al 5% decolorando la solución y se regenera el color añadiendo de 2-3 gotas de agua oxigenada al 30 %.

**Saponinas:** En un tubo de ensaye se colocará la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de agua, se sacude y si se forma una espuma abundante y permanece más de 15 min, la prueba se considera positiva.

**Sesquiterpenlactonas (Prueba de Baljet):** Se utilizarán 2 soluciones que se mezclarán en volúmenes iguales antes de usarse. La solución A se preparó pesando 1 g de ácido pícrico y disolviéndolo en 100 mL de etanol; para la solución B se pesaron 10 g de hidróxido de sodio, disolviéndolos en 100 mL de agua. Para la prueba se colocaran de 3 a 4 mg de compuesto de prueba, añadiendo 3 a 4 gotas del reactivo, será positiva si se forma coloración naranjada o roja oscura.

**Taninos (Prueba de cloruro férrico):** Se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol, añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5 % en etanol; la prueba será positiva si produce una coloración verde oscura o negra.

### **7.7.- Ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina***

Para la eclosión de los nauplios de *A. salina* se preparó agua de mar artificial utilizando 20 g de sal de mar y 6 mg de levadura de cerveza, disueltos en 500 mL de agua destilada a pH 7.8. Previo a la realización del ensayo, el agua de mar artificial fue acondicionada suministrando aire mediante una bomba para acuario por 24 h. Se adecuó un recipiente de vidrio rectangular con medidas de 17 cm x 14 cm x 7cm, el cual consta de un área oscura en donde se incuban los quistes y dos áreas iluminadas que permiten mediante fototropismo obtener solo nauplios eclosionados. Después de un periodo de incubación de 48 h a temperatura ambiente (23-25°C), aireación y luz

constante, se procedió a llevar a cabo el ensayo utilizando microplacas estériles de 96 pozos (Costar, Corning, NY, USA), en las cuales se depositaron 10 nauplios en un volumen final de 200  $\mu$ L por pozo y diferentes concentraciones del extracto de *B. trifoliata* (100-10000  $\mu$ g/mL). Se utilizó dicromato de potasio al 5% ( $K_2Cr_2O_7$ ) y agua de mar como control positivo y negativo respectivamente. La microplaca fue incubada por 24 h. Posteriormente se realizó el conteo de nauplios muertos, en cada pozo de la microplaca utilizando un estereoscopio. El ensayo fue realizado por triplicado y para determinar la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) se realizó un análisis Probit con apoyo del paquete estadístico SPSS 17 (Figura 7).



**Figura 7.-** Ensayo letalidad *Artemia salina*.

### 7.8.- Actividad antiulcerógena *in vivo*

Para evaluar esta actividad se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar adultas con un peso de entre 300-350 g que se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz/oscuridad (12h), temperatura ( $21 \pm 2$  °C) y humedad relativa (50- 55%). A los animales de laboratorio se les proporcionó dieta para roedores y agua *ad libitum*. Éstas se mantuvieron bajo las condiciones anteriormente descritas, por una semana previa y durante el desarrollo del ensayo. El manejo y cuidado de los animales se efectuó de acuerdo a procedimientos internacionales aprobados y siguiendo las

recomendaciones indicadas en las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (NOM062-ZOO-1999).

Se utilizaron 36 discos de zinc estériles con un peso de  $18.2 \pm 0.2$  mg.

Para la inducción de litiasis, las ratas fueron intervenidas quirúrgicamente, a las cuales les fue administrada previamente vía oral 4 mL de agua purificada, para dilatar la vejiga y con esto hacerla visible al momento de la intervención quirúrgica. El proceso quirúrgico para la inducción de litiasis se realizó bajo condiciones estériles utilizando para la anestesia ketamina (Clorkétam<sup>®</sup> 1000, Vétoquinol laboratorios, Mexico) (10 mg/kg i.p) y xilacina (Procin<sup>®</sup>, PiSA Laboratorios, Mexico) (3 mg/kg intramuscular). Cuando los reflejos de la córnea y patas disminuyeron, se expuso la vejiga urinaria y se retiró la orina por punción y aspiración mediante el uso de una jeringa estéril, posteriormente se realizó una pequeña incisión para abrir el lumen e insertar un disco de zinc con textura y tamaño estandarizado ( $18.4 \pm 0.2$  mg), la incisión se cerró con sutura quirúrgica absorbible (VICRYL<sup>™</sup> 5-0 USP) y finalmente se colocó de nuevo en su sitio; las capas de peritoneo, músculo y piel se suturaron bajo la técnica de cushing por separado utilizando sutura estéril absorbible (VICRYL<sup>™</sup> 5-0 USP). Cuando las ratas intervenidas quirúrgicamente se recuperaron de los efectos de la anestesia, se les administró vía oral analgésico postquirúrgico tramadol (Tramadol Jet, NORVET laboratorios, México) (30 mg/kg) y metamizol sódico (Prodol-Jee NRV\*, NORVET laboratorios, Mexico) (10 mg/kg), repitiendo dicha dosis cada 12 h por 3 d. Además, se les administró por vía oral antibiótico enrofloxacino (Baytril 5%, Bayer) (1 ml/kg). a los animales se les dejó recuperar durante 3 d.

Para la evaluación de la actividad biológica, los animales de experimentación se dividieron en 5 grupos con 6 animales cada uno y se les administró vía oral mediante una cánula el extracto de *B. trifoliata* por un periodo de 20 d.

Los grupos de experimentación se formaron de la siguiente manera:

Grupo I: Control negativo (sin inserción de cuerpo extraño)

Grupo II: Control experimental (inserción de cuerpo extraño)

Grupo III: Inserción de cuerpo extraño y tratamiento con extracto de *B. trifoliata* 50 mg/kg.

Grupo IV: Inserción de cuerpo extraño y tratamiento con extracto de *B. trifoliata* 100 mg/kg.

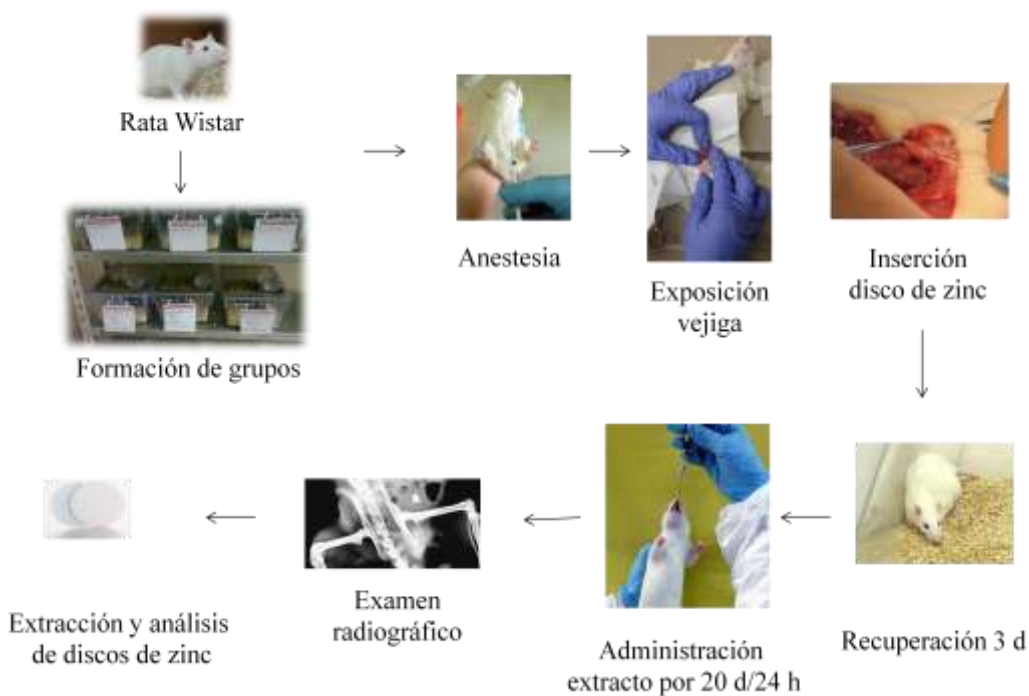
Grupo V: Inserción de cuerpo extraño y tratamiento con extracto de *B. trifoliata* 150 mg/kg.

Los animales que enfermaron y murieron durante el periodo experimental no fueron reemplazados.

Para monitorear la deposición de cristales en el disco de zinc implantado en la vejiga de las ratas se les realizó un examen radiológico con un aparato de rayos X (The Weber dental MFG, Co, Canton, Ohio, USA), para esto el animal se mantuvo bajo anestesia ligera utilizando ketamina (10 mg/kg *i.p*) y Xilacina (3 mg/kg *i.m*) en posición anteroposterior para exponer la región pélvica.

Después de transcurridos 20 d del tratamiento, se practicó eutanasia a los animales mediante anestesia profunda, posteriormente se expuso la vejiga urinaria y se retiró el disco de zinc implantado el cual fue pesado en una balanza analítica (Ohaus); la diferencia entre el peso inicial del disco de zinc implantado y el peso final con el cálculo seco extraído después de los 20 d del experimento, nos permitió calcular la cantidad de cálculos renales depositados y así determinar actividad antiurolítica de los extractos evaluados.

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) con un límite de confianza del 95%. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba spot-hoc Dunnett, para determinar si existe diferencia significativa en el peso del depósito del cálculo renal sobre el disco implantado entre los grupos de tratamiento y el grupo control. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Science, version 20.0, SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). A continuación la figura 8 muestra el procedimiento antes descrito para evaluar la actividad antiurolítica *in vivo*.



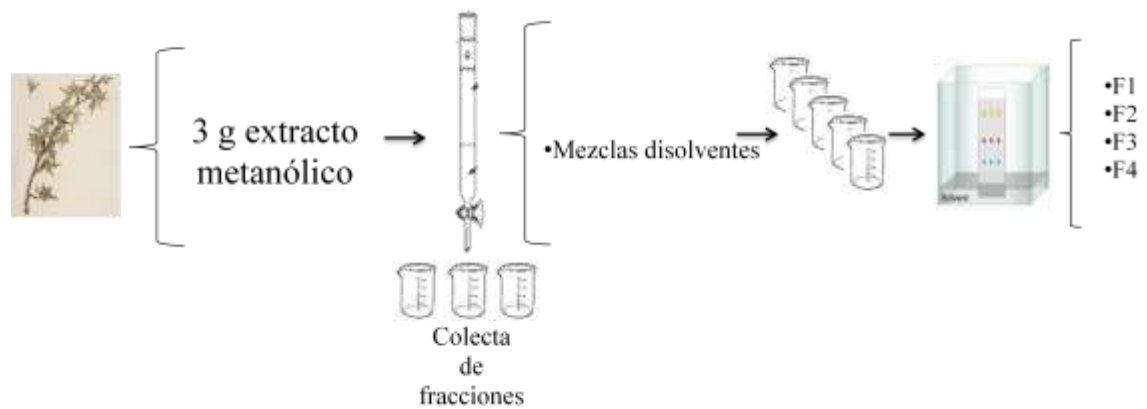
**Figura 8.-** Evaluación actividad antiurolítica *in vivo*.

### 7.9.- Fraccionamiento del extracto

Para el fraccionamiento del extracto se empleó la técnica de cromatografía en columna para la cual se utilizó una columna de vidrio de 51 cm de largo por 2 cm de diámetro. Se utilizaron 3 g de extracto, como fase estacionaria se emplearon 75g de sílica gel para columna (Sigma-aldrich, 200-400 mallas) y como fase móvil se utilizaron los siguientes sistemas de disolventes: cloroformo-metanol (1:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1) de 150 mL cada uno. El proceso de elución de la columna con los

distintos sistemas de disolventes se realizó por triplicado para obtener cantidad suficiente de muestra.

Las fracciones colectadas mediante cromatografía en columna, fueron analizadas en cromatografía en capa fina y se agruparon acorde a su RF. Para lo anterior se utilizaron cromatoplasmas de vidrio de 20cm x 20 cm. La fase estacionaria utilizada fue sílica gel para cromatografía en capa fina (Merck). La muestra a analizar se colocó por medio de un capilar de vidrio sobre la cromatoplasma y una vez seca se introdujo en una cuba para cromatografía la cual contenía como fase móvil el sistema cloroformo-metanol 8.5:1.5 (100 mL). Las placas fueron reveladas utilizando luz UV así como yodo resublimado. Finalmente se procedió a evaluar la actividad antiurólítica *in vitro* de las fracciones obtenidas. La figura 9 esquematiza el procedimiento para la obtención de las fracciones.



**Figura 9.-** Fraccionamiento del extracto.



## 8.- RESULTADOS

### 8.1.- Identificación taxonómica de la planta en estudio

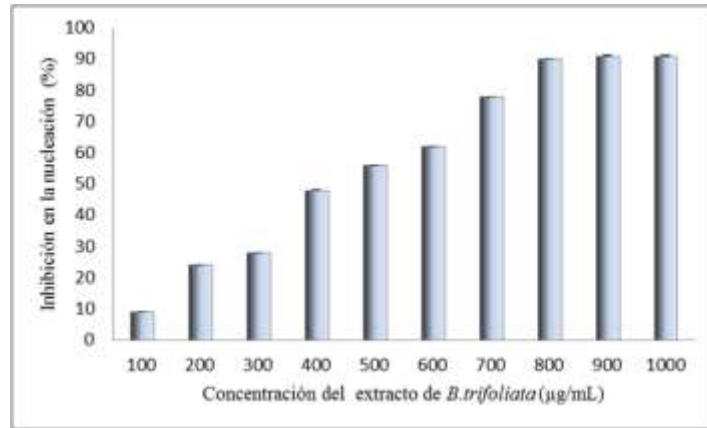
La planta fue identificada como *Berberis trifoliata* por personal del herbario de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Nuevo León, (FCNL) a cargo del Dr. Eduardo Estrada Castellón y se le asignó número de Registro 0100.

### 8.2.-Rendimiento del extracto

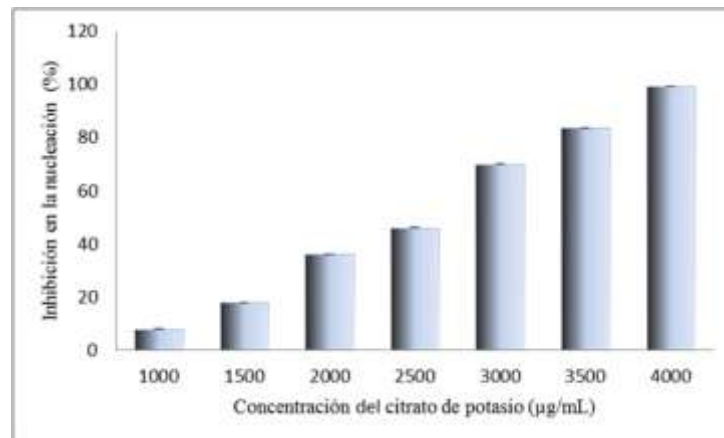
El rendimiento obtenido del extracto metanólico por maceración de *B. trifoliata* fue de: 5.40 % p/p.

### 8.3.- Actividad antiurolítica *in vitro*

En el ensayo *in vitro* de la actividad antiurolítica, se determinó, por medio de un método turbidimétrico, el efecto del extracto metanólico de *Berberis trifoliata* sobre la etapa de nucleación en la cristalización del oxalato de calcio. Los resultados demuestran que la adición del extracto de *B. trifoliata* a diversas concentraciones (100 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) tiene un efecto inhibitorio sobre la nucleación de los cristales de oxalato de calcio ( $\text{CaOx}$ ), lo cual se refleja en las lecturas de la densidad óptica ya que éstas disminuyeron a medida que se incrementó la concentración del extracto en estudio; presentando un porcentaje de inhibición dosis-dependiente (Figura 10), encontrando que a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  se obtuvo una inhibición de  $93 \pm 0.01$  %. Se utilizó citrato de potasio como control positivo, en el que se observó comportamiento similar dosis-dependiente, para el cual se requirió 3750  $\mu\text{g/mL}$  para obtener el mismo efecto que el extracto (Figura 11). En tanto el control negativo, el cual solo contiene las soluciones de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  sin adición de extracto, luego de añadir el agente precipitante ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) para inducir la nucleación, se observa un aumento significativo en la turbidez del medio.



**Figura 10.-** Porcentaje de inhibición del extracto metanólico de *B. trifoliata* sobre la nucleación de cristales de oxalato de calcio.

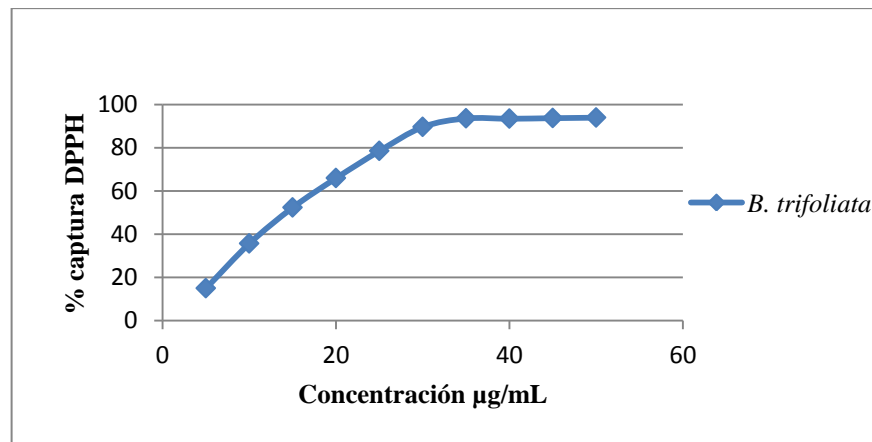


**Figura 11.-** Porcentaje de inhibición del citrato de potasio ( $C_6H_5K_3O_7$ ) sobre la nucleación de cristales de oxalato de calcio.

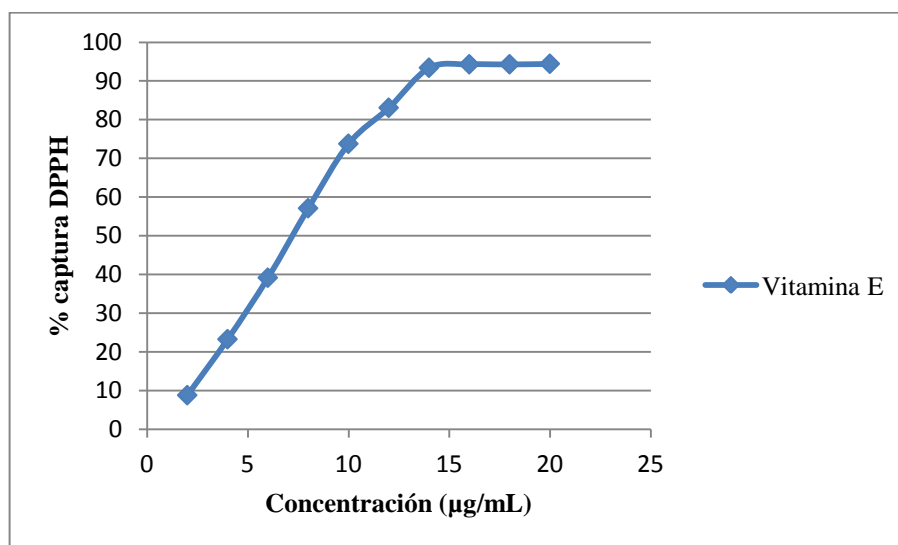
#### 8.4.- Capacidad de captura de radicales libres

La evaluación de la capacidad de captura de radicales libres del extracto metanólico de *B. trifoliata* a diversas concentraciones (100 -1000 µg/mL) se llevó a cabo *in vitro* mediante el método del radical DPPH. Para esto se calculó el porcentaje de capacidad de captura de radicales libres del extracto en estudio, así como de la vitamina E a diferentes concentraciones (2- 20 µg/mL) la cual se utilizó como control positivo. En los resultados se observa que tanto el extracto como la vitamina “E” presentaron un comportamiento dosis-dependiente ya que a medida que aumenta la concentración existe una tendencia de mayor capacidad de captura de radicales libres (Figura 12 y 13). El porcentaje de captura del radical por parte del extracto osciló en un rango de

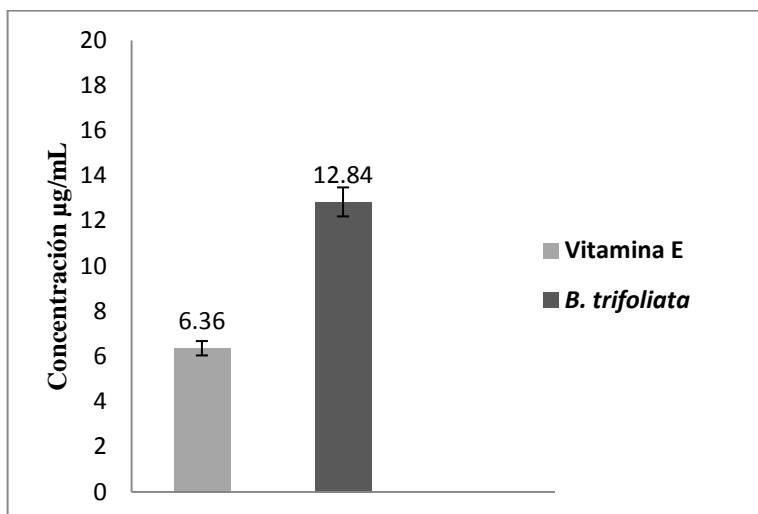
15 a 94% mientras que para la vitamina “E” fue de 9 a 94%. A partir del porcentaje de captura del radical DPPH del extracto en estudio y la vitamina “E”, se calculó la concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>) a través de un análisis de regresión PROBIT utilizando el paquete estadístico SPSS 17. Los resultados expresados en términos de la concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>) para el extracto y la vitamina “E” fueron de 12.84 y 6.36 µg/mL respectivamente (Figura 13).



**Figura 12.-** Capacidad de captura (%) de radical libre DPPH del extracto metanólico de *B. trifoliata*.



**Figura 13.-** Capacidad de captura (%) de radical libre DPPH por parte de la vitamina “E”.



**Figura 14.-** Concentración media efectiva ( $EC_{50}$ ) del extracto metanólico de *B. trifoliata* y vitamina “E”.

### 8.5.- Actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto crudo a diversas concentraciones se llevó a cabo mediante la técnica de difusión en pozo en agar, para lo cual, se utilizaron cepas de aislados clínicos responsables de infecciones en vías urinarias. La actividad antimicrobiana es determinada a través del diámetro del halo de inhibición. Una vez transcurrido el periodo de incubación se analizaron las placas, en las cuales no se observó la formación de halos de inhibición en presencia de los microorganismos a ninguna de las concentraciones del extracto evaluadas. Los resultados obtenidos indican que el extracto no posee actividad antimicrobiana en las condiciones en que fue probado, frente a las cepas de aislados clínicos utilizadas.

### 8.6.- Tamizaje fitoquímico

Para determinar la presencia de diversos constituyentes químicos en el extracto metanólico crudo de *B. trifoliata*, se realizó un tamizaje fitoquímico, empleando diversas técnicas colorimétricas. Al analizar los resultados se comprueba la

diversidad de compuestos y grupos funcionales presentes en el extracto en estudio en los que figuran carbohidratos, cumarinas, dobles enlaces, flavonoides, grupo carboxilo, sesquiterpenlactonas, alcaloides y taninos a los cuales se les atribuye actividad biológica.

**Tabla I.- Resultados tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de *B. trifoliata*.**

Metabolito o grupo funcional	Resultado
Alcaloides	-
Carbohidratos	+
Coumarinas	+
Dobles enlaces	+
Esteroles	-
Flavonoides	+
Carbonilos	-
Carboxilos	+
Quinonas	-
Saponinas	-
Sesquiterpenlactonas	+
Taninos	+

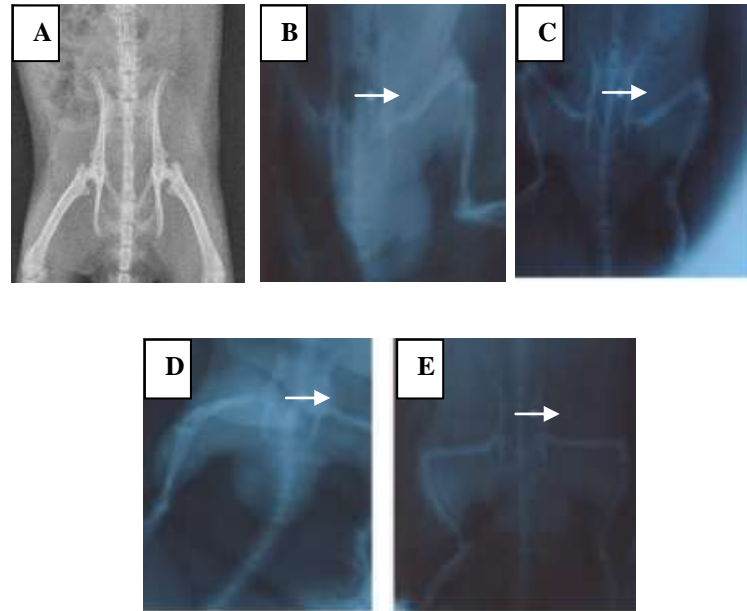
### 8.7.- Ensayo toxicidad *Artemia salina*

Para determinar la toxicidad del extracto se realizó el ensayo sobre *A. salina* con diferentes concentraciones del extracto metanólico de *B. trifoliata* (por triplicado). En el grupo control negativo (agua de mar) no se observaron alteraciones en el

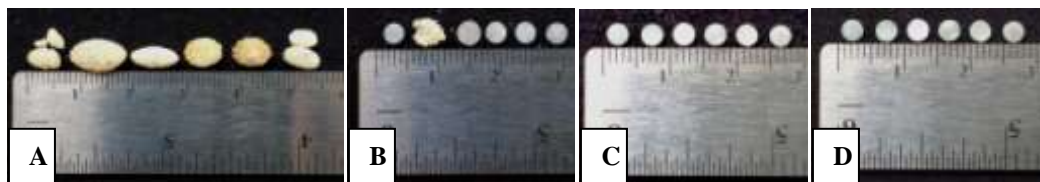
comportamiento de los nauplios y la viabilidad fue del 100 %; por otro lado, en el grupo del control positivo ( $K_2Cr_2O_7$  al 5%) se manifestaron efectos tóxicos a las 24 h de exposición, con un porcentaje de viabilidad del 0%; en el extracto de la planta en estudio a las concentraciones de 900 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  a las 24 h se observó dificultad en movimiento de nado de las larvas. El grado de toxicidad se determina en función del valor de su  $DL_{50}$  con el siguiente criterio: Toxicidad alta de 0 - 100  $\mu\text{g/mL}$ , moderada de 100 - 500  $\mu\text{g/mL}$ , ligera de 500 - 1000  $\mu\text{g/mL}$  ligera y no tóxico con un valor mayor a 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Nguta, *et al.*, 2006). Para el extracto en estudio se obtuvo una  $DL_{50}$  de 925  $\mu\text{g/mL}$ , por lo cual es ligeramente tóxico.

### **8.8.- Actividad antiurolítica *in vivo***

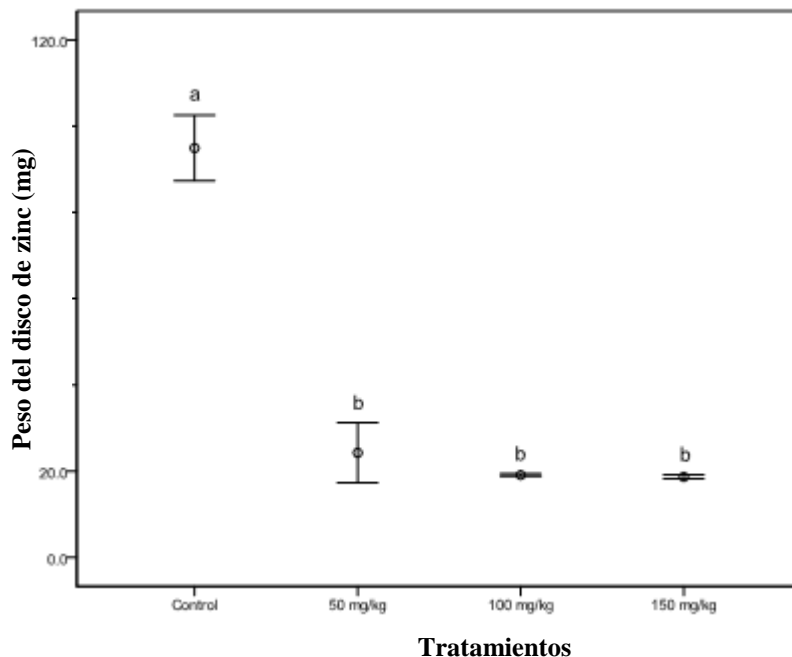
La deposición de cristales alrededor de los discos implantados en los distintos grupos de estudio se monitoreó por medio de toma de placas de rayos X (Figura 14). Los resultados obtenidos en el ensayo de la actividad antiurolítica *in vivo* mediante la técnica de inserción de cuerpo extraño se muestran en la figura 15. Al terminar el periodo de tratamiento, se retiraron los discos de zinc implantados y se analizaron. En el Grupo I.- Control Negativo sin inserción de cuerpo extraño no se produjo la formación de cálculos en vejiga; en el Grupo II.- Control Positivo con inserción de cuerpo extraño se le produjo una considerable deposición de cristales alrededor del disco de zinc implantado con un peso promedio de  $94.62 \pm 12.01$  mg; en los grupos III, IV y V Tratamiento: con inserción de cuerpo extraño y tratamiento con extracto de *B. trifoliata* a 50, 100 y 150 mg/kg v.o. respectivamente se produjeron una deposición de cristales alrededor del disco de zinc significativamente menores que el control experimental, con un peso promedio de 24.28, 19.11 y 18.53 mg respectivamente. Los resultados demuestran que la deposición de cristales alrededor del disco de zinc se inhibió significativamente evitando la formación de cálculos. Así mismo, mediante la prueba de Dunnet, al comparar el peso promedio con respecto a la deposición de cristales alrededor del disco de zinc, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 16).



**Figura 15.-** Monitoreo por rayos X de la deposición de cristales alrededor del disco de zinc insertado en los animales de experimentación. (a) Control Negativo, (b) Control Positivo (inserción de disco de zinc sin tratamiento), (c) Tratamiento con 50 mg/kg v.o de *B. trifoliata* e inserción de disco de zinc (d). Tratamiento con 100 mg/kg v.o de *B. trifoliata* e inserción de disco de zinc (e) Tratamiento con 150 mg/kg v.o de *B. trifoliata* e inserción de disco de zinc.



**Figura 16.-** Discos de zinc extraídos de los animales de experimentación: A.- Control Positivo (inserción de disco de zinc sin tratamiento), B.- Tratamiento con 50 mg/kg v.o de *B. trifoliata* e inserción de disco de zinc, C.- Tratamiento con 100 mg/kg v.o de *B. trifoliata* e inserción de disco de zinc y D.- Tratamiento con 150 mg/kg v.o de *B. trifoliata* e inserción de disco de zinc.



**Figura 17.-** Estadística descriptiva (media  $\pm$  error estándar) de la deposición de cristales sobre el disco de zinc. Con los tratamientos a diferente concentración de *B. trifoliata* y el control positivo ( $F = 206.50$ ,  $p < 0.01$ ). Misma letra indica que no existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

### 8.9.- Fraccionamiento del extracto

Mediante cromatografía en columna se colectaron 73 fracciones, las cuales fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina y fueron agrupadas acorde a su RF, dando como resultado 5 fracciones dentro de las cuales la fracción denominada F39/46 presentó actividad antiurolítica *in vitro*.



## 9.- DISCUSIÓN

Los productos naturales son sustancias producidas por cualquier organismo vivo que habita en la naturaleza. Las plantas producen una serie de metabolitos secundarios denominados constituyentes fitoquímicos los cuales presentan actividad biológica que les atribuye diversos efectos terapéuticos (Azwanida, 2015; Valencia, 1995).

Para la obtención de productos naturales inicialmente se lleva a cabo un proceso de extracción, el cual implica la separación de componentes biológicamente activos de los inactivos o inertes en tejidos vegetales o animales utilizando disolventes selectivos (Handa, *et al.*, 2008). Se dispone de una amplia gama de técnicas para la obtención de los extractos de origen vegetal entre las que se encuentran maceración estática y con agitación, Soxhlet, infusión, decocción, percolación, entre otras. Así mismo se dispone de métodos más modernos tales como la extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido y extracción con fluidos en condiciones supercríticas (Azwanida, 2015; Sarker, *et al.*, 2005). Dentro de los parámetros a considerar en la obtención de un extracto se encuentra la técnica de extracción utilizada, ya que juega un papel muy importante y crucial en la evaluación de la actividad biológica de productos naturales (Azmir, *et al.*, 2013). En el presente trabajo la obtención del extracto de *B. trifoliata* se realizó por medio de maceración ya que es una técnica ampliamente utilizada por ser sencilla, económica y a diferencia de otras técnicas en las que se utiliza calor, se lleva a cabo a temperatura ambiente evitando que el material extraído se encuentre sujeto a un calentamiento continuo que pueda provocar la posible degradación de compuestos termolábiles (Valencia, 1995; Heinrich, *et al.*, 2012). Así mismo, es una técnica que permite realizar una variante en la que se aplica agitación, facilitando la extracción al aumentar la difusión por parte del disolvente que entra en contacto con el material vegetal. Mediante la agitación se elimina de la superficie de la muestra la porción del disolvente que ya se encuentra saturada poniendo en contacto nuevas cantidades de disolvente pobre en las sustancias extraídas permitiendo que un nuevo punto de equilibrio de saturación sea alcanzado aumentando con esto el rendimiento de la extracción (Azmir, *et al.*, 2013).

Dentro del proceso de extracción, otro de los factores relevantes que influye en la efectividad del proceso es la elección del disolvente, donde deben ser considerados aspectos relacionados con la solubilidad, selectividad, facilidad de manipulación, así como grado y pureza del disolvente. (Sarker, *et al.*, 2005). La elección del disolvente se da principalmente en función de los compuestos de interés a aislar con base en su polaridad. Los disolventes se clasifican en polares, semipolares y no polares (Olaribigbe, 2015). En nuestro caso la extracción se llevó a cabo utilizando metanol. Lo anterior debido a que los alcoholes alifáticos de hasta 3 carbonos, como lo es el metanol, son los más utilizados en la extracción de metabolitos con actividad biológica ya que estas sustancias logran extraer la gran mayoría de sustancias naturales de interés. (Sharapin, 2000; Marcano y Hasegawa, 2002).

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la actividad antiurolítica del extracto metanólico de *B. trifoliata*. Actualmente se disponen de una amplia gama de técnicas de ensayo que se utilizan para evaluar el potencial terapéutico de extractos o compuestos de origen natural frente a diversas condiciones fisiopatológicas, entre ellas la urolitiasis (Salman, *et al.*, 2016). En el ámbito de la investigación de la urolitiasis, se disponen de diversos métodos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, los cuales difieren cualitativa y cuantitativamente en la forma de reproducir los aspectos del sistema urinario así como del proceso de cristalización (Kavanagh, 2006). En la litogénesis se ven involucrados una serie de complejos procesos fisicoquímicos que dan lugar a la formación de cristales mediante de las etapas de nucleación, crecimiento y agregación (Atmani y Khan, 2000; Bashir y Gilani, 2009). Los modelos *in vitro* simulan estas etapas permitiendo evaluar la acción profiláctica del compuesto en estudio (Thakur, *et al.*, 2013). Entre los métodos *in vitro* utilizados en el estudio de la actividad antiurolítica se encuentran los espectrofotométricos, titrimétricos, estáticos de flujo simultaneo y de crecimiento de cristales en gel de sílice (Saravanan, *et al.*, 2006; Salman, *et al.*, 2016). De los diversos métodos existentes para evaluar la actividad antiurolítica *in vitro*, se utilizó un método espectrofotométrico para medir la capacidad de inhibir el proceso de nucleación por parte del extracto en estudio. Estos métodos son los más ampliamente utilizadas en el

ámbito de la investigación de la urolitiasis que se basan en la medición de los cambios en la turbidez debido a la nucleación y agregación de cristales de oxalato de calcio. El estudio se enfocó en la determinación del porcentaje de inhibición sobre la etapa de nucleación, debido a que ésta es la parte inicial del proceso en la cristalización que dará lugar posteriormente a la formación del cálculo urinario.

Los resultados de la actividad *in vitro* mostraron que tras la adición tanto del extracto como del citrato de potasio a las concentraciones evaluadas, las lecturas de la absorbancia disminuyeron a medida que aumentó la concentración de éstos, lo que indica una disminución en cuanto al proceso de nucleación de cristales dispersos en solución dosis dependiente. Resulta evidente que la concentración requerida de extracto para obtener un porcentaje de inhibición relevante es considerablemente menor con respecto a la del citrato de potasio ya que el porcentaje de inhibición de la nucleación del extracto a 1000 µg/mL fue de 93 ±0.01 % mientras que el citrato de potasio logra obtener el mismo efecto inhibitorio a una concentración de 3750 µg/mL. Éstos resultados sugieren que el extracto metanólico de *B. trifoliata* presentó *in vitro* actividad antiurolítica relevante en cuanto a inhibición del proceso de nucleación en litiasis renal. La inhibición de la nucleación sugiere disminución en la biodisponibilidad de los minerales que promueven la formación de cristales. (Salman, *et al.* 2016). Los tratamientos actualmente disponibles alteran la composición de la orina con lo cual logran disminuir la sobresaturación. Sin embargo, no existe algún fármaco que inhiba directamente el proceso de la cristalización en la orina, por lo que los compuestos que sean capaces de inhibir dicho proceso representarían una alternativa como una nueva clase de fármacos (Devkar, *et al.*, 2016).

Los compuestos de origen natural han sido utilizados durante mucho tiempo para el tratamiento de la litiasis renal, dentro de estos se encuentran los fitoquímicos derivados de plantas medicinales que poseen múltiples constituyentes con acción terapéutica que no presentan efectos secundarios adversos y son accesibles a una gran población (Khan, *et al.*, 2012). Durante siglos las plantas han sido una fuente terapéutica para el tratamiento de patologías diversas. En la actualidad, debido a la falta de acceso a la medicina moderna, el uso de la fitoterapia está ampliamente

extendido, ya que las plantas representan una alternativa en la atención a la salud frente a los tratamientos alópatas debido a que son un recurso abundante y de fácil acceso. Para el tratamiento de la urolitiasis existen diversos compuestos de origen vegetal que se utilizan en la práctica clínica habitual (Morán, *et al.*, 2012).

En relación con el uso de la fitoterapia en la enfermedad litiásica se han desarrollado diversos estudios que evalúan la actividad antiurolítica de extractos obtenidos a partir de plantas utilizadas en la medicina tradicional, entre las que se encuentran *Rotula aquatica* (Sasikala, *et al.*, 2013 ) *Origanum vulgare* (Khan, *et al.*, 2011), *Bergenia ligulata* (Bashir y Gilani, 2009). Los resultados obtenidos demuestran que las plantas anteriormente mencionadas, al igual que el extracto de *B. trifoliata*, poseen sustancias con efecto terapéutico sobre las diversas etapas involucradas en la urolitiasis. Se han propuesto diversos mecanismos de acción por parte de los extractos que presentan actividad antiurolítica entre los que se encuentra el aumento en la excreción de citrato urinario, disminución en la excreción de oxalato y calcio urinario. Así mismo el efecto terapéutico se ha atribuido a efectos diuréticos y antioxidantes.

La evaluación de la actividad antiurolítica de compuestos obtenidos a partir de diferentes fuentes naturales, tales como las plantas, se lleva a cabo generalmente en modelos experimentales que abarcan las etapas de nucleación, agregación y crecimiento de cristales, los cuales son procesos involucrados en la urolitiasis (Hirayama, *et al.*, 1993; Naghii, *et al.*, 2015). Aunque los modelos *in vitro* proporcionan una vía que permite simular la mayoría de las etapas involucradas en el proceso de formación de cálculos renales, no es posible determinar los efectos de los promotores e inhibidores endógenos involucrados en el proceso de la litiasis (Meiouet, *et al.*, 2011). Por lo tanto, es preferible implementar modelos *in vivo* que utilizan animales con los que es posible evaluar en etapas de investigación preliminar la acción terapéutica de compuestos de origen vegetal, teniendo en cuenta la mayoría de los factores involucrados en patologías diversas tales como la urolitiasis (Biyani, *et al.*, 2007; Khan, 1997).

Tomando en cuenta las consideraciones antes descritas, en éste estudio con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en la fase experimental *in vitro*, se

llevó a cabo la evaluación del extracto de *B. trifoliata* en un modelo *in vivo* en ratas de la cepa Wistar. De los distintos animales utilizados en la evaluación de la actividad antiurolítica, las ratas son utilizadas generalmente como animales de experimentación debido a las considerables similitudes que existen en la estructura y fisiología de los sistemas urinarios de humanos y las ratas. Actualmente se disponen de diversos modelos experimentales *in vivo* para investigar los mecanismos subyacentes en la formación de cálculos y determinar el efecto de diversos agentes terapéuticos sobre el desarrollo y progresión de la urolitiasis. La formación de cálculos puede ser inducida experimentalmente por medio de la administración de productos químicos o por medio de la inserción quirúrgica de un cuerpo extraño en vejiga de animales de experimentación. La inducción química de cálculos renales se lleva a cabo mediante la administración oral de etilenglicol, oxalato, cloruro de amonio, vitamina D3, sulfato de gentamicina, ácido glicólico, gluconato de calcio o L-hidroxiprolina. Éstos productos químicos pueden alterar procesos bioquímicos dando lugar a una excesiva formación de oxalato en la orina, produciendo la precipitación de sustancias que dan lugar a la formación de cálculos. Sin embargo, estos modelos están asociados con una alta incidencia de nefrotoxicidad, acidosis metabólica y ocurrencia de cálculos en la corteza renal lo cual es una situación contraria a la encontrada en la urolitiasis humana. (Liu, *et al.*, 2007). Por lo tanto éste modelo fue descartado para la realización del presente trabajo ya que no representan la enfermedad tal y como se manifiesta clínicamente. En los modelos en los cuales se induce la formación de cálculos mediante la inserción de cuerpo extraño en vejiga, los materiales utilizados son discos de zinc, cristales de oxalato de calcio, discos de plástico y piezas de material quirúrgico no absorbible. Estos modelos se emplean para estudiar el efecto de sustancias que puedan inhibir el efecto de los urolitos preformados y aquellas que aceleren su disolución. (Singh, *et al.*, 2010; Singh, *et al.*, 2010). El modelo de inserción de disco de zinc induce cálculos con daño mínimo e imita la etiología de la formación de cálculos urinarios en humanos (Khan, 1997) convirtiéndolo en el método más ampliamente utilizado y reportado científicamente (Singh, *et al.*, 2010). Por lo antes mencionado se seleccionó este método para la evaluación de la actividad antiurolítica del extracto de *B. trifoliata*. En este modelo, el disco de zinc implantado

actúa como un *nidus* que conduce posteriormente a la deposición de un urolito (Yamaguchi, *et al.*, 2005).

Los resultados de este estudio muestran que el extracto a las diferentes concentraciones administradas resulta eficaz en la prevención de la formación de urolitos ya que reduce significativamente la deposición de cristales alrededor del disco implantado, lo cual previene la formación, reduce el número y disrupción de cálculos formados en las ratas que se les indujo la litiasis por vía de inserción del disco de zinc. No se observó diferencia significativa por parte de las concentraciones administradas del extracto sobre la inhibición de cálculos en vejiga. Además, el extracto no produjo signos visibles de toxicidad o cambio en la actividad motora espontánea durante los 20 d de administración. El efecto antiurolítico del extracto, se debe probablemente a que mantiene las partículas responsables de la cristalización dispersas en solución, permitiendo que sean eliminadas fácilmente del tracto urinario, reduciendo la posibilidad de que se acumulen y favorezcan las condiciones para la formación de cálculos urinarios.

En el ámbito de la investigación de la urolitiasis, existen diversos reportes en los cuales se lleva a cabo la evaluación *in vivo* del potencial terapéutico de plantas basado en antecedentes etnobotánicos. Plantas como *Abelmoschus moschatus* (Pawar y Vyawahare, 2016), *Lantana cámara* (Vyas y Argal, 2013), *Terminalia arjuna* (Mittal, *et al.*, 2016). *Aerva lanata* (Dinnimath y Sunil, 2015) *Punica granatum* (Rathod, *et al.*, 2012), han demostrado tener actividad antiurolítica. Las plantas contienen múltiples constituyentes fitoquímicos con actividad biológica diversa. Dentro de los metabolitos a los que se les atribuye actividad antiurolítica se encuentran los flavonoides, alcaloides, ácidos orgánicos, saponinas, esteroides, carbohidratos, taninos, compuestos fenólicos, terpenoides, esteroides, glicosidos, sesquiterpenos, carotenoides y aminoácidos (Khajavi, *et al.*, 2011; Touhami, *et al.*, 2007). En el análisis fitoquímico preliminar realizado del extracto metanólico de *B. trifoliata* en este trabajo, se identificaron diversos compuestos y grupos funcionales a los que posiblemente se les atribuye la actividad antiurolítica entre los que se encuentran: carbohidratos, flavonoides, cumarinas, sesquiterpenlactonas, alcaloides y

taninos. La forma en que actúan estos compuestos es diversa. Los flavonoides poseen actividad antioxidante, diurética y capacidad de bloquear los canales de calcio (Revuelta, *et al.*, 1997; Pietta, 1998). Las saponinas, tienen la capacidad de disgregar la suspensión de mucoproteínas, las cuales fungen como fijadores en el proceso de cristalización (Gurocak y Kupeli, 2006). Otros de los compuestos a los que se les atribuye actividad antiurolítica son los alcaloides. Las plantas pertenecientes al género *Berberis*, se les considera de interés fitoquímico; éstas son una fuente importante de alcaloides tales como la berberina con amplias aplicaciones medicinales incluyendo usos terapéuticos para vejiga, riñón y cálculos biliares. Se ha reportado que la berberina es terapéuticamente eficaz para la prevención como para el tratamiento de la urolitiasis (Bashir y Gilani, 2011). En el extracto en estudio de *B. trifoliata* perteneciente al mismo género se identificó la presencia de alcaloides, probablemente son los responsables de la actividad antiurolítica. Sin embargo, no se puede descartar la contribución de otros constituyentes fitoquímicos en la actividad antiurolítica.

La urolitiasis es una condición en cuya etiología se ven implicados diversos mecanismos fisiopatológicos (Naghii, *et al.*, 2014). Actualmente existe evidencia de que los efectos de las reacciones que generan radicales libres juegan un papel muy importante como una de las causas en la formación de cálculos renales (Grases, *et al.*, 1998). Los radicales libres son especies reactivas del oxígeno (ROS) entre los que se encuentran el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidróxilo (OH) y peróxido ( $ROO^{\cdot}$ ). Actualmente se reconoce el papel de los radicales libres como inductores importantes de diferentes tipos de enfermedades (Grases, *et al.*, 1998). El riñón es un órgano altamente vulnerable a los daños ocasionados por las especies reactivas del oxígeno (Corda, *et al.*, 2001), las cuales están implicadas en la patogénesis de la urolitiasis al alterar el equilibrio en las células del riñón.

Un alto nivel de oxalato ocasiona una serie de alteraciones en las células epiteliales renales, entre las que se encuentran aumento en la producción de radicales libres que generan un ambiente oxidante que puede dar lugar a lesiones y posteriormente muerte

celular. Estas alteraciones, proporcionan en las células dañadas un entorno favorable que aumenta de manera significativa la predisponibilidad de facilitar la adherencia y retención de cristales en las células epiteliales renales (Grases, *et al.*, 1998; Devkar, *et al.*, 2016).

Debido a la diversidad de mecanismos involucrados en la fisiopatología de la urolitiasis, no ha sido posible desarrollar medicamentos eficaces para su tratamiento. (Jyothilakshmi *et al.*, 2014). Por lo tanto, compuestos con propiedades farmacológicas múltiples, entre los que se encuentran inhibición de cristalización y del estrés oxidativo, son una excelente opción para el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de la urolitiasis (Khan, *et al.*, 2012).

Actualmente se conoce que diversos compuestos como la vitamina “E”, vitamina “C”, flavonoides y compuestos fenólicos, poseen actividad antioxidante lo que les atribuye capacidad de prevenir el daño producido en el riñón derivado por estrés oxidativo (Mandavia, *et al.*, 2013). Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de neutralizar la acción oxidante generada por los radicales libres. Estos presentan un amplio rango de efectos biológicos incluyendo actividad antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antitrombótica y antiurolítica.

Las plantas medicinales contienen una gran variedad de constituyentes fitoquímicos, que son una fuente importante de compuestos de origen natural con actividad antioxidante. (Khan *et al.*, 2012). Los metabolitos secundarios con actividad antioxidante pueden ser utilizadas como terapia complementaria en la urolitiasis ya que previenen los daños ocasionados al riñón por acción de los radicales libres (Devkar, *et al.*, 2016).

Acorde a los resultados obtenidos en este estudio, el extracto metanólico de *B. trifoliata*, posee actividad antiurolítica tanto *in vitro* como *in vivo* la cual puede atribuirse a compuestos con actividad antioxidante. En estudios previos se ha reportado que compuestos antioxidantes obtenidos a partir de plantas son eficaces en el tratamiento de la urolitiasis (Mert, *et al.*, 2014; Bashir y Gilani, 2011; Khan, *et al.*,



2012; Mittal, *et al.*, 2015). Por tal motivo se llevó a cabo la evaluación de la capacidad de captura de radicales libres del extracto en estudio por el método *in vitro* del radicales libres DPPH. Éste método fue elegido por ser la técnica más ampliamente reportada, teniendo las ventajas de ser rápida, simple y de bajo costo (Kedare y Singh, 2011).

La actividad antioxidante se atribuye a la presencia de compuestos con capacidad de captura de radicales libres tales como terpenoides y especialmente compuestos fenólicos (Sultana, *et al.*, 2009); a éstos últimos se les atribuye potencial terapéutico diverso. El análisis fitoquímico del extracto metanólico de la planta en estudio reveló la presencia de taninos y flavonoides, compuestos con la actividad antes referida. La cristalización es un proceso asociado con el estrés oxidativo. Es posible que estos compuestos con actividad antioxidante presentes en el extracto inhiban el proceso de cristalización logrando disminuir el estrés oxidativo del tejido renal y la peroxidación lipídica ocasionada por el daño en el túbulo renal atribuyéndole actividad antiurolítica al extracto.

La obtención de compuestos antioxidantes a partir de material vegetal se lleva a cabo utilizando diversas técnicas de extracción. Los compuestos extraídos y su rendimiento dependen principalmente de la naturaleza del disolvente utilizado para la extracción ya que cada uno posee características químicas particulares entre las que destaca su polaridad que los hace ser solubles o insolubles en un disolvente en específico. En este estudio la obtención del extracto de *B. trifoliata* se realizó con metanol ya que es el disolvente más ampliamente utilizado para llevar a cabo la obtención a partir de material vegetal de metabolitos con capacidad de captura de radicales libres (Peschel, *et al.*, 2006; Li, *et al.*, 2006). La técnica que se utilizó fue la de maceración a temperatura ambiente con agitación constante, se ha reportado que material vegetal extraído por maceración con agitación constante permite obtener compuestos que exhiben mayor capacidad de captura de radicales libres (Hsu, *et al.*, 2006). Con proceso térmico se puede producir la pérdida de compuestos con capacidad antioxidante, ya que el calor puede acelerar su oxidación y otras reacciones degenerativas. (Sultana, *et al.*, 2009).

Aunado a que la urolitiasis es un padecimiento en el cual existe el riesgo de desarrollar infección en el tracto urinario, debido a que el cálculo obstruye el flujo de la orina estableciendo así condiciones favorables para el crecimiento de bacterias, se evaluó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *B. trifoliata*.

Se ha reportado que diversas bacterias, incluyendo las responsables de infección en tracto urinario, han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos, lo que dificulta el tratamiento de las infecciones urinarias (Ullah, *et al.*, 2013). La resistencia bacteriana es una condición favorecida, entre otros, por la prescripción inadecuada y el uso indiscriminado de antibióticos, prolongación innecesaria del tratamiento, utilización de dosis no óptimas y falta de adherencia al tratamiento (Mohanasundari, *et al.*, 2007; Torres, *et al.*, 2007). Se trata de una problemática seria y de suma importancia, ya que medicamentos de amplio uso y necesarios, tales como TMX/SMX, fluoroquinolonas y betalactámicos podrían perder su utilidad terapéutica en infecciones comunes (Suresh, *et al.*, 2016). Debido a lo anterior, existe la necesidad de la búsqueda de sustancias con actividad antimicrobiana para el desarrollo de nuevos fármacos.

Durante siglos las plantas han sido utilizadas para el tratamiento de patologías diversas ya que contienen constituyentes fitoquímicos con potencial terapéutico, mismos que sirven como prototipo para el desarrollo de nuevos medicamentos que sean más eficaces y menos tóxicos (Sharma, *et al.*, 2009). Por lo tanto, se evaluó la actividad antibacteriana del extracto en estudio, con el objetivo de conocer si existen compuestos con actividad antimicrobiana relevante. El descubrimiento de nuevos metabolitos antimicrobianos presentes en las plantas ofrece una alternativa para hacer frente a la resistencia generada hacia los antibióticos por parte de algunas cepas de microorganismos (Suresh, *et al.*, 2016).

Para evaluar la susceptibilidad de microorganismos ante agentes antimicrobianos, existen distintos métodos de laboratorio que pueden ser utilizados (Ramírez y Marin, 2009), tales como los de difusión y dilución (Apu, *et al.*, 2010; Kumar, *et al.*, 2012). La técnica de difusión ha sido ampliamente usada para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana y es actualmente recomendada por el Subcomité de

Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos (Prabuseenivasn, *et al.*, 2006; Raybaudi, *et al.*, 2006). Ésta técnica puede realizarse utilizando discos o pozos. En este trabajo, la evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo por la técnica de difusión en pozo, la elección del método se realizó tomando en cuenta que la técnica con discos presenta varias desventajas; una de ellas es que el papel filtro utilizado está compuesto de celulosa (uniones b-(1-4) de monómeros de glucosa), teniendo muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica (Ramírez y Mrin, 2009), interviniendo directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales, ya que son absorbidos en la superficie del disco, impidiendo la difusión de éstos en el agar, los compuestos no polares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar (Valgas, *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos muestran que el extracto metanólico de *B. trifoliata* no presentó actividad antibacteriana al no inhibir el crecimiento de los microorganismos utilizados para el presente estudio. Estos resultados contrastan con reportes previos en los que se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de 4 plantas pertenecientes al género *Berberis* frente a diversos microorganismos entre los que se encontraban *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis* (Singh, *et al.*, 2007). La diferencia en los resultados obtenidos en cuanto a la actividad antimicrobiana en ambos estudios puede radicar en que la actividad biológica de extractos vegetales se ve influenciada por diversas causas, tales como: momento en que se lleva a cabo la colecta del material vegetal, el contenido de metabolitos presentes en la planta puede variar en función de factores ambientales y fenológicos (Inácio, *et al.*, 2016). El clima, ubicación geográfica, las estaciones del año, la fase fenológica, la carga genética, la temperatura, la altitud, las condiciones de cultivo, la humedad, tipo de suelo, disponibilidad de agua, entre otros factores, pueden afectar significativamente la calidad y / o la cantidad de compuestos bioactivos. (Szakiel, *et al.*, 2011; Pavarini, *et al.*, 2012). Así mismo, la composición química también depende de la estación o período vegetativo de la planta, es decir, antes o después de la floración (Aleksic y Knezevic, 2014).

Otro factor relevante que debe ser considerado es el tipo de cepa utilizada (Dahiya y Purkayastha, 2012). En nuestro caso se utilizaron aislados clínicos, que a diferencia de cepas de referencia, no se encuentran atenuados y son susceptibles a desarrollar continuamente mecanismos de resistencia.

En el bioensayo de letalidad con *Artemia salina* el extracto presentó una  $DL_{50}$  925  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Acorde al criterio de toxicidad en dicho ensayo, se sabe que los extractos derivados de productos naturales con una  $DL_{50} \leq 1000 \mu\text{g} / \text{mL}$  poseen efectos tóxicos. Por lo tanto, los resultados indican mínima o nula posibilidad de toxicidad por parte del extracto metanólico de *B.trifoliata*. Existen reportes en los cuales se ha evaluado la toxicidad de plantas con actividad biológica relevante pertenecientes a la familia Berberidaceae y al género *Berberis* a los cuales pertenece el extracto en estudio. Imanshahidi, *et al.*, (2008) reportaron toxicidad moderada en el extracto de *Berberis vulgaris*; Padjama, *et al.*, (2010) evaluaron actividad biológica y toxicidad del extracto de *Berberis aristata* en donde los resultados indicaron que el extracto evaluado no es tóxico. Los resultados obtenidos en dichos reportes coinciden con los de nuestro trabajo, debiendo considerar que la toxicidad depende de la especie experimental utilizada, dosis y vía de administración (Kamrani, *et al.*, 2017).

## **10.- CONCLUSIONES**

El extracto metanólico de *B. trifoliata* inhibe *in vitro* el proceso de nucleación de cristales de oxalato de calcio, posee capacidad de captura de radicales libres y es ligeramente tóxico. Así mismo se demostró que el tratamiento con extracto metanólico de la planta en estudio reduce la formación de urolitos en ratas a las que se les indujo litiasis mediante la inserción de discos de zinc. Con base a estos resultados, se considera que el extracto de *B. trifoliata* ofrece una alternativa frente a la urolitiasis.

## **11.- PERSPECTIVAS**

Se debe considerar a futuro tratar de aislar compuestos con actividad antiurolítica del extracto crudo e identificarlos por medio de técnicas espectroscópicas. Así mismo, determinar citotoxicidad y genotoxicidad por parte del extracto.

## 12.- REFERENCIAS

Agata Campisi, Rosaria Acquaviva, Roberta Bonfanti, et al. 2014. Antioxidant Properties of *Berberis aetnensis* C. Presl (Berberidaceae) Roots Extract and Protective Effects on Astroglial Cell Cultures. *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 315473, 7 pages. doi:10.1155/2014/315473

Aleksic, V., & Knezevic, P. 2014. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological research*, 169(4), 240-254.

Almeida IF, Fernandes E, Lima JL, Valentão P, Andrade PB, Seabra RM, Costa PC, Bahia MF. 2009. *J Med Food*. Feb;12(1):175-83. doi: 10.1089/jmf.2008.0046. Oxygen and nitrogen reactive species are effectively scavenged by *Eucalyptus globulus* leaf water extract. *J Med Food*. Feb;12(1):175-83. doi: 10.1089/jmf.2008.0046.

Amariles, P., Monsalve, M., Pemberthy-López, C., Giraldo-Alzate, N., Arango-Salazar, N., Gutiérrez-Restrepo, J., Gutiérrez-Henao, F. 2011. Aspectos clínicos y farmacoterapéuticos de la infección del tracto urinario. Revisión estructurada. *CES Medicina*, Sin mes, 135-151.

Amit Kumar, Neeraj Jhadwal, Madan Lal, Manjeet Singh. 2012. Antibacterial activity of some Medicinal Plants used against UTI causing Pathogens. *International Journal of Drug Development & Research*. Vol.4. issue 2.

Anjana Sharma, Rani Verma and Padmini Ramteke, 2009. Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants Used by Tribals Against UTI Causing Pathogens *World Applied Sciences Journal* 7 (3): 332-339.

Apu, A., Muhit, M., Tareq, S., Pathan, A., Jamaluddin, A., & Ahmed, M. 2010. Antimicrobial Activity and Brine Shrimp Lethality Bioassay of the Leaves Extract of *Dillenia indica* Linn. *Journal of Young Pharmacists: JYP*, 2(1), 50–53. <http://doi.org/10.4103/0975-1483.62213>.

Atmani F, Khan SR. 2000. Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization *in vitro*. BJU Int. 85(6):621-625.

Avello Marcia, Suwalski Mario. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea 494. II Sem. Pp: 161- 172.

Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M., 2013, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, Journal of Food Engineering, (4)117, 426-436, ISSN 0260-8774, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.

Azwanida NN. 2015 A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. Med Aromat Plants 4:196. doi:10.4172/2167-0412.1000196

Bashir S, Gilani AH. 2009. Antiuro lithic effect of *Bergenia ligulata* rhizome: an explanation of the underlying mechanisms. J Ethnopharmacol. Feb 25;122(1):106-16. doi: 10.1016/j.jep.2008.12.004. Epub 2008 Dec 11.

Bashir S, Gilani AH. 2011. Antiuro lithic effect of berberine is mediated through multiple pathways. Eur J Pharmacol. Jan 25;651(1-3):168-75. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.10.076.

Bensatal A, Ouahrani MR. 2008. Inhibition of crystallization of calcium oxalate by the extraction of *Tamarix gallica* L. Urol Res. 36:283–287. DOI 10.1007/s00240-008-0157-1.

Biyani CS, Basavaraj DR, Anthony JB, Jon JC. 2007. The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones. EAU-EBU Update Series 5:126–36.

Bours P.H.A, Polak R, Hoepelman A.I.M, Delgado E, Jarquin A, Matute A.J, 2010. International Journal of Infectious Diseases. 14(9):e770-4.

Cao G, Sofic ER, Prior RL. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3426-3431.

Corda S, Laplace C, Vicaut E, Duranteau J. 2001. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated by ceramide. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 24 (6): 762–768.

Dahiya, P., & Purkayastha, S. 2012. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Multi-drug Resistant Bacteria from Clinical Isolates. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 74(5), 443.

Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castañeda-Corral G, Angeles-López GE, Navarrete A, Mata R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* Mar 21;110(2):334-42. Epub 2006 Oct 13.

Devkar RA, Chaudhary S, Adepu S, Xavier SK, Chandrashekar KS, Setty MM. 2015. Evaluation of antiurolithiatic and antioxidant potential of *Lepidagathis prostrata*: A Pashanbhed plant. *Pharm Biol.* (7):1237-45. doi: 10.3109/13880209.2015.1066397.

Dinnimath, Basavaraj M. and Sunil S. Jalalpure. 2015. In silico antiurolithiatic screening of *Aerva lanata* (L.) isolated constituents. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 49, 2, 126—133.

Echevarría-Zarate, Juan, Sarmiento Aguilar, Elsa, Osoro-Plenge, Fernando. 2006. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta Médica Peruana.* 26-31.

Eknoyan G. 2004 History of urolithiasis. *Clin Rev Bone Min Metab* 2:177–185.

Emin Ozbek. 2012. Induction of Oxidative Stress in Kidney. *International Journal of Nephrology.* vol. 2012. Article ID 465897. doi:10.1155/2012/465897.



Estrada Jasso Deyanira, Martínez Torres Jorge, Cruz Rivera Lidia. 2005. Litiasis urinaria en la atención primaria. *Ejournal UNAM*. Vol 48, No 005.

Galani Varsha J, Panchal Rital R. 2014. In vitro Evaluation of *Centratherum anthelminticum* Seeds for Antinephrolithiatic Activity *Homeop Ayurv Med* 2014, 3:1. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-1206.1000145>

González Enguita Carmen. 2009. Litiasis renal. En: *Nefrología clínica*, L. Hernando Avendaño. Ed. Panamericana: Madrid, pp. 567-579

Göknar N, Oktem F, Arı E, Demir AD, Torun E. 2014. Is oxidative stress related to childhood urolithiasis?. *Pediatr Nephrol*. 29(8):1381-6. doi: 10.1007/s00467-014-2773-z.

Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A. 1998. Development of calcium oxalate crystals on urothelium: effect of free radicals. *Nephron*. 78(3):296-301.

Gutierrez-Lugo MT, Barrientos-Benítez T, Luna B, Ramirez-Gama RM, Bye R, Linares E, Mata R. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine*. Mar;2(4):341-7.

Gamarra Hernández G, Martínez Melo J. Litiasis renal. En: *Nefrología*, Borrero J. Montero O. Colombia. CIB; 2003. p. 528-531. Gutiérrez Salinas, José. 2006. ¿Qué sabe usted acerca de... radicales libres?. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, octubre-diciembre, 69-73.

Gürocak S, Kupeli B. 2006. Consumption of historical and current phytotherapeutic agents for urolithiasis: a critical review. *J Urol*. 176 (2): 450-455. [10.1016/j.juro.2006.03.034](http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2006.03.034).

Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, (1stedn), no. 66. Italy: United Nations Industrial Development

Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., & Williamson, E. M. 2012. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. Elsevier Health Sciences.

Hirayama H, Wang Z, Nishi K, Ogawa A, Ishimatu T, Ueda S, Kubo T, Nohara T. 1993. Effect of *Desmodium styracifolium*-triterpenoid on calcium oxalate renal stones. *Br J Urol* 71(2):143–147

Hsu B, Coupar I.M, Ng K. 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem.* 98:317-328.

Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. 2008. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytother Res.* Aug;22(8):999-1012. doi: 10.1002/ptr.2399.

Inácio, Marielle Cascaes, Paz, Tiago Antunes, Bertoni, Bianca Waléria, & Pereira, Ana Maria Soares. 2016. Effect of environmental and phenological factors on the antimicrobial activity of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. roots. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 38(4), 467-473. <https://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.30567>

Itoh Y, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. 2005. Preventive effects of green tea on renal stone formation and the role of oxidative stress in nephrolithiasis *The Journal of Urology.* 173(1:271-275. <http://dx.doi.org/10.1097/01.ju.0000141311.51003.87>.

Jyothilakshmi V, Thellamudhu G, Chinta R, et al. (2014). Beneficial antioxidative effect of the homeopathic preparation of *Berberis vulgaris* in alleviating oxidative stress in experimental urolithiasis. *Forsch Komplementmed* 21:7–12

Kamrani Rad, S., Rameshrad, M., Hosseinzadeh, H. 2017. Toxicology effects of berberis vulgaris (barberry) and its active constituent, berberine: a review. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 20(5), 516-529. Doi: 10.22038/ijbms.2017.8676

Kavanagh J P. 2006. In vitro calcium oxalate crystallisation methods. Urol Res. 34: 139. doi:10.1007/s00240-005-0027-z

Kedare, S. B., & Singh, R. P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology. 48(4):412–422. <http://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>

Khajavi Rad A, Hadjzadeh MA, Rajaei Z, Mohammadian N, Valiollahi S, Sonei M. 2011. The beneficial effect of Cynodon dactylon fractions on ethylene glycol induced kidney calculi in rats. Uro J. 8(3):179–84.

Khan A, Khan SR, Gilani AH. 2012. Studies on the in vitro and in vivo antiurolithiatic activity of Holarrhena antidysenterica. Urol Res 40: 671–81.

Khan A, Bashir S, Khan SR, Gilani AH. 2011. Antiurolithic activity of Origanum vulgare is mediated through multiple pathways. BMC Complement Altern Med. Oct 17;11:96. doi: 10.1186/1472-6882-11-96.

Khan SR. 1997. Animal models of kidney stone formation: an analysis. World J Urol.15:236–43

Khan SR, Joshi S, Wang E, Peck AB. 2014. Regulation of macromolecular modulators of urinary stone formation by reactive oxygen species: Transcriptional study in an animal model of hyperoxaluria. Am J Physiol Renal Physiol. 306(11):1285–F1295.

Knoll T. 2010. Epidemiology, pathogenesis, and pathophysiology of urolithiasis. Eur Urol Suppl. 9(12):802–806.

Kumar, A., Jhadwal, N., Lal, M., Singh, M. 2012. Antibacterial activity of some Medicinal Plants used against UTI causing Pathogens. International Journal of Drug Development and Research.

Li AR, Zhu Y, Li XN, Tian XJ. 2007. Antimicrobial activity of four species of Berberidaceae. *Fitoterapia*. Jul;78(5):379-81. Epub 2007 Apr 11.

Li Y. Guo C. Yang J. Wei J. Xu J. Cheng S. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem*. 96:254-260.

Liu J. Cao Z. Zhang Z. Zhou S. Ye Z. 2007. A comparative study on several models of experimental renal calcium oxalate stones formation in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. Feb;27(1):83-7.

López M, Hoppe B. 2010. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatr Nephrol*. 25(1): 49–59.

Maldonado SO, Jiménez VEN, Guapillo VMRB. 2010. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV* Disponible en: [https://www.uv.mx/rm/num\\_anteriores/revmedica\\_vol10\\_num2/articulos/radicales.pdf](https://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf)

Mandavia DR, Patel MK, Patel JC, Anovadiya AP, Baxi SN, Tripathi CR. 2013. Anti-urolithiatic effect of ethanolic extract of *Pedalium murex* linn. fruits on ethylene glycol-induced renal calculi. *Urol J*. Sep 26;10(3):946-52.

Marcano Deanna, Hasegawa Masahisa, 2002, *Fitoquímica orgánica*, 2ª ed, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Venezuela, Pp: 60- 61.

Martínez Pérez R. 2012. Revisión del tratamiento farmacológico de la urolitiasis. *FAP*. 10(1):18-24.

Martins Ana, Hunyadi Attila, Amaral Leonard. 2013. Mechanisms of Resistance in Bacteria: An Evolutionary Approach. *The Open Microbiology Journal*, 7, (Suppl 1-M4) 53-58.

Meiouet F, El Kabbaj S, Daudon M (2011) In vitro study of the litholytic effects of herbal extracts on cystine urinary calculi. *Prog Urol* 21 (1), 40-47.

Medina Escobedo Martha, Zaidi Mussa, Real de León Elizabeth, Orozco Rivadeneyra Sergio. 2002. Prevalencia y factores de riesgo en Yucatán, México, para litiasis urinaria. *Salud Pública Méx.* Vol. 44(6):541-545.

Mert İlhan, Burçin Ergene, Ipek Süntar, Serkan Özbilgin, Gülçin Saltan Çitoğlu, M. Ayşe Demirel, Hikmet Keleş, Levent Altun, and Esra Küpeli Akkol. 2014. Preclinical Evaluation of Antiurolithiatic Activity of *Viburnum opulus* L. on Sodium Oxalate-Induced Urolithiasis Rat Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* Volume 2014, Article ID 578103, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/578103>

Mittal A, Tandon S, Singla SK, Tandon C. 2016. Mechanistic Insights into the Antilithiatic Proteins from *Terminalia arjuna*: A Proteomic Approach in Urolithiasis. *PLoS ONE* 11(9): e0162600. doi:10.1371/journal.pone.0162600.

Mittal A, Tandon S, Singla SK, Tandon C. 2015. In vitro studies reveal antiurolithic effect of *Terminalia arjuna* using quantitative morphological information from computerized microscopy. *Int Braz J Urol.* 41(5):935-44. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.0547.

Mohanasundari C, Natarajan D, Srinivasan K, Umamaheswari S, Ramachandran A. 2007. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. – a common exotic medicinal plant. *Afric J Biotech.* 6(23):2650–2653.

Morán E, Budía A, Broseta E, Boronat F. 2013. Fitoterapia en Urología. Evidencia científica actual de su aplicación en urolitiasis, dolor pélvico crónico, disfunción eréctil e infecciones urinarias. *Actas Urol Esp.* 37(3):174-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2012.07.004>

Mosquera M. Oscar M. Niño O. Jaime, Correa Yaned M. Buitrago Bejarano Diana Carolina. 2005. Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia et Technica* Año XI, No 27: 231-234.

Mukherjee, S., De, A., Ghosh, P., & Dey, A. 2012. In vitro antibacterial activity of various tissue types of *Dumortiera hirsuta* (Sw) Nees from different altitudes of eastern Himalaya. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, S285-S290.

Naghii MR, Jafari M, Mofid M, Eskandari E, Hedayati M, Khalagie K. 2015. The efficacy of antioxidant therapy against oxidative stress and androgen rise in ethylene glycol induced nephrolithiasis in Wistar rats. *Hum Exp Toxicol* 34(7):744–754. doi:10.1177/0960327114558889

Nguta, J. M., Mbaria, J. M., Gakuya, D. W., Gathumbi, P. K., Kabasa, J. D., & Kiama, S. G. 2012. Evaluation of acute toxicity of crude plant extracts from kenyan biodiversity using brine shrimp, *Artemia salina* L.(Artemiidae). In *Open Conf Proc J* (Vol. 3, pp. 30-4).

Olaribigbe Majekodunmi Stephen. 2015. Review of extraction of medicinal plants for pharmaceutical research. *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. Vol. 3(11):521-527.

Padmaja V. Joshi, Atul A Shirkhedkar, Krishnan Prakash & Vijay L Maheshwari 2011 Antidiarrheal activity, chemical and toxicity profile of *Berberis aristata*, *Pharmaceutical Biology*, 49:1, 94-100, DOI: 10.3109/13880209.2010.500295

Parsaeimehr A, Sargsyan E, Javidnia K. 2010. A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of *Ephedra*. *Molecules*. Mar 11;15(3):1668-78. doi: 10.3390/molecules15031668.

Patel PK, Patel MA, Vyas BA, Shah DR, Gandhi TR. (2012). Antiurolithiatic activity of saponin rich fraction from the fruits of *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. (Solanaceae) against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *J Ethnopharmacol*. Oct 31;144(1):160-70. doi: 10.1016/j.jep.2012.08.043.

Pavarini, D. P., Pavarini, S. P., Niehues, M., & Lopes, N. P. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1), 5-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.002>

Pawar AT, Vyawahare NS. 2016. Antiurolithiatic activity of *Abelmoschus moschatus* seed extracts against zinc disc implantation-induced urolithiasis in rats. *J Basic Clin Pharma* 7:32-8.

Pereira JA<sup>1</sup>, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira IC, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L. 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem Toxicol*. Nov;45(11):2287-95. Epub 2007 Jun 12.

Peschel, W. Sanchez-Rabaneda F. Dn W. Plescher A. Gartzia I. Jimenez D. LamuelaRaventos R. Buxaderas S. Condina C. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem*. 97:137-150.

Pietta P: Flavonoids in medicinal plants. *Flavonoids in Health and Disease*. Edited by: Rive-Evans CV, Packer L. 1998, New York: Marcel Dekker, 61-110.

Pietta PG: Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000, 63(7):1035-1042. 10.1021/np9904509.

Prabuseenivasn S M, Jaya K, Ignacimuthu S. 2006. In vitro antibacterial activity of some plants essential oils. *BMC Complem. Altern. M*. 30; 6- 39.

Puertas Mejia Miguel A., Ríos Salazar John D., Sáez vega Jairo A. 2009. Actividad antioxidante *in vitro* de extractos de tallos de *Polygala* sp., *Rev Cubana Plant Med* v.14 n.4.

Ramasamy selvam. 2002. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. *Urol Res*. 30(1):35-47.

Ramesh S Deoda, Himarshi Pandya, Mital Patel, Kavita N Yadav, Prasad V Kadam, Manohar J Patil. 2012. Antilithiatic Activity of Leaves, Bulb and Stem Of *Nymphaea*

Odorata and Dolichos Lablab Beans. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 3:814-819.

Ramirez, Luz Stella, Marin Castaño, Darwin. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia Et Technica, Agosto-Sin mes, 263-268.

Rathod NR, Biswas D, Chitme HR, Ratna S, Muchandi IS, Chandra R. 2012. Anti-urolithiatic effects of Punica granatum in male rats. J Ethnopharmacol. Mar 27;140(2):234-8. doi: 10.1016/j.jep.2012.01.003. Epub 2012 Jan 20.

Raybaudi M, Mosqueda, Melgar R M J, Martin, Belloso O. 2006. Antimicrobial activity of essential oils on Salmonella enteritidis, Escherichia coli and Listeria innocua in fruit juices J. Food Prod. 69: 1579 -1586.

Revuelta MP, Cantabrana B, Hidalgo A. 1997. Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl<sub>2</sub>. Gen Pharmacol. 29 (5): 847-857. 10.1016/S0306-3623(97)00002-5.

Salman Ahmed, Muhammad Mohtasheemul Hasan and Zafar Alam Mahmood. 2016. Urolithiasis management and treatment: Exploring historical vistas of Greco-arabic contribution. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 5(5): 167 -178.

Salman Ahmed, Muhammad Mohtasheemul Hasan, Zafar Alam Mahmood. 2016. *In vitro* urolithiasis models: An evaluation of prophylactic management against kidney stones. 5 (3): 28-35

Saravanan DM, Amzad H, Salman Z, Gam LH, Zhari I. 2006. The use of principal component analysis and self-organizing map to monitor inhibition of calcium oxalate crystal growth by Orthosiphon stamineus extract. Chemom Intell Lab Syst 81:21–28. doi:10.1016/j.chemolab.2005.09.007

Sarker Satyajit, Latif Zahid, Gray Alexander. 2005. Natural Products isolation. 2<sup>nd</sup> edition. Human press. USA. Pp: 327-329



Sasikala V, Radha SR, Vijayakumari B. 2016. In vitro evaluation of *Rotula aquatica* Lour. for antiurolithiatic activity. *Journal of Pharmacy Research*. 6(3):378- 382.

Selvam R. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. 2002. *Urol Res*. Mar;30(1):35-47.

Sharapin Nikolai. 2000. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. 1ª ed. CYTED. Colombia. Pp: 37- 40.

Sharma, A., Patel, V. K., & Ramteke, P. 2009. Antibacterial activity of medicinal plants against pathogens causing complicated urinary tract infections. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 71(2), 136.

Singh P K. Patil C R. Harlalka G V. Gaud N P. 2010. Zinc disc implantation model of urinary bladder calculi and humane endpoints. *Laboratory Animals*. 44: 226–230. DOI: 10.1258/la.2010.009084.

Singh, M., Srivastava, S., & Rawat, A. K. S. 2007. Antimicrobial activities of Indian *Berberis* species. *Fitoterapia*, 78(7), 574-576.

Sivasankar, P, Manivasagan, P, Vijayanand, P, Sivakumar, K, Sugesh, S, Poongodi, S, Maharani V, Vijayalakshmi S, Balasubramanian, T. 2013. Antibacterial and brine shrimp lethality effect of marine actinobacterium *Streptomyces* sp. CAS72 against human pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(4):286–293. [http://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60071-7](http://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60071-7)

Stevens Neil. 2003. *El té verde*. 2ª edición, editorial Sirio, España, Pp. 65.

Sultana B, Anwar F, Ashraf M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*. 14(6):2167-80. doi: 10.3390/molecules14062167.

Suresh Babu Sayana, Chitra C Khanwelkar, Venkat Rao Nimmagadda, Vasant R Chavan, Ramesh BH, Naveen Kumar S. 2014. Evaluation of Antiurolithic Activity of

Alcoholic Extract of Roots of *Cissampelos Pareira* in Albino Rats. *J Clin Diagn Res.* 8(7): HC01–HC04. doi: 10.7860/JCDR/2014/9604.4528

Suresh Mickymaray, Mohammad Saleh Al Aboody, Pradipta Kumar Rath, Panneerselvam Annamalai, Thajuddin Nooruddin. 2016. Screening and antibacterial efficacy of selected Indian medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 6(3):185-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.005>.

Syahmi AR, Vijayarathna S, Sasidharan S, Latha LY, Kwan YP, Lau YL, Shin LN, Chen Y. 2010. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *Elaeis guineensis* Jacq., (oil palm leaf) methanol extract. *Molecules.* Nov 10;15(11):8111-21. doi: 10.3390/molecules15118111.

Szakiel, A., Paćzkowski, C., & Henry, M. 2011. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews,* 10(4), 471-491. DOI: 10.1007/s11101-010-9177-x.

Thakur I, Thakur A, Uppal G, Sitapara N. 2013. In vitro and in vivo models of urolithiasis. *International Journal of Pharmaceutical Research.* 5(1):1-5.

Thamilselvan S, Menon M. 2005. Vitamin E therapy prevents hyperoxaluria-induced calcium oxalate crystal deposition in the kidney by improving renal tissue antioxidant status. *BJU Int.* Jul;96(1):117-26.

Topal U, Sasaki M, Goto M, Otles S. 2008. Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation. *Nov-Dec;*59(7-8):619-34.

Torres, P., Requena, I., Padron, A., De pace, C. (2007). Resistencia antibiótica de bacterias causantes de infección del tracto urinario. **Saber. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente**, Julio-Diciembre, 150-158.

Touhami M, Laroubi A, Elhabazi K, Loubna F, Zrara I, Eljahiri Y, Oussama A, Grases F, Chait A. 2007. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. *BMC Uro.* 7(18).

Trinchieri, A. 2013. Urinary calculi and infection. *Urologia*, 81(2), 93-98.

Ullah, M. O., Haque, M., Urmi, K. F., Zulfiker, A. H. M., Anita, E. S., Begum, M., & Hamid, K. 2013. Anti-bacterial activity and brine shrimp lethality bioassay of methanolic extracts of fourteen different edible vegetables from Bangladesh. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(1), 1–7. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60015-5](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60015-5)

Valencia Ortiz Ciria. 1995. fundamentos de fitoquímica. 1 ed. Trillas. México. Pp: 11-18

Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380.

Valko Marian, Leibfritz Dieter, Moncol Jan, Cronin T.D. Mark, Mazur Milan, Joshua Telser, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44–84.

Vallano Antonio, Rodríguez Dolores , Barceló M.<sup>a</sup> Estrella, López Anna, Cano Ángel, Viñado Belén, Diogene Eduard. 2006. Sensibilidad antimicrobiana de los uropatógenos y resultados del tratamiento antibiótico de las infecciones urinarias en atención primaria. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Volume 24, Issue 7, Pages 418-425.

Vyas N, Argal A. 2013. Antiurolithiatic Activity of Extract and Oleanolic Acid Isolated from the Roots of *Lantana camara* on Zinc Disc Implantation Induced Urolithiasis. *ISRN Pharmacol.* May 15;2013:951795. doi: 10.1155/2013/951795.

Yamaguchi S. Wiessner JH. Hasegawa AT. Hung LY. Mandel GS. Mandel NS. 2005. Study of a rat model for calcium oxalate crystal formation without severe renal damage in selected conditions. *Int J Urol.* 12:290-8.

Yuruk E, Tuken M, Sahin C, Kaptanagasi AO, Basak K, Aykan S, Muslumanoglu AY, Sarica K. 2016. The protective effects of an herbal agent tutukon on ethylene glycol and zinc disk induced urolithiasis model in a rat model. *Urolithiasis.* Nov;44(6):501-507.

Zanetti, G., Paparella, S., Trinchieri, A., Prezioso, D., Rocco, F., & Naber, K. G. 2008. Infections and urolithiasis: current clinical evidence in prophylaxis and antibiotic therapy. *ARCHIVIO ITALIANO DI UROLOGIA ANDROLOGIA*, 80(1), 5.

### **13.- RESUMEN BIOGRÁFICO**

Raymundo Alejandro Pérez Hernández

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: ACTIVIDAD ANTIUROLÍTICA, CAPACIDAD DE CAPTURA DE RADICALES LIBRES Y TOXICIDAD DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Berberis trifoliata*.

Campo de estudio: Ciencias de la Vida

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México el 13 de junio de 1988, hijo de Francisca Hernández Moreno y Raymundo Pérez Gaytán.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2011.

Experiencia profesional: Docente Asignatura A de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2015, Encargado de Pruebas Planta Topo Chico; Analista de Procesos Planta Bokados. ARCA CONTINENTAL. 2011- 2012.