



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**Capacidad disolutiva sobre cálculos biliares de colesterol
de cuatro especies medicinales *in vitro***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE
PLANTAS MEDICINALES**

PRESENTA:

Biól. Luis Enrique Valdivia Mares

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Laura Patricia Alvarez Berber

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2021

Capacidad disolutiva sobre cálculos biliares de colesterol de cuatro especies medicinales *in vitro*



Postulante:

Luis Enrique Valdivia Mares.

Comité Revisor de Tesis:

Dra. Laura Patricia Alvarez Berber (directora), Dra. Verónica Rodríguez López,
Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa, Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez y Dr. Manases
González Cortázar.

**MAESTRIA EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE PLANTAS
MEDICINALES
(MIDPM)**

**CIQ-CEIB
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
2021**

AGRADECIMIENTOS

A mi Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por hacer posible realizar mis estudios de posgrado, por el apoyo invaluable de los investigadores del Centro de Investigaciones Químicas y del Centro de Investigaciones en Biotecnología y del que fungieron como directora, asesores y profesores durante mi formación académica en la maestría.

A la coordinación de la MIDPM de la UAEM por creer en mí, por facilitar la continuidad de estudios de posgrado en un área tan importante con una maestría única en el país. Gracias Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa.

A la Dra. Laura Patricia Alvarez Berber por su paciencia, invaluable apoyo, dirección de la tesis y sus consejos para poder mejorar mi objetivo académico, mil gracias.

A todos los que formaron el cuerpo de asesores de tesis, a la Dra. Verónica Rodríguez López, al Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa, al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez y al Dr. Manases González Cortázar, que con su acertado asesoramiento se fueron solucionando y afinando los aspectos de la experimentación y la redacción de este documento.

A todos los maestros del programa MIDPM, gracias por toda su experiencia y conocimientos transmitidos durante las clases, que resultaron esenciales para mi formación académica.

A todos mis compañeros de la maestría por su apoyo y amistad, siempre tendrán un amigo en su servidor.

Al Dr. Fabián A. Zaragoza R. y la Dra. Ofelia Vargas P. (CUCBA, U de G), por su apoyo en los análisis estadísticos, para procesar las accesiones al herbario.

Al Dr. Ismael Espejo (Lab. de Patología Espejo), al Dr. Benjamín Cárdenas (Nvo. Hospital Civil, U de G), a la Dra. Mónica Jasso (Lab. Análisis Clínicos y Patológicos Valles) por la donación de los cálculos biliares.

DEDICATORIA

A mis padres, María de la Luz e Irineo (†), por su apoyo incondicional, por creer en mí, porque estén orgullosos siempre.

A mi esposa Gloria, a mis hijos Luis E., Jesús E. y Juan Pablo, que son la razón de mi esfuerzo, la fuerza que me mueve todos los días.

A mis hermanos, por todo su apoyo y cariño, por esos momentos en familia que son el remedio para el alma.

A mis amigos, por siempre estar cerca de mí, sobre todo en los momentos de incertidumbre, apoyarme y ser honestos conmigo siempre.

ÍNDICE

Índice de cuadros.....	1
Índice de figuras.....	2
Resumen.....	3
Introducción.....	5
Antecedentes:	
a) Problemas biliares y la litiasis vesicular.....	6
b) Causas principales de la litiasis vesicular.....	7
c) Los cálculos de colesterol.....	9
d) Terapéutica convencional para tratar la litiasis biliar.....	10
e) Importancia de las plantas como terapéutica de la MT.....	11
f) Descripción monográfica y etnobotánica de las especies:	
<i>Eryngium carlinae</i> F.(Delar).....	14
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.....	16
<i>Raphanus sativus</i> var. <i>niger</i> Mill.....	18
<i>Solanum lycopersicum</i> L.....	20
g) México como centro favorable para estudios sobre plantas medicinales.....	22
h) Justificación del estudio.....	23
Hipótesis.....	24
Objetivos:	
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos.....	25
Materiales y método:	
a) Área de estudio.....	26
b) Objeto de estudio y selección de las especies.....	26
c) Obtención del material vegetal y su identificación.....	27
d) Obtención de extractos y su estandarización.....	27
e) Rendimiento de los extractos.....	29
f) Selección de los cálculos de colesterol.....	29
g) Estandarización de los cálculos seleccionados.....	30
Fase de experimentación:	
a) Descripción de las pruebas de disolución <i>in vitro</i>	31
Análisis estadístico de los datos.....	34
Resultados y discusión.....	35

Conclusiones.....	44
Referencias.....	46
Apéndice I (Cuadro #1).....	53

Índice de cuadros.

Cuadro #1.- Matriz general de datos: la masa inicial, masa final, diferencia de masa, tasa de disolución en los tubos de los tratamientos y testigos.....	37
Cuadro #2.- Análisis de ANOVA con permutaciones de los resultados obtenidos en las pruebas de disolución, significancia (P<0.05).....	39
Cuadro #3.- Promedios de distancias Euclidianas comparando los extractos herbales y testigos entre sí.....	39
Cuadro #4.- Pruebas pareadas de Monte Carlo, utilizando distancias Euclidianas y permutaciones de las diferencias de masa en los cálculos, significancia (P<0.05).....	40
Cuadro #5.- Análisis de similitudes contra todas las muestras, datos de masa en distancias Euclidianas (Apéndice I).....	54

Índice de figuras.

Figura 1.- Diversidad de los cálculos vesiculares colectados.....	8
Figura 2.- Agrupación de cálculos por tipo según Yamagata y Maki.....	8
Figura 3.- Cálculos de colesterol y su estandarización de masa.....	9
Figura 4.- <i>Eryngium carlinae</i> F. (Delar).....	14
Figura 5.- <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.....	17
Figura 6.- <i>Raphanus sativus var. niger</i> Mill.....	20
Figura 7.- <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	21
Figura 8.- Disposición in vitro de los cálculos selectos para las pruebas.....	31
Figura 9.- Pruebas de disolución en sistema constante de temperatura.....	33
Figura 10.- Gráfico bidimensional del análisis de similitudes (resemblanza).....	41
Figura 11.- Gráfico de caja de los tratamientos y testigos, en distancias Euclidianas.....	41
Figura 12.- Terpenos, saponinas, triterpenoides.....	42
Figura 13.- Esteroles y colesterol.....	43
Figura 14.- Flavonolignanos isoméricos, silimarinas, silibinina, isosilibinina, silydianina y silycristina.....	43
Figura 15.- Tetraterpenoides y licopeno.....	44

Capacidad disolutiva sobre cálculos biliares de colesterol de cuatro especies medicinales *in vitro*

Resumen.

La litiasis biliar es un problema global de salud pública y cerca del 20% en el país pueden presentarla, padeciendo problemas digestivos, inflamación y dolor cuando es sintomática, donde, la cirugía radical por colecistectomía sigue siendo el tratamiento convencional más recurrente. Este estudio evaluó la efectividad de cuatro especies utilizadas tradicionalmente para tratar la colelitiasis mediante un modelo de disolución *in vitro*.

Para evaluar el potencial de disolución de cálculos biliares, se evaluaron extractos hidroalcohólicos al 50% de las especies *Eryngium carlinae* (yerba del sapo), *Raphanus sativus* var. *niger* (rábano negro), *Silybum marianum* (silimarina) y *Solanum lycopersicum* (jitomate común). Se utilizaron 30 cálculos formados mayormente por colesterol, seleccionados de un total de 1,597 obtenidos por colecistectomía. Los cálculos se clasificaron por su perfil siguiendo el criterio de la Guía Japonesa para el estudio de los Cálculos Biliares. Para mejorar la solubilidad y asemejar las condiciones de la vesícula biliar, la temperatura de prueba fue de entre 35° y 37°C y la renovación de los extractos cada hora por 20 h. Se utilizaron etanol al 50% y éter etílico 99% como testigos negativo y positivo, respectivamente. La tasa de disolución de los medios fue estimada como la reducción en la masa de los cálculos tratados (g/ml/h). Los estudios estadísticos (PERMANOVA, Similitudes, Monte Carlo) refieren la existencia de diferencias altamente significativas ($P= 0.0001$) entre testigos y extractos: una mayor tasa de disolución de los extractos de silimarina, yerba del sapo y rábano negro (0.00280-0.00285 g/ml/h) sobre el jitomate común (0.00270 g/ml/h) y de éstos sobre el etanol (0.00255 g/ml/h), pero 6 veces menor capacidad de todos a la del éter etílico (0.00715 g/ml/h). Estos resultados podrían contribuir al desarrollo de una opción más inocua, económica y no invasiva como pudiera ser un producto a base de yerba del sapo, silimarina y el rábano negro como tratamiento oral para la colelitiasis.

Abstract.

Gallstones are a global public health problem that affect about 20% of Mexican population. The radical cholecystectomy surgery remains the most conventional treatment. This study evaluates the effectiveness of four plants traditionally used to treat cholelithiasis using an in vitro dissolution model.

To evaluate the dissolution potential, 50% hydroalcoholic extracts of the species *Eryngium carlinae* (yerba del sapo), *Raphanus sativus* var. niger (black radish), *Silybum marianum* (silymarin) and *Solanum lycopersicum* (common tomato) and 30 stones formed by $\geq 70\%$ cholesterol selected from 1,597 obtained by cholecystectomy, were used. The stones were classified by their profile following the criteria of the Japanese Guide for the Study of Gallstones. To improve solubility and resemble gallbladder conditions, the test temperature was between 35° to 37° C, and the extracts were renewed every hour for 20 h. 50% ethanol and 99% ethyl ether were used as negative and positive controls, respectively. The dissolution rate of the media was estimated as the reduction in the mass of the treated stones (g/ml/h). Statistical studies (PERMANOVA, Resemblance, Monte Carlo) report the existence of highly significant differences ($P = 0.0001$) between controls and among extracts: a higher dissolution rate of silymarin, yerba del sapo and black radish extracts (0.00280-0.00285 g/ml/h) on common tomato (0.00270 g/ml/h) and of these on ethanol (0.00255 g/ml/h), but 6 times lower capacity of all of them that ethyl ether (0.00715 g/ml/h). These results could contribute to the development of a safer, cheaper and less invasive therapy, such as a product containing yerba del sapo, silymarin and black radish as oral treatment for cholelithiasis.

Introducción.

La colelitiasis refiere el conjunto de padecimientos inflamatorios en la vesícula biliar derivados de la formación de cálculos biliares, entre sus causas se encuentran la hipercolesterolemia biliar y plasmática (Gomez 2007). La colelitiasis es un padecimiento común a nivel global y alcanza del 12-20% en adultos, con una incidencia geográficamente diferencial debido a causas ambientales y dietéticas (Lin et al. 1994, Gomez 2007, IMSS 2010). En México, su prevalencia es de alrededor del 8.5% en hombres y 20.5% en mujeres (Gonzalez et al. 2005).

Los cálculos o litos biliares son agregados derivados de lodos biliares. Existen varios tipos de cálculos debido a su etiología (puros, mixtos, combinados y pigmentados), su contenido puede ser de colesterol, carbonatos, bilirrubinas, proteína y fosfatos; aunque aquellos litos de colesterol puro son raros (10%), es común encontrar una buena proporción de colesterol en todos los tipos (Yamagata S & Maki T. 1986, Campos 1992).

El tamaño del cálculo y su etiología son relevantes, porque condicionan el tipo de tratamiento que se utilizará entre un número variado de ellos (Kim et al. 2003, Gomez 2007); el más conocido es la colecistectomía laparoscópica, que es la terapia médica convencional más recurrente (Gomez 2007), pero conlleva efectos indeseables, ya que altera permanentemente en lo general la digestión (Tint et al. 1982, Attili et al. 1995). Otra técnica quirúrgica menos frecuente es la esfinterotomía para drenar cálculos menores (A.C.S. 2015). Existen terapias médicas menos invasivas, que se han desarrollado para disolver o triturar los cálculos biliares usando solventes orgánicos como el metil terbutil éter (MTBE) y el éter etílico, entre otros solventes o mediante técnicas que emplean ondas sónicas de choque como la litotricia biliar extracorpórea (ESWL) o el uso de láser sobre los cálculos, que parece tener menores efectos adversos (Fromm et al. 1983, Erlinger et al. 1984, Allen et al. 1985, O'Leary & Johnson 1993, Schoenfield & Marks 1993, Leuschner et al. 1994); Además, se han desarrollado tratamientos orales no invasivos con ác. quenodeoxicólico (CDCA) y ác. ursodeoxicólico (UDCA) en terapias a mediano plazo; todas estas técnicas han ido modificándose

con el tiempo o han quedado en desuso, debido a la falta de eficacia, diversos grados de riesgo, efectos colaterales, recurrencia, toxicidad o costo excesivo (Mack et al. 1981, Ellis et al. 1984, May et al. 1993).

Además, los tratamientos convencionales no invasivos parecen ser una solución temporal, debido a que una gran parte de los pacientes tratados presentan reincidencia (Gomez 2007) y por ello, recurran a la cirugía. Debido a los inconvenientes que presentan los tratamientos médicos convencionales señalados con anterioridad, el responsable de la salud como el paciente frecuentemente opta por una alternativa más inocua, como lo es la medicina tradicional herbolaria (MTH), la cual, con el tiempo, ha ido incrementando su preferencia en la terapéutica global (Aguilar y Martínez 1993, Kaur et al. 2013). Por ello, en este estudio se probó la acción disolvente sobre cálculos de colesterol, de los extractos hidroalcohólicos de cuatro especies que se utilizan tradicionalmente para tratar la colelitiasis y que se ha reportado (Castro-Torres et al. 2012, 2013, 2014 y 2017) participan en la reducción metabólica del colesterol: *Eryngium carlinae* Delar. (yerba del sapo), *Raphanus sativus* var. *niger* (Mill.) J. Kern. (rábano negro), *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silimarina) y *Solanum lycopersicum* L. (jitomate común), con el objeto de conocer si adicionalmente poseen acción disolvente por contacto directo.

Antecedentes.

a) Los problemas biliares y la litiasis vesicular.

Los problemas biliares son una causa común en la consulta clínica del servicio médico y representan un problema de salud a nivel global (Campos 1992, Gomez 2007). En México no es la excepción, se presenta en un 20% de la población en alguna etapa de su vida (IMSS 2010). Los problemas biliares son muy variados, desde las dificultades para una colecinesis adecuada, que causa una pobre digestión de lípidos y las consecuencias de ello, hasta la formación de agregados conocida como litiasis biliar, que puede ocasionar desde molestias como dolor e inflamación en las vías biliares, hígado y vesícula, hasta un daño pancreático por

obstrucción de los conductos colédoco o pancreático, provocando serias complicaciones o la muerte del paciente por pancreatitis (Gomez 2007).

La litiasis biliar puede ocurrir en cualquier órgano de las vías biliares, como es el hígado, el conducto hepático, colédoco y en la vesícula biliar. Cuando se presenta en la vesícula biliar se le denomina litiasis vesicular, que es el tipo más común en la consulta médica (Gomez 2007, IMSS 2010).

b) Causas principales de la litiasis vesicular.

Las causas de la litiasis vesicular son la hipercolesterolemia biliar, hiperplasia e hipocinética vesicular (Campos 1992, Avinash et al. 2017) y los factores de riesgo son el sobrepeso, la pérdida brusca de peso, el embarazo, el uso de anticonceptivos (estrógenos), la diabetes, la hiperlipidemia por colesterol, las drogas hipolipemiantes (clofibrato), gastrectomías con vaguectomía y los niveles elevados de colesterol en sangre (Gomez 2007). Además, pueden coincidir factores genéticos relacionados al metabolismo de la lecitina, las prostaglandinas y producción anormal de moco, así como problemas funcionales en el fluido y transporte de los electrolitos (Campos 1992). En su formación, inicialmente los cálculos son pequeños, por lo que a veces, se utiliza la expresión lodo biliar para referirse a partículas con diámetro inferior o igual a 2 mm. (Gomez 2007). Los cálculos vesiculares son variados como se puede observar en la Figura 1 y pueden estar formados por sustancias diversas como el colesterol, fosfatos, bilis y lecitina entre otras, lo que dificulta una identificación adecuada en relación a su composición y que para una identificación química, fuera necesario en todos los casos, el uso de un equipo de química analítica para HPLC o de análisis por Resonancia Magnética; por este inconveniente, un equipo japonés, conformado por especialistas para el estudio de los cálculos biliares, desarrolló en los 80's. una guía práctica que permite de forma rápida, clasificar los litos considerando su aspecto exterior (corte, color, forma), como se aprecia en la Figura 2, infiriendo así sobre su composición química; esta guía es utilizada en laboratorios de patología clínica en Asia y en países del Occidente, para la identificación y clasificación de

los cálculos biliares provenientes de colecistectomías (Yamagata S & Maki T. 1986, Kim et al. 2003).



Figura 1.- Diversidad en los tipos y tamaños de cálculos vesiculares colectados para este estudio, desde <1mm hasta > 50mm de longitud, con cálculos mixtos, combinados, de colesterol puro y aquellos no identificados, una vez retiradas las impurezas.



Figura 2.- Clasificación de los cálculos biliares colectados infiriendo su naturaleza y basada en criterios de la Guía Japonesa para el estudio de los cálculos biliares (Yamagata & Maki 1986), foto del autor.

c) Los cálculos de colesterol.

La formación de cálculos ricos en colesterol se presenta solo en la vesícula biliar y se debe principalmente a dos condiciones fundamentales: la precipitación de depósitos minerales o de ácidos biliares formados a partir del colesterol, causando una hipersaturación de colesterol en bilis y los defectos en la nucleación, por lo que se hipotetiza que, los ácidos biliares de cadena corta por una acción disgregante solubilizan el colesterol en la solución biliar impidiendo su precipitación (Tepperman et al. 1964). La bilis humana, por su composición lipídica, reside en el límite de la solubilización micelar, lo que conlleva una gran facilidad para sobrepasar ese límite y generar este tipo de cálculos. Los cálculos de colesterol (puros y combinados) con concentraciones relevantes entre 70-95% serán los de interés en este estudio, ya que su ocurrencia cercana del 80% de los pacientes enfatiza la importancia de su estudio (Kim et al. 2003). La Figura 3 muestra la gran diversidad de tamaños y composición que pueden presentarse en los cálculos de este tipo.



Figura 3.- Cálculos biliares formados principalmente por colesterol, seleccionados de colectas en 2020, se observa la diversidad de tamaño y forma inicial (izquierda), y la uniformidad que se logró después de la estandarización de su masa (derecha), previo a las pruebas de disolución. Fotos del autor.

d) Terapéutica convencional para tratar la litiasis biliar.

En la terapéutica de la medicina convencional, la colecistectomía es el tratamiento médico más recurrente. Se estima que, en el país se realizan alrededor de 500 mil colecistectomías anualmente (IMSS 2010), pero esta cirugía radical conlleva efectos indeseables, ya que altera permanentemente en lo general, la digestión de las proteínas, vitaminas liposolubles y lípidos, debido a una insuficiencia de bilis en el duodeno y causando una pobre acción enzimática de la pancreatina (Tint et al. 1982, Attili et al. 1995). Por otro lado, con el objeto de dar una solución al problema de colelitiasis de una forma menos radical, durante el siglo pasado e inicios de éste, se han probado un sinnúmero de sustancias de diversos grupos orgánicos como los solventes volátiles, para disolver los cálculos de colesterol, el metil terbutil éter (MTBE), éster etílico del ácido propiónico, mono-octanoína, colato de sodio, conjugado de ácido cólico, heparina y cloroformo con diversos grados de eficacia y toxicidad. En 1891 Walker reportó una terapia tópica con éter etílico (EE) para disolver piedras biliares y durante 80 años prosiguieron conjuntamente combinando con cloroformo y aceite de olivo, aplicados a través de un conector de cristal "T", para su recirculación directamente en la vesícula con pacientes *in vivo*, con el fin de disolver por contacto los cálculos de colesterol (Pribam 1939); estas terapias descritas han mostrado diversos grados de baja efectividad o excesiva irritación, toxicidad, malestar, calcificación y peligro de inflamabilidad, por lo que cayeron en desuso en los 70's (Pitt et al. 1989). El éter etílico (EE) es un excelente agente disolvente de colesterol, pero sus efectos colaterales muy dañinos acabaron con su amplia aceptación. El éter vaporiza a temperatura corpórea, así que 1 ml líquido produce 2.24 ml de vapor que fácilmente penetra los tejidos adyacentes; mezclas de éter con aceite de olivo se han probado sin algún cambio significativo en eficacia o toxicidad agregando dicho aceite (Pitt et al. 1989, Vergunst et al. 1991). La hoja de seguridad industrial para la normativa europea lo refiere como de toxicidad oral aguda de categoría 4: nocivo en caso de ingestión, en dosis de 500 mg/kg y un riesgo de salud 2: Peligroso (ThermoFisher Sci. 2020).

Después de que los solventes inorgánicos quedaran en desuso, surgieron nuevas esperanzas para los tratamientos médicos convencionales no invasivos, como fueron las terapias orales con ácidos biliares, los más utilizados fueron el ácido quenodeoxicólico (CDCA) y su 7-β-hidroxi epímero, el ácido ursodeoxicólico (UDCA); la acción terapéutica de estos ácidos biliares se debe a dos propiedades complementarias: la desaturación biliar de colesterol y una acción litolítica directa por disolución. La inhibición de la enzima 3-HMGCoA reductasa por el CDCA bloquea la síntesis hepática de colesterol, lo que resulta en una menor disminución de su concentración en bilis, mientras que el UDCA reduce la absorción intestinal del colesterol a la vez que licua los cristales de colesterol superficiales en los cálculos (Gomez 2007). Desafortunadamente, las terapias orales con el uso del CDCA y UDCA requieren de un tratamiento de mediano a largo plazo, elevando el costo final, que va de entre 6 meses a 4 años, con una efectividad menor del 50% en pacientes analizados por radiotransparencia (Allen et al. 1985), con costos iniciando en los \$1,300.00 USD a más de \$1,600.00 USD por año y sobrellevando un riesgo de toxicidad e irritación tisular (Pitt et al. 1989, Vergunst et al. 1991, Duca et al. 2003, A.C.S. 2015, Heuman 2017); el costo de los tratamientos orales con ácidos biliares aunque pudiera ser elevado, resultaría comparativamente bajo al de una colecistectomía (\$6,000.00 - \$10,000.00 USD) .

e) La importancia de las plantas como parte de la terapéutica de la Medicina Tradicional.

Por otro lado, se estima que el hombre desde su origen ha dependido de las especies vegetales para su supervivencia, incluso de aquellas de uso medicinal (Casas et al. 1996, Casas et al. 2007, Ramawat & Mérillon 2008, Lira et al. 2009). Antecedentes sobre su aprovechamiento son remotos, desde los primeros restos arqueológicos como los petroglifos Göbekli Tepe en Turquía (14,000 Antes de nuestra Era), hasta las referencias contenidas en libros sagrados como el Talmud y la Biblia (2,332 - 1,468 A.E.). En México se encontraron plantas medicinales en

restos arqueológicos que datan de 2,300 al 510 A.E. en las Tumbas de Tiro, los Jardines de Moctezuma y referencias prehispánicas en los Códices Florentino y Cruz-Badiano (Gordon 1977; Zohary 1982; Savnur 1984; Brown 1995; Chevallier 1996; Palevitch & Yaniv 2000; Lev 2002; Ramawat Y Mérillon 2008; Vallejo et al. 2009; Cirilo et al. 2011; Lee 2011). Por ello, las especies de plantas medicinales han sido fundamentales en la práctica histórica de la Medicina Tradicional (MT) a nivel global.

La Medicina Tradicional Herbolaria (MTH) con el uso de especies medicinales en la elaboración de tés, tisanas, tinturas, extractos, maceraciones, jarabes o cápsulas, ha tratado problemas biliares relacionados con la formación de cálculos como la aglutinación y precipitación del colesterol en la bilis, disminuyendo así la propensión a la colelitiasis, además de mejorar la colecinesis y el flujo en las vías biliares (colagogo); se considera que los fito-activos actúan sobre el sistema de producción biliar y la secreción, ejerciendo acción en varias rutas como la dependiente de la colecistocinina y la contracción independiente de la vesícula, hasta la regulación de la síntesis de los ácidos biliares, la estimulación de la bomba exportadora de las sales biliares, el sistema transportador de la proteína resistente a múltiples fármacos y al flujo osmótico biliar (Spiridonov 2012); aunado a esto, existen las plantas de efecto colerético (aumento de la producción biliar), resultando con ambos efectos la depuración del contenido vesicular y la regulación del proceso digestivo, aunque en ocasiones, la efectividad de los tratamientos naturistas pareciera ser limitada e incierta (Crocenzi & Roma 2006, Spiridonov 2012, Wanjari et al. 2016, Avinash et al. 2017).

En Meso y Sudamérica, la MT utiliza varias especies para tratar la colelitiasis, colecistitis e ictericia (Fernandez et al. 2003, UNAM 2009), como la aceitilla blanca (*Bidens odorata*, *B. pilosa*), anawayu (*Adesmia miraflorensis*), berro (*Nasturtium officinale*). Ramírez (1998) afirma que utilizando partes secas de diente de león (*Taraxacum officinale*), boldo (*Peumus boldus*), cardo mariano (*Silybum marianum*) y alcachofa (*Cynara scolymus*) debido a la acción de los terpenos (saponinas), se logra la disolución oral de los cálculos biliares, pero agregando a éstas ácidos biliares (UDCA o CDCA) se mejora su efectividad.

Además, vegetales llamados “alimentos funcionales”, como la verdolaga común (*Portulaca oleracea*) de origen Indú, la verdolaga de playa (*Trianthema monogyna* y *T. americana*), el jitomate (*Solanum lycopersicum*) y la uva (*Vitis vinífera*) actúan en la disolución del fosfato de calcio y colesterol, fueron utilizados por Das & Verma (2008) probando su eficacia comparativamente a la de ácidos biliares como CDCA (ác. chenodeoxicólico) y UCDA (ác. ursodeoxicólico), obteniendo la disolución de cálculos biliares de colesterol. Fetrow & Ávila (2000) además refieren que la uva de Oregon o Mahonia (*Mahonia aquifolium*, sin. *Berberis aquifolium*) es recomendada por médicos botánicos para la colelitiasis (Moga 2003). El pega-ropa o pegapega (*Desmonium canum*, sin. *D. incanum*) que es además utilizado en China para este fin, Conabio y la Biblioteca Digital de la MT Mexicana de la UNAM reconocen su uso medicinal pero no para problemas biliares (Conabio 2009, UNAM 2009).

Así también, es recomendada una dieta rica en vegetales conteniendo alimentos funcionales, como refieren Mc Cleary & Prosky (2000), éstos son útiles para prevenir un amplio rango de enfermedades como gripes, problemas intestinales, diverticulitis, colitis, diabetes obesidad, cáncer de colon y litiasis biliar. Vidyashankar et al. (2010) señalan que una dieta frecuente agregando el ajo y la cebolla, reduce considerablemente la aparición de cálculos biliares de colesterol y disminuye la gravedad de los síntomas si ya se padecen, debido a que su consumo regular ocasiona cambios en la concentración de lípidos biliares. Aun y cuando los alimentos funcionales no han sido estudiados a profundidad, el rol que juegan como factores atenuantes y regresivos de los cálculos de colesterol es bien conocido en el saber popular. En especies como la cebolla, ajo, fenogreco, pimiento morrón y cúrcuma se ha estudiado ampliamente el efecto hipocolesterolémico bajo condiciones experimentales, por lo que su uso pudiera considerarse como preventivo (Vidyashankar et al. 2010, Abdel et al. 2014).

f) Descripción monográfica, etnobotánica y rasgos de interés bioquímico de cuatro especies medicinales utilizadas para tratar los problemas biliares.

f 1.- *Eryngium carlinae* F.(Delar), Yerba del Sapo, Hierba del Sapo, Kokixukurhi (purépecha), motita de sapo, estrellita, mosquitas, perejil del monte, cabezona (Figura 4).

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asteranae Takht.

Order: Apiales Nakai

Familia: Apiaceae Lindl.

Género: *Eryngium* L.

Hierba que en época de floración llega a medir hasta 25 cm de altura. Sus hojas basales arrosetadas, son alargadas y presentan un borde dentado y espinoso, con apariencia de lanzas. Las flores nacen en varios tallos que terminan en grupos de flores numerosas, de color azul o violáceo. Planta originaria de México de ocurrencia silvestre, se presenta en clima templado, entre 1700 y 2400 msnm, aunque se ha observado también en climas tropicales casi a nivel del mar; crece en terrenos de cultivo abandonados, a orilla de caminos y es común en vegetación perturbada de bosque mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de encino-pino. En la región huasteca donde fue colectada crece de forma silvestre, en potrero con pastizal de suelo arcilloso, clima tropical (caluroso-húmedo).

La parte aérea de la planta se utiliza en padecimientos del riñón. Además, el té se usa contra la congestión del pecho, el dolor de espalda y el de huesos. La parte aérea es usada en lavados vaginales y punzadas en el oído. La planta completa hervida se usa para combatir algunas enfermedades venéreas y para casos de fiebre y prurito; se utiliza también para trastornos gastrointestinales, contra la inflamación y los dolores de estómago e intestino, para la bilis y contra la mordedura de serpientes venenosas (Argueta et al. 1994).

El Dr. Erick Estrada y J. L. Morales (2012) en su libro “La prodigiosa yerba del sapo” señalan que *Eryngium carlinae* es efectiva para eliminar problemas de salud como hipercolesterolemia, cálculos biliares y renales debido al alto contenido de saponinas que actúan disolviendo los agregados lipídicos biliares, mediante tratamientos orales. Estudios más recientes señalan que su principal metabolito secundario (D-mannitol) actúa sobre los transportadores de colesterol intestinales Abcg5 y Abcg8 reduciendo su flujo sérico y con ello, se disminuye el colesterol hepático indirecto (Castro-Torres et al. 2017).



Figura 4.- *Eryngium carlinae* F. (Delar), tallo aéreo con las inflorescencias. Foto del autor.

f 2.- *Silybum marianum* (L.) Gaertn., cardo mariano, cardo santo, cardo de leche, silimarina, cardo espinoso. blessed milkthistle, spotted thistle, variegated thistle, holy thistle, lady's thistle (Figura 5).

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asteranae Takht.

Orden: Asterales Link

Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl

Género: *Silybum* Adans.

Hierba anual o bianual, erecta, hasta de 2 m de alto, tallo robusto, sin pelos o ligeramente aracnoideo-pubescentes, hojas inferiores forman una roseta basal, oblongas a elípticas en contorno general, hasta de 50 cm de largo y 25 cm de ancho, pinnatífidas, con espinas amarillentas hasta de 8 mm de largo en el margen, manchadas de blanco en el haz, con pocos pelos o sin ellos, las hojas caulinares (las que se encuentran sobre el tallo) paulatinamente menores y menos profundamente partidas. Inflorescencia en cabezuelas solitarias o agrupadas por pocas; involucre de la cabezuela subgloboso, de 2.5 a 4 cm de largo, sus brácteas ± 50 , las interiores lineares y sin espinas, las demás ovadas y espinosas en el margen, terminando en una punta espinosa hasta de 5 cm de largo, dirigida hacia afuera; flores por lo general más de 100, corolas de ± 3 cm de largo, rosado-moradas en el limbo, que mide cerca de 1 cm de largo. Frutos y semillas, tipo aquenio de 6 a 8 mm de largo, café oscuro, brillante, vilano de ± 100 cerdas blanquecinas, desiguales, de 12 a 20 mm de largo. Planta de tallo muy espinoso (Rzedowski y Rzedowski 2001, Conabio 2012). El órgano utilizado principalmente para obtención de los derivados de silimarina es la semilla, que contiene la mayor cantidad de activos, en ocasiones se utiliza todo el tallo. Su principal principio activo, la silimarina está constituida por flavolignanicos isómeros: silibina, isosilibina, silibinina, silidianina y silicristina, siendo el primero el más activo. Además, contiene fitoesteroles, ácidos orgánicos, saponósidos y aceite esencial entre otros componentes. La silimarina tiene acción hepato-protectora capaz de antagonizar los efectos oxidativos y tóxicos de ciertas sustancias que atacan los hepatocitos,

como la faloidina (toxina del hongo *Amanita phalloides*), el alcohol etílico, el tetracloruro de carbono, incluso del dióxido de cloro tan de moda e inhibe la peroxidación lipídica. Su uso también está indicado en caso de hepatitis, cirrosis y trastornos hepáticos (Arteche et al. 2019). Crece abundantemente en terrenos de cultivo y aquellos abandonados, en potreros y llanos, principalmente con suelos húmedos o cercanos a la orilla de ríos y humedales.

La silimarina o cardo mariano *Silybum marianum*, especie de amplia distribución global, su sabia contiene la mezcla de cuatro flavonolignanos isoméricos, silibinina (que es el más activo), isosilibinina, silydianina y silycristina (Crocenzi & Roma 2006, Archeve et al. 2019). Estos metabolitos inducen la salida de ácidos biliares (colagogo), favorecen el flujo biliar desde el hígado para tratar la colestasis y desordenes hepatobiliares, actuando como preventivo de la colelitiasis.



Figura 5.- *Silybum marianum* (L.) Gaert., tallo aéreo con inflorescencias; aquenios amplificados en la figura del ángulo inferior derecho. Foto propiedad de Conabio.

f 3.- *Raphanus sativus* var. *niger* (Mill.) J. Kern. rábano negro, black radish (Figura 6).

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Brassicales Bromhead

Familia: Brassicaceae Burnett

Género: *Raphanus* L.

Especie: *Raphanus sativus* L.

Hierba anual o bianual, erecta, ramificada, de 0.5 a 1.20 m de altura. Tallo liso y glabro o algo hispido, ampliamente ramificado. Hojas finamente pubescentes con bordes irregularmente dentados, agrupadas en roseta característica, hasta 24 cm de largo por 12 cm de ancho, largamente espatuladas u obovadas, pinnatífidas hasta pinnatisectas, presentan un lóbulo terminal grande y ancho, lóbulos laterales más pequeños ovados u oblongos; hojas caulinares enteras, lanceoladas. Inflorescencia de tipo racimo terminal. Flores con pétalos de 11 a 20 mm de largo, toda la flor de 2 a 2.2 cm de diámetro, violáceos a rosados a blancos, con nervaduras conspicuas de color más oscuro, luego de la fecundación los pétalos pierden su color tornándose casi blancos. Frutos y semillas de tipo silicuas indehiscentes, glabras, gruesas, presentan varias nervaduras longitudinales, carnosas, cilíndrico-lanceoladas u oblongo-cónicas, no presentan contracciones transversales o muy ligeras entre semillas, atenuadas ligeramente hacia el ápice, de 3 a 8 cm de largo por 5 a 10 mm de diámetro, con 2 a 3 semillas por fruto. Semillas globosas, opacas, rojizo a ocráceas a café rojizas, finamente reticuladas, de aproximadamente 3.0 a 3.5 mm de diámetro. Las plántulas tienen cotiledones conduplicados. Raíz carnosa, pivotante, profunda. Planta con olor a rábano al estrujarse (Conabio 2012). El órgano que se utiliza con mayor frecuencia es la raíz pivotante o primaria, pero en ocasiones se usan el té de hoja y la semilla molida en la medicina tradicional China (Fratkin 1991, Fetrow & Ávila 2000). Los metabolitos secundarios más importantes son los glucosinolatos, de los cuales la

glucorafasatina representa más del 65% de ellos. Este componente y su producto de la hidrólisis, la rafasatina, han demostrado propiedades antioxidantes, hepatoprotectores y preventivos de la litiasis biliar en modelos biológicos experimentales (Castro-Torres et al. 2013).

Extractos y jugos obtenidos de la raíz pivotante (principal) del rábano negro (*Raphanus sativus* var. niger) han sido utilizados comúnmente por la MTH para tratar los cálculos biliares de colesterol y pigmentados. Ahora se conoce que su extracto contiene metabolitos tipo glucosinolatos (son S-glicósidos en los que la glicona es β -D-tioglucona y la aglicona es una oxima sulfatada), que disuelven cálculos de colesterol en roedores y para reducir los niveles de colesterol y triglicéridos séricos (Castro-Torres et al. 2012, 2013); la glucorafanina es el segundo glucosinolato más concentrado, su producto de degradación es el sulforafano, efectivo para disminuir los niveles del colesterol hepático al inhibir la expresión de enzimas y factores de transcripción asociados con su metabolismo. Estos extractos también son útiles como preventivos por la acción hipocolesterolemia sérica y biliar por la actividad de los glucosinolatos glucorafasatina y glucorafanina, y sus productos de degradación la rafasatina y el sulforafano, como afirman Castro-Torres y colaboradores (2014). Estos metabolitos secundarios han demostrado propiedades antioxidantes, que, sumado a su capacidad para disminuir los niveles de colesterol hepático, pueden prevenir la formación de los cálculos biliares de colesterol. Se ha comprobado que su jugo disminuye los niveles del colesterol, triglicéridos y glucosa en plasma y disuelve los cálculos biliares en los modelos animales. El jugo de su raíz se puede usar para tratar cálculos biliares en modelos animales alimentados con una dieta rica en colesterol y ácido cólico (Castro-Torres et al. 2014).



Figura 6.- *Raphanus sativus* var. *niger* Mill, tallo aéreo, porción de la raíz pivotante e inflorescencias. Foto del autor.

f.4.- *Solanum lycopersicum* (L.), jitomate, jitomate bola, tomate, tomato, adimahi (otomí), bachuga (cuicatleca), be-thoxi, bi-tuixi, pe-thoxi, bichoaxhe,pe-thoxe (zapoteca), ha'sikil-p'ak, p'ak, ts'ulub'p'ak (maya), tuthay, tuthey (huasteco-tenek), mbaremoxu (mazahua), paclshá (totonaca), shitumal, xitomat (náhuatl), xitomatl (náhuatl), tzajalpish (Itojolobal), xayuqui-te (huichol), xucúpara (tarasco), ver Figura 7.

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asteranae Takht.

Orden: Solanales Juss. ex Bercht. & J. Presl

Familia: Solanaceae Juss.

Género: *Solanum* L.

Hierba delicada, generalmente de vida corta, con pelos glandulares algo gomosos, de tamaño de hasta 1 m de altura y a veces más alta. Tallo erecto o trepador (postrado), algo áspero al tacto. Hojas alternas, de hasta 25 cm de largo, divididas en varios folíolos de diferentes tamaños que a su vez pueden estar divididas principalmente en la base, de ápice puntiagudo y con el margen aserrado a ligeramente hendido. Inflorescencia con flores dispuestas en racimos cortos o alargados, a veces ramificados, ubicados generalmente en las bifurcaciones de los tallos o bien en los nudos. Las flores con el cáliz de 5 sépalos angostamente triangulares, puntiagudos; la corola amarilla, en forma de estrella de 5 puntas (raramente más, hasta 9 principalmente en plantas cultivadas); estambres 5 (raramente más, hasta 9 principalmente en plantas cultivadas), las anteras con sus ápices delgados están unidas entre sí rodeando al estilo. Fruto carnoso, jugoso, globoso o alargado, de color rojo al madurar, amarillo a veces en variedades cultivadas. Semillas numerosas, más o menos circulares, aplanadas, amarillas. Planta aromática que al estrujarse libera el típico olor a tomate (Rzedowski y Rzedowski 2001, Conabio 2012). El único órgano que se utiliza es el fruto. El contenido alto de metabolitos como los licopenos, le permite contar con acciones disolventes sobre lípidos, antimicrobial y antioxidante para infecciones intestinales y así coadyuvar con el sistema inmune (Levy & Sharoni 2004, Das & Verma 2008).



Figura 7.- *Solanum lycopersicum* L, parte aérea, floración y frutos de la variedad cerasiforme.

g) México como centro favorable para estudios sobre plantas medicinales. Es importante resaltar que, México es parte esencial del centro de origen de la agricultura en Mesoamérica, siendo también el centro de domesticación y aprovechamiento de numerosas especies vegetales, entre ellas se incluyen aquellas medicinales (Vavilov 1926, Dressler 1953, Harlan 1971, Hernández-X. 1985, Lira et al. 2009, Pickersgill 2009,). Se ha señalado que desde la colonización hasta la revolución mexicana la diversidad de especies cultivadas o aprovechadas no ha variado significativamente (Moreno 1995, Esquivel 1996). Sin embargo, actualmente en el país, 7,000 especies vegetales tienen algún grado de aprovechamiento en condición silvestre o son promovidas por tolerancia, fomento e incluso cultivo en traspatio o huertos tradicionales (Casas et al. 1996, 2002 y 2007). Además, el número de especies que han sido utilizadas para el desarrollo de productos naturales es de varios cientos, pero el potencial para elaborar nuevos productos utilizando sus activos es de varias veces esta cifra, debido a la gran diversidad de metabolitos secundarios que presentan (Ramawat & Mérillon 2008). Por ello, México es un centro geográfico cultural favorable para estudios botánicos sobre arvenses y poblaciones silvestres que pudieran estar bajo un proceso activo de domesticación y para desarrollar proyectos productivos que permitan el uso y potenciación del germoplasma en el país, que incluye a las especies medicinales que crecen de forma silvestre, tanto endémicas como la yerba del sapo o arvenses como la silimarina (Casas et al. 1996, Zizumbo et al. 2010).

se estima que a nivel global, se ha incrementado la preferencia en el uso de la herbolaria para tratar problemas de salud, en 1985 la Organización Mundial de la Salud (HWO) afirmó que cerca del 80% de pacientes en países en desarrollo optan por la herbolaria como tratamiento primario (Farnsworth et al. 1985); incluso en países desarrollados como E.U.A. se observa este aumento, en la década de 1995 a 2005 las ventas de herbales medicinales se duplicaron, por un monto de \$ 4.4 Millones USD por año (Ramawat Y Mérillon 2008). En la actualidad los productos elaborados con plantas son de la mayor importancia económica a nivel global, ya sea en los países desarrollados o en vías de desarrollo, su producción y

comercialización representa la actividad económica más relevante, sobre todo en países productores y en ocasiones, es la única actividad en algunos del tercer mundo (Fabricant & Farnsworth 2001, Juárez-Rosete et al. 2013).

Es por ello, que este estudio evalúa la capacidad disolutiva sobre cálculos de colesterol, de extractos hidroalcohólicos para cada una de cuatro especies de plantas utilizadas en la MT para el tratamiento de la colelitiasis, para conocer si además de su acción terapéutica por la vía metabólica del colesterol, se suma una disolución por contacto directo, lo que pudiera mejorar su capacidad terapéutica. Esta información será de gran valor en estudios futuros con el objetivo de desarrollar nuevos productos medicinales en la prevención y tratamiento de la litiasis biliar.

h) Justificación del estudio.

La litiasis biliar es un problema de salud pública a nivel global, pudiendo alcanzar hasta el 20% de la población en el país y los tratamientos médicos convencionales como las cirugías radicales (colecistectomía), terapias de solventes orgánicos o ácidos biliares conllevan riesgos y efectos indeseables, además de un alto costo y una baja efectividad; por lo señalado con anterioridad, con el fin de promover el desarrollo de terapias alternativas más seguras, sin los inconvenientes de las terapias convencionales, el estudio de las plantas medicinales como tratamiento alternativo, puede ser parte de la solución, ya que conllevan en sí un enorme potencial científico y económico para promover la salud en un México megadiverso; Además, si se considera que, la mayor parte de las especies medicinales que se comercializan son colectas silvestres y que México ocupa el 5° lugar con mayor biodiversidad, se debe reconocer la importancia que representa el estudio de las especies medicinales que permita su rescate, el uso como un tratamiento más seguro y su conservación como un recurso natural sustentable.

Hipótesis.

Hipótesis:

Los extractos de jitomate, rábano negro, silimarina y yerba del sapo presentan una capacidad de disolución significativa y diferencial sobre el colesterol de los cálculos vesiculares.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Evaluar la capacidad disolvente sobre cálculos vesiculares de colesterol *in vitro*, de los extractos de rábano negro, silimarina, yerba del sapo y jitomate común, especies tradicionalmente utilizadas para tratar problemas biliares.

Objetivos específicos.

- Determinar las especies de plantas medicinales (PM) mayormente referenciadas en publicaciones científicas y medicina tradicional herbolaria, con presunta utilidad en la prevención y tratamiento de la colelitiasis, resultando las especies *Solanum lycopersicum* L., *Raphanus sativus* var. niger (Mill.) J. Kern., *Eryngium carlinae* Delar. y *Silybum marianum* L.
- Desarrollar un modelo de prueba *in vitro*, que permita evaluar por especie (diferencial), la capacidad disolutiva sobre cálculos de colesterol de los extractos hidroalcohólicos de jitomate común, rábano negro, yerba del sapo y silimarina, estableciendo esta capacidad como la reducción en la masa de dichos cálculos.
- Conocer con relación al objetivo anterior, si las especies medicinales además de la acción reductiva del colesterol vía metabólica, éstas poseen adicionalmente una capacidad disolutiva del colesterol por contacto directo.

Materiales y método.

a) Área de estudio:

La parte experimental de este trabajo de investigación fue llevada a cabo en tres laboratorios: Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), Centro de Investigaciones Químicas, ambos pertenecientes a la U.A.E.M., en Cuernavaca, Morelos y el área de producción de la empresa de productos herbolarios Beto Ramón S.A. de C.V. (HBR), localizada en Axtla de Terrazas, San Luis Potosí (Huasteca Potosina), México.



Áreas donde se realizó el estudio:

A.- Centro de Investigaciones Químicas (CIQ, UAEM).

B.- Centro de Investigaciones en Biotecnología (CEIB, UAEM).

C.- Beto Ramón, S.A. de C.V., Aguacatitla, Axtla de Terrazas, S.L.P.



b) Objeto de estudio y selección de las especies vegetales.

Mediante una investigación bibliográfica se obtuvo información de las especies de plantas medicinales (PM) de uso frecuente por la MTH y que presuntamente resultan efectivas para tratar problemas de colelitiasis, tanto de publicaciones científicamente validadas como de aquella contenida en los conocimientos tradicionales de la MTH (publicación gris) y la cual se aprovecha para el desarrollo de las formulaciones de la herbolaria Beto Ramón S.A. de C.V. en la Huasteca Potosina. Esta información colectada fue la base para la selección de cuatro especies de plantas sometidas a experimentación en este trabajo (rábano negro, silimarina, yerba del sapo y jitomate común).

c) Obtención del material vegetal y su identificación:

Los ejemplares vegetales de las especies *Silybum marianum* (semillas) y *Eryngium carlinae* (planta completa) fueron recolectadas en campo en el predio "Rancho Alegre" (21.426360, -98.868424), propiedad de la empresa HBR en la comunidad de Aguacatitla, municipio de Axtla de Terrazas, San Luis Potosí, en el periodo entre marzo-septiembre del 2020, mientras que *Raphanus sativus* var. niger (raíz pivotante) fue adquirida en los accesos al mercado Sonora de la ciudad de México, la cual refieren que fue cosechada en el mismo periodo 2020, en el municipio de San Martín Texmelucan de Labastida, Puebla (19.263243, -98.545511). Los frutos de *Solanum lycopersicum* de la var. cerasiforme (tipo saladet) fueron adquiridos localmente de comerciantes del mercado de San Luis Potosí (ciudad), cosechados en la temporada de cultivo 2020-2021.

De manera paralela se realizó una revisión y recopilación de la literatura en artículos referentes a la sistemática, bioquímica y etnobotánica de las cuatro especies seleccionadas.

Ejemplares de las especies *Eryngium carlinae* (N° Reg. 213495) y *Silybum marianum* (N° Reg. 213496) fueron depositadas en el herbario IBUG, de la U. de G.; las especies de *Raphanus sativus* var. niger y *Solanum lycopersicum* por la

facilidad en su identificación y ser del dominio popular, no se requirió de su caracterización a través de los servicios de herbario.

e) Obtención de extractos y su estandarización a concentraciones base.

En la elaboración de los extractos de las especies medicinales seleccionadas para este estudio, se siguieron los protocolos y especificaciones de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos FHEUM, publicación de la Secretaría de Salud (SSA) para el 2001. Para los extractos de la silimarina y la yerba del sapo (sin lavado previo) se utilizaron 200 g de material seco y para los frutos de jitomate maduro y la raíz de rábano negro fueron 1000 g de material fresco, el cual se lavó previamente. Por separado, el material vegetal fue inicialmente molido dependiendo su consistencia, para el material seco se utilizó un molino de martillo (Molinos Azteca, 7 hp) y para el fresco, una licuadora semi industrial (Turmix, 2 hp), reduciendo su tamaño a astillas de pocos milímetros o puré, con el fin de mejorar la penetración del medio de arrastre (alcohol). Una vez reducido en tamaño, el material vegetal seco se dejó reposar en etanol al 50% en un volumen de 1.5 litros de solvente, mientras que, por la cantidad de agua contenida en el material fresco se agregó 1.0 l de alcohol étílico al 96°g.l. para igualar las concentraciones del etanol en ambos materiales. Se utilizaron estos volúmenes de medio de extracción debido a que se consideraron las pérdidas causadas por evaporación y por la filtración después del periodo de reposo, para lograr obtener un volumen aproximado de 1 litro de extracto. El reposo del material vegetal en el medio hidroalcohólico, en todos los casos, fue por un periodo de 30 días en recipientes de cristal opaco sin cierre hermético (para evitar formación de anaerobios), en un lugar de escasa luz y fresco, aplicando agitaciones ocasionales cada semana por medio de palas de acero inoxidable para lograr la mejor extracción de activos; al finalizar este periodo, las fases líquidas y sólidas fueron separadas mediante un colado inicial usando cedazos industriales con malla de acero inoxidable (#0, #200 y #500, marca Advantech), posteriormente fueron filtrados por gravedad utilizando papel filtro Whatman (No. 1), obteniendo alrededor de 1 litro de cada uno de los extractos por separado. Una vez hechos los

extractos, éstos fueron almacenaron en botellas cilíndricas de polipropileno blanco con cierre hermético de la misma capacidad, a temperatura ambiente lejos de la luz. Los extractos se produjeron al menos un mes antes de las pruebas experimentales. En el caso que una vez producido el extracto su volumen fuera superior a un litro, el contenedor se dejó abierto cubierto con papel filtro para dejar evaporar un poco el medio hasta reducirlo a 1 litro.

e) Rendimiento de los extractos.

Con el fin de conocer el rendimiento de los extractos herbales, se cuantificó la masa de sólidos disueltos y suspendidos en los extractos herbales para cada especie desecando el medio líquido de una alícuota para cada uno de ellos; para ello, un volumen de 50 ml de cada extracto fue colocado en un horno de calor seco no hermético para lograr su desecado, a una temperatura de 45°C por un periodo de 12 horas continuas, hasta reducirlo a su menor volumen posible. Se emplearon contenedores de cristal tipo plato para extender la muestra lo más posible y promover la evaporación de solvente aumentando el área superficial. El rendimiento se calculó como la masa (g) final por volumen de extracto líquido desecado (ml).

f) Selección de los cálculos de colesterol.

Siguiendo a Allen (1985), Yamagata y Maki (1986), Vergunst (1991), Lin (1994) y colaboradores, para este estudio se seleccionaron 30 cálculos vesiculares de pacientes sometidos a colecistectomía laparoscópica, entre los años 2019-2020, de un total de 1597 cálculos colectados (92 cálculos mayormente formados por colesterol, cálculos mixtos 458 y combinados 129). Estos cálculos fueron donados por laboratorios de patología de las ciudades de Guadalajara, Jal., Cuernavaca, Mor., y Cd. Valles, S.L.P.

Para la selección de los cálculos formados predominantemente por colesterol >70% (Kim et al. 2003), se utilizó el criterio de clasificación por aspecto, forma y perfil (corte) referido en la Guía elaborada por el Grupo Japonés para el estudio de los Cálculos Biliares (Yamagata & Maki 1986). Los criterios para su selección fueron el color (blanquecino a amarillo), textura (cristalina), el perfil al corte (cristalino radial-ceroso) y la forma exterior (oval a esférica); en concordancia a Lin y colaboradores (1994), los cálculos que presentaron ambigüedades para su clasificación fueron descartados para la fase experimental (Figuras 1 y 2).

g) Estandarización de los cálculos seleccionados.

Los cálculos formados principalmente por colesterol, posterior a su selección fueron limpiados de impurezas de la siguiente forma: primeramente enjuagados con agua corriente de grifo y después con agua purificada para eliminar de su superficie restos orgánicos y bilis (Figura 1), luego colocados en papel filtro y desecados en un horno eléctrico de aire seco a 90-95°C por una hora hasta la eliminación de la humedad, para finalmente guardarlos en recipientes herméticos con silica gel (Pillowpak de 10g, Desiccare, Inc.). En condiciones ambientales de humedad ambiental relativa <75% y temperatura de 20-25°C, se obtuvieron las mediciones iniciales de masa y volumen previas a las pruebas de disolución y las mismas condiciones se aplicaron después de estas pruebas para obtener las mediciones finales que permitieron inferir el grado de disolución obtenido (Vergunst et al. 1991). Para las mediciones de los cálculos se utilizaron una balanza analítica (cap. 210g, precisión 0.01g, mod. PPS-213, Fischerbrand Sci.) y una probeta graduada (10 y 20 ml, div. 0.1 ml), con ellas se obtuvieron la masa en gramos y el volumen por desplazamiento en agua de cada uno de los cálculos seleccionados para las pruebas de disolución. Una vez tomadas las mediciones los cálculos fueron puestos en refrigeración en bolsas de polipropileno en lo individual a 05°C.

Debido a las dificultades para obtener cálculos de colesterol puro (Figura 2), como se ha presentado en estudios de Allen y colaboradores (1985) y Gomez (2007), se optó por seleccionar aquellos que por su aspecto (cristalino radial) tuvieran una composición $\geq 70\%$ de colesterol entre las muestras de cálculos vesiculares colectados (Vergunst et al. 1991, Gomez 2007) y además, debido a la amplia diversidad de tamaño (Figura 3, izquierda), se optó por uniformizar en masa los litos de la siguiente manera: seleccionando aquellos de aspecto cristalino radial, de color claro más puro y de forma semi-esférica a discoidal (Figura 3). Se realizaron cortes finos en los cálculos de mayor tamaño con el uso de un bisturí quirúrgico y navaja para raspador de un solo filo, tratando de evitar su fractura, de esta manera se logró obtener 30 litos de masas entre 1.43 g (1 pieza), 1.48 g (1 pieza), 1.49 g (10 pz) y 1.50 g (18 pz), previendo que su masa no difiriera más del 5% (Figura 3, derecha), con densidades de entre 0.76-1.02 g/ml, que varían probablemente debido a las impurezas de sustancias diferentes al colesterol. Esta estandarización de tamaños permitió con facilidad, manejar los cálculos con tubos de ensaye de tamaño estándar (22 ml) como se observa en la Figura 8.

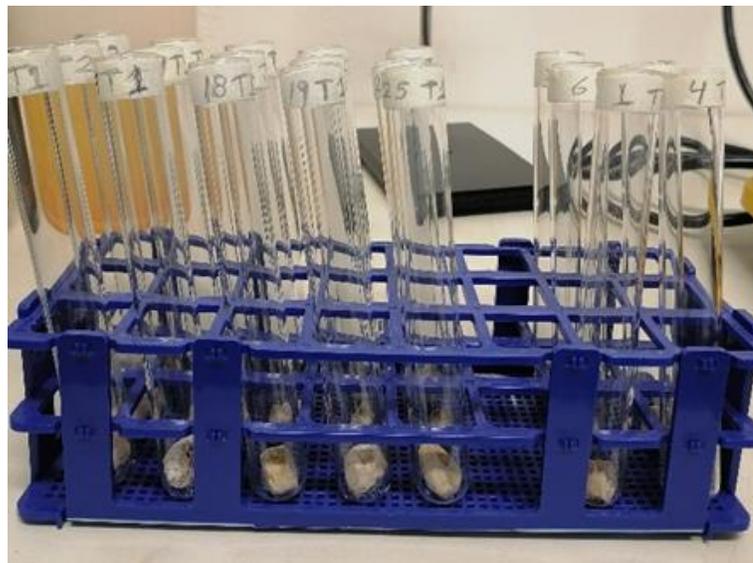


Figura 8.- Tubos de ensaye conteniendo los cálculos normalizados en tamaño, antes de las pruebas de disolución *in vitro*.

Fase de Experimentación

a) Descripción de las pruebas de disolución *in vitro*.

Las pruebas *in vitro* se realizaron siguiendo a Lin y colaboradores (1994) y Vergunst y colaboradores (1991), con el objetivo de conocer la capacidad disolvente sobre cálculos biliares de colesterol, pero en este estudio, se utilizó extractos hidroalcohólicos elaborados con las cuatro especies seleccionadas.

Se emplearon como contenedores 30 tubos de ensaye (15X2 cm), a los cuales se les agregó 10 ml de extracto herbal como tratamiento y se colocó un cálculo estandarizado para cada tubo por separado; renovando regularmente el extracto (tratamientos) o el testigo (HA y EE), en intervalos cada 60 min, agitando con poca fuerza y de manera ocasional cada 20-30 min para evitar una acción mecánica que pudiera fragmentar los cálculos (Allen et al. 1985, Vergunst et al. 1991). Los tubos fueron cerrados con tapón interno de hule #2.

Siguiendo a Allen y colaboradores (1985), Vergunst y colaboradores (1991), con el fin de asemejar las condiciones dentro de la vesícula biliar, la temperatura se mantuvo entre 35°-37°C, mediante baño maría como se aprecia en la Figura 9, empleando un vaso de precipitado (cap. 2 l) con agua hasta igualar el nivel del extracto en los tubos para evitar su flotación y estabilizar la temperatura, un plato caliente (Thermo Scientific, mod. Cimarec) con temperatura regulable y un termómetro de alcohol. Las alícuotas de extractos y testigos utilizados en las pruebas de disolución no se reutilizaron a diferencia del trabajo de Vergunst y colaboradores (1991), sino que inmediatamente después de su uso fueron reunidas en botellas de polipropileno (extractos) y de cristal (testigos) de capacidad 1 l, por separado cada medio, para su posterior refrigeración.

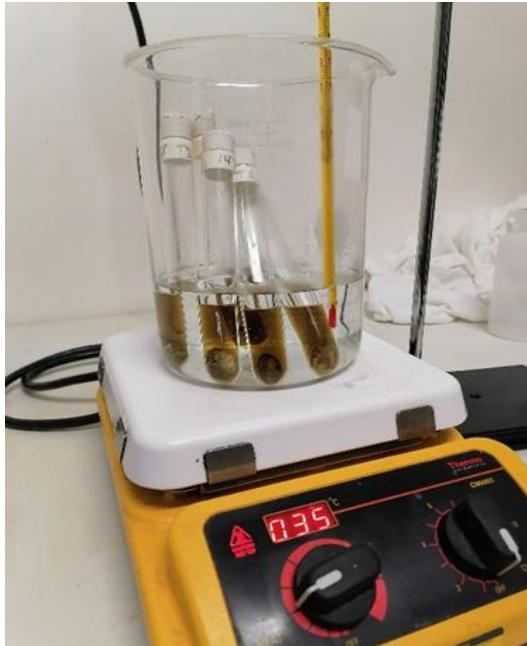


Figura 9.- Sistema de baño maría (35-37°C) semejando las condiciones de la temperatura corporal, para las pruebas de disolución con los extractos y los testigos.

Para tener un marco comparativo en las pruebas *in vitro* sobre la efectividad relativa de los extractos herbales, se seleccionaron como testigos dos solventes orgánicos: el éter etílico (EE) como testigo positivo por su excelente capacidad disolvente de lípidos (Allen et al. 1985, Pitt et al. 1989, Das & Verma 2008) y el alcohol etílico al 50% (HA) como control negativo, debido a que es el medio solvente universal más utilizado para extracción por arrastre (SSA 2001). Cada uno de los tratamientos, así como los controles, el negativo (HA) y el positivo (EE) tuvieron réplicas por quintuplicado para mayor certidumbre estadística (Allen et al. 1985, Pitt et al. 1989, Lin et al. 1994, Anderson 2008).

En reportes de trabajos similares *in vitro*, Allen y colaboradores (1985) afirman que, la agitación mecánica sobre las muestras durante el proceso de experimentación, puede incrementar significativamente la dilución de cálculos biliares, pero es probable que también cause su fragmentación, para prevenirlo y en concordancia con Vergunst (1991), se optó por ejercer una agitación muy suave y por un breve tiempo en los tubos de ensaye, unos segundos previos a la renovación del medio, para así, asegurar que la disminución de la masa de los

cálculos sea debido principalmente a la capacidad de disolución que muestre cada extracto o testigo, evitando la disminución de su acción debido a un uso prolongado.

Para calcular la tasa de disolución de cada extracto, se siguió el criterio de Vergunst y colaboradores (1991), considerada como el cambio de la masa (g) registrada en los cálculos debido a su disolución, por centímetro cúbico (ml) del medio a probar en un tiempo establecido (h). La disminución relativa en las masas de los cálculos sometidos a prueba se pudiera relacionar con la presencia o concentración de colesterol en el medio de disolución empleado (Vergunst et al.1991, Rivas-Morales 2016). Debido a que, en la fórmula para el cálculo de la tasa de disolución, el volumen y el tiempo son uniformes (ml/h), el valor del cambio de masa fue el que se utilizó para crear la base de datos para los análisis estadísticos.

Análisis estadísticos de los datos:

El diseño experimental empleado fue el de bloques completamente al azar, con cinco repeticiones por cada uno de cuatro tratamientos, así como las mismas repeticiones para los testigos (EE y HA).

Los valores registrados en la matriz de datos (Cuadro #3), fueron analizados mediante el PERMANOVA de una vía (ANOVA unifactorial con 10,000 permutaciones), además se realizaron pruebas pareadas de Monte Carlo, para conocer en donde están principalmente esas diferencias y pruebas de Similitudes con distancias Euclidianas (Resemblaza) para tener certeza de la uniformidad de las muestras dentro de cada tratamiento; los cálculos de colesterol fueron sorteados al azar para cada tubo de ensaye para todos los tratamientos y testigos.

Para los análisis estadísticos de análisis de varianza, Similitudes, pruebas pareadas de Monte Carlo y pruebas de Similitudes con distancias Euclidianas, se recurrió al empleo de la herramienta informática PRIMER+6 & PERMANOVA v.6

de PRIMER-E Ltd. y para desarrollar el gráfico de cajas se utilizó el paquete SigmaPlot v.11.0 de Systat Software Inc. (Anderson et al. 2008).

Resultados y discusión.

La investigación bibliográfica permitió seleccionar cuatro especies de uso común en la MTH, tres de ellas medicinales como son rábano negro (*Raphanus sativus* var. niger), silimarina (*Silybum marianum*), yerba del sapo (*Eryngium carlinae*) y una nutricional que es el jitomate común (*Solanum lycopersicum*). Estas especies fueron seleccionadas para el presente estudio debido a: a) la abundancia en campo y facilidad de colecta en esta región, b) la disponibilidad en tiendas herbolarias del país todo el año, c) referidas con mayor frecuencia en la MT y en publicaciones científicas a nivel global para tratar la colelitiasis y d) la facilidad para llevarlas a cultivo intensivo.

Los extractos herbales utilizando la silimarina, yerba del sapo, jitomate y rábano negro mostraron una capacidad de disolución significativa sobre el colesterol de los cálculos vesiculares, que pudo ser cuantificada mediante la diferencia entre la masa inicial y final de los litos (Cuadro #1). Resultados similares con *Solanum lycopersicum* y otras especies se reportaron por Das & Verma (2008) en la India, con extractos de similar concentración.

Por ello, la actividad preventiva y terapéutica de estas especies pueden que no se limiten solo a la acción metabólica, al reducir la producción de colesterol en el hígado y con ello, la concentración de colesterol en la bilis recién formada, lo que incrementa la proporción de los ácidos grasos biliares que ejercen una actividad solvente sobre los cálculos en la vesícula biliar, sino que además, pudieran tener una función disolvente, si se considera que los metabolitos de origen vegetal, como el resto de las sustancias ajenas o tóxicas, son eliminados de la sangre principalmente por vía hepática a través de la bilis (Gomez 2007). Siendo así, éstos podrían entrar en contacto con los cálculos en cualquier punto de las vías biliares y favorecer su disolución junto con los ácidos biliares.

Cuadro #1.- Pérdida de masa (g) y tasa de disolución (g/ml/h) de los cálculos de colesterol sometidos a prueba (HA_TO: Hidroalcohólico Tratamiento Negativo, EE_T+: Éter Etílico Tratamiento Positivo).

Cálculo #	masa inicial	masa final	D-masa	Tasa disoluci	#-tratam	N-tratam
7	1.50	0.92	0.58	0.00280	1	Eryngium
14	1.50	0.92	0.58	0.00280	1	Eryngium
18	1.50	0.95	0.55	0.00280	1	Eryngium
19	1.49	0.95	0.54	0.00280	1	Eryngium
25	1.50	0.96	0.54	0.00280	1	Eryngium
2	1.50	0.91	0.59	0.00285	2	Raphanus
9	1.50	0.92	0.58	0.00285	2	Raphanus
16	1.49	0.93	0.56	0.00285	2	Raphanus
17	1.50	0.93	0.57	0.00285	2	Raphanus
29	1.50	0.93	0.57	0.00285	2	Raphanus
12	1.49	0.93	0.56	0.00285	3	Silybum
22	1.50	0.92	0.58	0.00285	3	Silybum
24	1.49	0.93	0.56	0.00285	3	Silybum
27	1.50	0.94	0.56	0.00285	3	Silybum
30	1.49	0.92	0.57	0.00285	3	Silybum
1	1.50	0.96	0.54	0.00270	4	Solanum
4	1.48	0.95	0.53	0.00270	4	Solanum
6	1.49	0.95	0.54	0.00270	4	Solanum
10	1.50	0.96	0.54	0.00270	4	Solanum
20	1.49	0.95	0.54	0.00270	4	Solanum
3	1.49	0.98	0.51	0.00255	5	HA_TO
11	1.50	0.98	0.52	0.00255	5	HA_TO
21	1.50	0.97	0.53	0.00255	5	HA_TO
23	1.49	0.97	0.52	0.00255	5	HA_TO
28	1.50	1.01	0.49	0.00255	5	HA_TO
5	1.43	0.00	1.43	0.00715	6	EE_T+
8	1.50	0.06	1.44	0.00715	6	EE_T+
13	1.50	0.15	1.35	0.00715	6	EE_T+
15	1.49	0.08	1.41	0.00715	6	EE_T+
26	1.50	0.00	1.50	0.00715	6	EE_T+

Además, se determinó el rendimiento para cada uno de los extractos, considerando a éste como el volumen de masa debido a los sólidos solubles. Los rendimientos obtenidos fueron: para la yerba del sapo de 34.5 g/l, para silimarina de 50 g/l, el rábano negro 100 g/l y para el jitomate común de 51.2 g/l; Así, el rendimiento del extracto del rábano negro (100 g/l) fue muy superior al resto de los extractos, esto debido probablemente a que este extracto se obtuvo de la raíz pivotante, la cual es un órgano que sirve de almacén para la mayor parte de los metabolitos como son los glucósidos y también de las fibras solubles.

La selección de cálculos de colesterol siguiendo a Yamagata & Maki (1986) en su Guía Japonesa para el estudio de los Cálculos Biliares (Figura 2), así como la estandarización de estos, realizada mediante cortes para lograr una similitud de forma y de masa que no variara más del 5% entre los cálculos seleccionados (Figura 3), resultaron procedimientos adecuados que permitió contar con 30 cálculos de colesterol, como muestras uniformes para someterlas a las pruebas de disolución (Figura 8). Tal minimización de la variabilidad permitió observar una similitud en la capacidad disolutiva intra-grupos (para cada extractos y testigo, Cuadros #1 y #5), donde cada grupo estuvo representado por cinco repeticiones, que facilitó tanto las observaciones sobre el factor disolutivo como la manipulación de las muestras en tubos de ensaye de medida estándar.

Los análisis de PERMANOVA, las comparaciones pareadas de Monte Carlo y de Similitudes (Resemblanza) utilizando distancias Euclidianas, muestran diferencias significativas en la capacidad de disolución del colesterol para los cuatro extractos y los testigos (HA_T0 y EE_T+), que infiere, una acción disgregante diferencial altamente significativa entre todos los tratamientos ($P= 0.0001$, 6348 permutaciones, Cuadro #2), además, permitió conocer una similitud en capacidad de disolución dentro de cada grupo, es decir, entre las repeticiones de cada tratamiento (Cuadro #1 y #5). Este mismo resultado se aprecia en el gráfico de caja, con distancias suficientes entre los tratamientos y, entre éstos y los testigos (Figura 11). La cuantificación de la capacidad de disgregación de los extractos sobre los cálculos de colesterol, entendida como la pérdida de masa en un tiempo establecido (g/ml de extracto/h, Cuadro #1), permitió conocer que esa capacidad fue diferencial entre los grupos de tratamientos, siendo alrededor de seis veces mayor para el éter etílico (EE_T+, testigo positivo) en relación con el resto de los tratamientos (Cuadro #3), corroborando que posee una fuerte acción solvente sobre el colesterol, reportado por Pitt (1989), Vergunst (1991) y colaboradores.

Cuadro #2.- Resultados del análisis Anova con permutaciones (PERMANOVA), de los datos

obtenidos de las pruebas de disolución de los extractos y testigos, empelando PRIMER+ v.6 (Anderson et al. 2008). gl=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, MC= Medias cuadráticas, P= Probabilidad, Permut= Permutaciones, Res= Residuales.

Tabla de resultados del PERMANOVA

Fuente	gl	SC	MC	Pseudo-F	P(perm)	Permut
Extracto	5	3.2123	0.64245	1009.1	0.0001	6348
Res	24	1.528E-2	6.3667E-4			
Total	29	3.2275				

Cuadro #3.- Promedio de distancias Euclidianas entre los tratamientos (Yerba del Sapo, Silimarina, Rábano negro y Jitomate) y testigos (Etanol 50%, Éter Etilico 99%).

Promedio de distancias por grupo

	Eryngium	Raphanus	Silybum	Solanum	HA_T0	EE_T0
Eryngium						
Raphanus	2.24E-2					
Silybum	1.92E-2	1.2E-2				
Solanum	2.20E-2	3.8E-2	3.0E-2			
HA_T0	4.40E-2	6.0E-2	5.2E-2	2.2E-2		
EE_T+	0.868	0.852	0.86	0.89	0.912	

El medio hidroalcohólico al 50% (testigo negativo, HA_T0) fue la prueba que mostró una menor, pero significativa acción disgregante sobre el colesterol de entre todos los tratamientos, probablemente por la dificultad de extraer por arrastre los licopenos, teniendo un extracto pobre en relación con este activo.

Las pruebas de comparaciones pareadas de Monte Carlo (Cuadro #4), permitieron conocer que tres tratamientos (extractos) presentaron mayores similitudes entre sí, en relación con su capacidad de disolución: éstas fueron entre los tratamientos *Eryngium* y *Raphanus* (P= 0.2085), *Eryngium* y *Silybum* (P= 0.5647), *Raphanus* y *Silybum* (P= 0.3839) y menor en similitud entre *Eryngium* y *Solanum* (P= 0.0771); el resto de las comparaciones pareadas mostraron marcadas diferencias significativas (P<0.05). Mientras que en las comparaciones entre extractos con EE y HA (testigos) se observó que, las diferencias resultaron altamente significativas

con respecto de cada testigo ($P < 0.015$) y mayor aún entre ambos testigos, como se esperaba ($P = 0.0001$).

Cuadro #4.- Resultados de las pruebas pareadas de Monte Carlo, con distancias Euclidianas y permutaciones, en PRIMER+ v.6 (Anderson et al. 2008).

Grupos	t	P(perm)	permut	P(MC)
Eryngium, Raphanus	1.5255	0.2085	8	0.1593
Eryngium, Silybum	0.8	0.5647	7	0.45
Eryngium, Solanum	2.319	0.0771	6	0.0454
Eryngium, HA_T0	3.8591	0.0072	12	0.0052
Eryngium, EE_T+	33.534	0.0064	40	0.0001
Raphanus, Silybum	1.2344	0.3839	5	0.2533
Raphanus, Solanum	6.7175	0.0072	9	0.0004
Raphanus, HA_T0	7.0711	0.0088	14	0.0003
Raphanus, EE_T+	34.44	0.0062	39	0.0001
Silybum, Solanum	6.396	0.0078	7	0.0002
Silybum, HA_T0	6.604	0.0086	12	0.0004
Silybum, EE_T+	35.051	0.0086	34	0.0001
Solanum, HA_T0	3.0509	0.0262	6	0.0149
Solanum, EE_T+	36.579	0.0073	28	0.0001
HA_T0, EE_T+	36.277	0.0079	41	0.0001

En el gráfico de similitudes (Figura 10) y de caja (Figura 11) basado en el análisis de Similitudes (Resemblanza) utilizando distancias Euclidianas, se observa también una diferencia significativa en la respuesta entre los tratamientos, pero además, una distribución espacial no proporcional entre ellos, de tal forma que se crean con los tratamientos dos grandes grupos: uno mayor (a) que incluye a la yerba del sapo, silimarina y rábano negro, un segundo grupo (b) representado por el jitomate; mientras que los testigos forman dos grupos separados (c y d), el control negativo (HA_T0) como grupo c, los tres grupos a una distancia entre 0.5 y 0.6, y, un cuarto grupo d muy lejano, representado solo por el control positivo (EE_T+), el cual se ubica a una distancia poco mayor de 1.4 en relación al resto.

Pruebas de disolución
Cálculos de colesterol

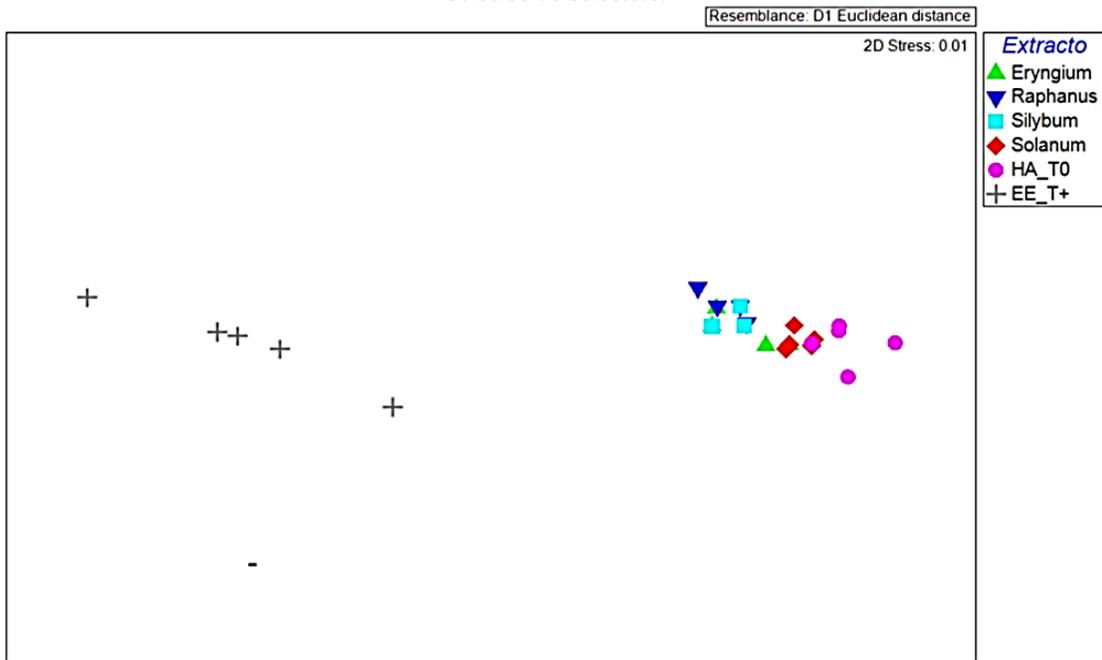


Figura 10.- Gráfico de Similitudes (Resemblanza), utilizando distancias Euclidianas con análisis de componentes (ejes) utilizando el paquete PRIMER+ v.6 (Anderson 2008).

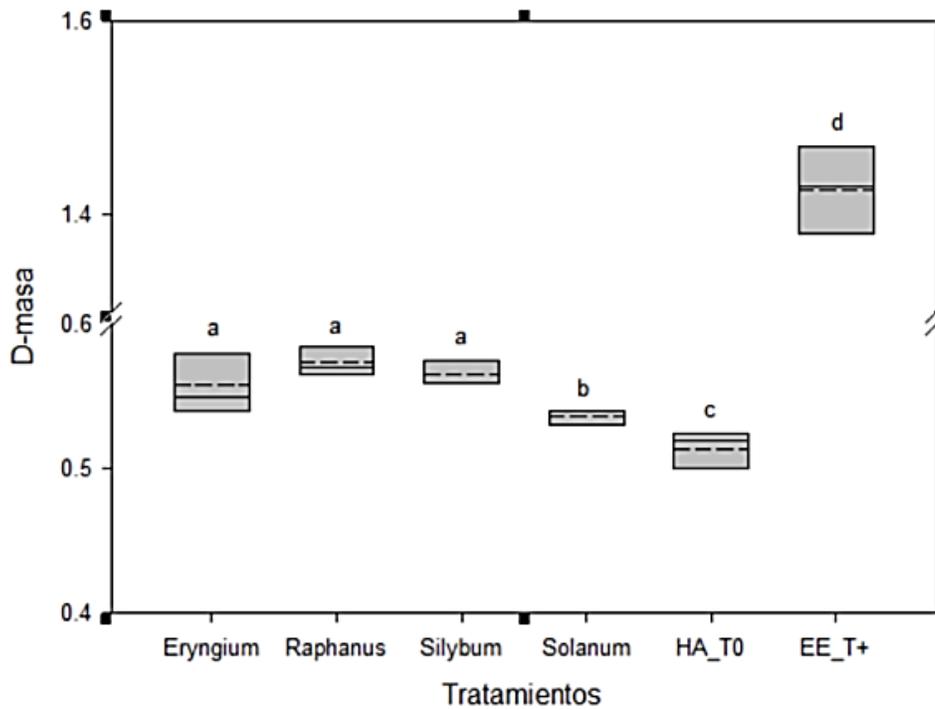


Figura 11.- Gráfico de caja, utilizando distancias Euclidianas, los análisis de ANOVA y Monte Carlo refieren diferencias significativas entre los tratamientos y los controles (c y d), un grupo uniforme (a) entre *Eryngium*, *Raphanus* y *Silybum* y un segundo grupo (b) formado por *Solanum*.

El análisis de similitudes (Cuadro #5) con respecto a los valores de pérdida de masa de los cálculos dentro de cada tratamientos para cada una de las cinco repeticiones, muestra similitud, como se observa en los gráficos de Similitudes y el de caja (Figura 10 y 11); en este último, se aprecia una reducción en la anchura entre las líneas que representan la media aritmética y los cuartiles de cada una de las cajas para los cuatro tratamiento y para el testigo etanol HA_T0 (Figura 11), lo que infiere una menor dispersión intra-grupos (Cuadro #3, Figuras 10 y 11); reforzando el concepto de una diferenciación significativamente mayor en la acción disgregante entre los tratamientos y testigos, y una menor diferenciación entre las repeticiones debida posiblemente a la estandarización y selección de los cálculos aplicada antes de las pruebas. En el caso del testigo EE, se observa en el gráfico de caja una distancia mayor entre los cuartiles por lo que hay mayor dispersión entre sus repeticiones, debido a que la disolución de los cálculos en el EE fue total, dejando solo algunas impurezas no solubles dentro del tubo de ensaye, que pudieran ser de bilis, carbonatos o fosfatos, con una masa final entre 0.00g-0.15g, lo que causó tal variabilidad dentro de este tratamiento. Por otro lado, si se toman en cuenta estas masas finales, la mayor cantidad de impurezas fue de 0.15 g, que representa el 10% de la masa inicial (1.5 g), por lo que se puede considerar que la proporción de colesterol en los cálculos fue mayor al 70% (Cuadro #1 y Figura 11), resultando adecuado el criterio utilizado para su selección.

La revisión de referencias de trabajos sobre la fitoquímica de las especies seleccionadas en este estudio reveló que, en la mayoría de ellas, se encuentran metabolitos secundarios con acción lipofílica, como los terpenos (Figura 12). Un tipo de ellos, las saponinas, están presentes en la yerba del sapo, son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón, que le confiere la facilidad de asociarse a moléculas lipídicas como el colesterol (Estrada y Morales 2012). Lo mismo se presenta en el rábano negro, los glicósinolatos, formados por una glicona (b-D-tioglucona) y una aglicona (oxima sulfatada), afín al colesterol (Figura 13), pudiera ser el principal agente en su disolución (Castro-Torres et al. 2014). En tanto que, la silimarina contiene

flavonolignanos isoméricos, como la silibinina, isosilibinina, silydianina y silycristina (Figura 14), que pudieran no tener un efecto relevante en la disolución de colesterol, pero, además contiene fitoesteres, ácidos orgánicos, saponósidos y aceites esenciales, entre otros activos, por lo que es probable que la acción solvente sobre el colesterol se deba a estos últimos (Crocenzi & Roma 2006, Arteché et al. 2019). Estas tres especies fueron las que tuvieron un mejor desempeño en la disolución del colesterol probablemente atribuible a la acción de sus saponinas.

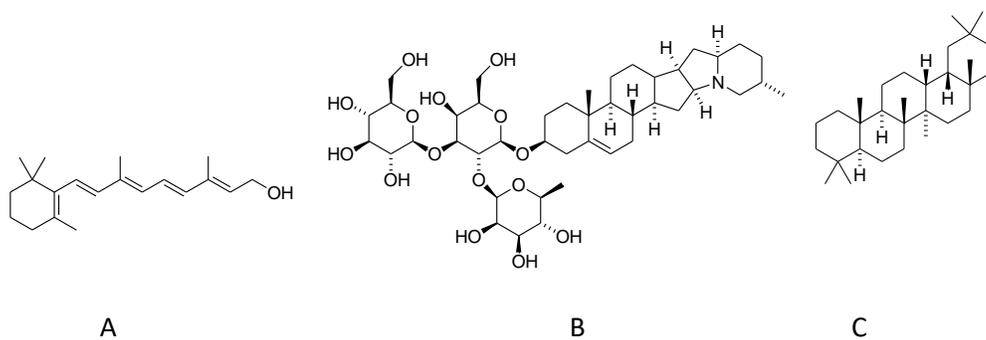


Figura 12.- Terpenos (A), saponinas (B) y triterpenoides (C).

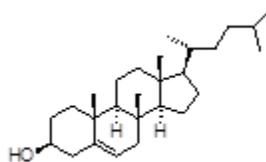


Figura 13.- Esteroles, el colesterol.

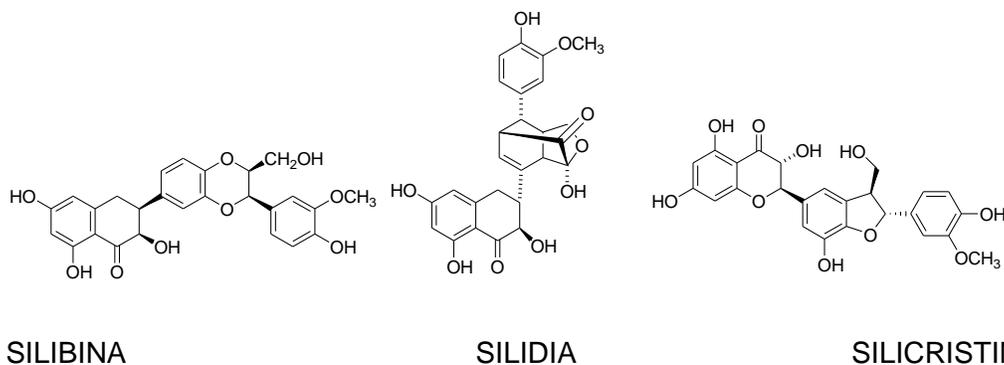


Figura 14.- Flavonolignanos isoméricos, las silimarinas: silibinina, isosilibinina, silidianina y silicristina.

CONCLUSIONES

El modelo *in vitro*, las especies seleccionadas, así como los protocolos propuestos en este estudio, resultaron útiles tanto para la selección de los de cálculos de colesterol al reducir su variabilidad, como también para la elaboración de extractos a una concentración suficiente (20%), que permitió evaluar su actividad disolvente sobre el colesterol y representarla como la capacidad de disolución (g/ml/h). Por lo anterior, los objetivos establecidos en este trabajo fueron alcanzados de manera satisfactoria.

Los extractos de *Solanum lycopersicum*, *Raphanus sativus* var. *niger*, *Silybum marianum* y *Eryngium carlinae* resultaron de entre las cuatro especies, con el mayor potencial para la disolución de colesterol. Los resultados obtenidos de esta evaluación permiten proponer que, la acción terapéutica de estas especies posiblemente no esté limitada solo al contexto metabólico sino, además, pudiera presentarse una acción disolvente a través de su eliminación por vía biliar. Por otro lado, la actividad disolvente de los extractos de estas especies por contacto directo sobre el colesterol de los cálculos pudiera explicarse por su contenido de saponinas (terpenos), activos reportados con actividad hipolipemiante y detergente por Levy y Sharoni (2004), Das y Verma (2008), Castro-Torres y colaboradores (2012, 2014, 2017). Por lo anterior se propone que, si los metabolitos de estas especies fueran eliminados vía hepática, pudieran ser doblemente efectivos en la prevención y tratamiento de los cálculos biliares de colesterol (Moreno-Peña et al. 2016, Castro-Torres et al. 2017), o si no fuera esta la principal vía de eliminación, se pudieran proponer los extractos de estas especies para pruebas de disolución *in vivo* bajo los métodos reportados por Leuschner y colaboradores (1994), Pribam (1939) y Walker (1891) donde se utilizó éter como disolvente.

El resultado obtenido de este estudio nos permite conocer más la utilidad de las cuatro especies evaluadas para combatir problemas de salud por litiasis biliar,

Además, se abre un abanico de posibilidades para iniciar nuevos estudios, que permitan probar nuevas especies utilizadas en la MTH con este fin y que de las cuales, generalmente solo se conoce su uso etnobotánico. Todo ello con el fin de sentar las bases para nuevos productos farmacéuticos naturistas para la colelitiasis. Finalmente, enfatizar la importancia de los estudios sobre las especies endémicas o silvestres en áreas como la etnobotánica, fitoquímica, farmacológica, médica y el desarrollo de proyectos que involucren todos los sectores productivos, desde la investigación en campo, el desarrollo de cultivos, su domesticación, hasta la investigación en el laboratorio para el desarrollo de productos más inocuos que contribuyan al uso, difusión y conservación de especies medicinales, en pro de la salud y la economía, sobre todo de los sectores más pobres de la población.

REFERENCIAS

- A.C.S. 2015. Cholecystectomy Surgical Removal of the Gallbladder. Surgical Patient Education Program, Prepare for the Best Recovery. American College of Surgeons. Division of Education. In: www.facs.org/patienteducation. Access: Jan 2019.
- Abdel MM, Abdel SN and Rashad M. 2014. Hypoglycemic and Hypocholesterolemia Effects of Intra-gastric Administration of Dried Red Chili Pepper (*Capsicum annum*) in Alloxan-Induced Diabetic Male Albino Rats Fed with High-Fat-Diet. *J. Food & Nutr. Res.* 2(11): 850-856.
- Anderson MJ, Gorley RN y Clarke RK. 2008. PERMANOVA+ para PRIMER: Guía para el Programa y Métodos Estadísticos. PRIMER-E, Massey University, Plymouth, U.K, pp. 264.
- Aguilar Contreras, A. y M.A. Martínez Alfaro. 1993. Los Herbarios Medicinales de México, La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Secretaría de Salud, México, DF pp. 89-102.
- Allen MJ, Borody TJ & Thistle JL. 1985. In Vitro Dissolution of Cholesterol Gallstones, A Study of Factors Influencing Rate and a Comparison of Solvents. *Gastroenterology*, 89:1097-1103.
- Argueta AV., Cano M.L., Rodarte M.A. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana 11. Instituto Nacional Indigenista 1a ed. 405-781pp.
- Arteche A, Vanaclocha B, Güenechea JI. 2019. Fitoterapia 5.^a edición. Vademécum de prescripción. Plantas medicinales. Vanaclocha B, Cañigüeral S. (eds). Barcelona, Ed. Masson, 830 p. ISBN: 978-84-9113-299-8.
- Attili AF, Carulli N, Roda E, Barbara B, Capocaccia L, et al. 1995. Epidemiology of gallstone disease in Italy: prevalence data of the Multicenter Italian Study on Cholelithiasis (M.I.COL.). *Am J Epidemiol* 141(2): 158-165.
- Avinash S, Amresh S & Anuradha S. 2017. Cholelithiasis and Ayurveda. *Int J Complement Alt Med*, 7(5):00239. DOI: 10.15406/ijcam.2017.07.00239.
- Brown D. 1995. Encyclopedia of Herbs and their Uses. London. Dorling Kindersley.
- Campos J. 1992. Fisiopatología de la litiasis biliar. Cálculos de colesterol. *Act Med Colom*, 17(3):161-166.

- Casas A. & Barber G. 2002. Mesoamerican domestication and diffusion. Cacti, chapter 9, Park S. Novel (ed.). Regents of University of California. 21 pp.
- Casas A, Otero-Arnaiz A., Pérez-Negrón E y Valiente-Banuet A. 2007. In situ management and domestication of plants in Mesoamerica. *Annals of Botany* 100: 1101-1115.
- Casas A, Vazquez C, Viveros JL y Caballero J. 1996. Plant management among the Nahua and the Mixtec in the Balsas River basin. Mexico: an ethnobotanical approach to the study of domestication. *Human Ecology*, 24:455-478.
- Castro-Torres IG, Naranjo-Rodríguez EB, Domínguez Ortíz MA, Gallegos-Estudillo J, Saavedra-Vélez MV. 2012. Antilithiasic and hypolipidaemic effects of *Raphanus sativus* L. var. *niger* on mice fed with a lithogenic diet. *J Biomed Biotechnol*. DOI: 10.1155/2012/161205. PMID: 23093836.
- Castro-Torres IG, Gallegos-Estudillo J, Dominguez-Ortiz MA y Cruz-Sánchez JS. 2013. Efecto Antilítogénico del extracto metanólico de *Raphanus sativus* var. *niger* en un modelo biológico para litiasis biliar de colesterol. *Revista Latinoamericana de Química*. Dr. Andrés Navarrete (Ed.). Laboratorios Mixim, S.A. de C.V. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. UAEH. 302 p.
- Castro-Torres IG, De la O-Arciniega M & Martínez-Vázquez M. 2014. Two glucosinolatos and their effects related to the prevention of cholesterol gallstones: a review. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 13(1): 1-9.
- Castro-Torres IG, De la O-Arciniega M, Naranj-Rodríguez EB, Castro-Torres VA, Domínguez-Ortíz MA & Martínez Vázquez M. 2017. The Hypochoresterolemic Effects of *Eryngium carlinae* F. Delaroché Are Mediated by the Involvement of the Intestinal Transporters ABCG5 and ABCG8. *Hindawi. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Vol. 2017. 7 pp. ID: 3176232. In: <http://doi.org/10.1155/2017/3176232>.
- Chevallier, A. 1996. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*. London. Dorling Kindersley.
- Cirilo BG, Cantú PC, Verde MJ y Mata B. 2011. Uso de la herbolaria en el cuidado de la salud. *Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN)*. 12(2), Abril-Junio.
- Conabio. 2009. *Capital Natural de México. Conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad*. 104 p.
- Conabio 2012. *Raphanus sativus* var. *niger*. *Silybum marianum*. Sitio de malezas de México. En: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm>.

- Crocenzi FA & Roma MG. 2006. Silymarin as a new hepatoprotective agent in experimental cholestasis: New possibilities for an ancient medication. *Curr Med Chem*, 13(9):1055–1074.
- Das I & Verma S. 2008. Human Stones: Dissolution of calcium phosphate and cholesterol by edible plant extracts and bile acids. *J Sci & Ind Res*, 67:291-294.
- Dressler RL. 1953. The pre-columbian cultivated plants of Mexico. Botanical Museum Leaflets, Harvard University. Vol. 16, No. 6. Cambridge, MA.
- Duca S, Bala O, Al-Hajjar N, et al. 2003. Laparoscopic cholecystectomy incidents and complications. A retrospective analysis of 9 542 consecutive laparoscopic operations. *HPB (Oxford)*, 5(3):152-158.
- Ellis WR, Somerville KW, Whitten BH, Bell GD. 1984. Pilot study of combination treatment for gall stones with medium dose chenodeoxycholic acid and a terpene preparation. *Br Med J*, 6438(289):153-155.
- Erlinger S, Le Go A, Husson JM & Fevery J. 1984. Franco-Belgian cooperative study of ursodeoxycholic acid in the medical dissolution of gallstones: a double-blind, randomized, dose-response study, and comparison with chenodeoxycholic acid. *Hepatology*, 4:308–314.
- Esquivel G. 1996. Historia de México. Oxford: Harla.
- Estrada E y Morales JL. 2012. La prodigiosa yerba del sapo. Vanguardia Editores. México. 184 p.
- Fabricant DS, Farnsworth NR. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*, 109 (Suppl 1):69-75.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. 1985. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ*; 63(6): 965–981.
- Fernandez EC, Sandi YE & Kokoska L. 2003. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used in the Bustillo Providence of the Potosi Department, Bolivia. *Fitoterapia*, 74:407-416.
- Fetrow CW & Avila JR. 2000. The Complete Guide to Herbal Medicines. Pocket Books Editorial. 720 pp. ISBN-10 0743400704, ISBN-13 9780743400701.
- Fratkin J. 1991. Chinese Herbal Patent Formulas, A Practical Guide. Shya Publications. 4° Ed. 356 pp. ISBN-10 0962607827, ISBN-13 9780962607820.
- Fromm H, Roat JW, Gonzalez V, Sarva RP & Farivar S. 1983. Comparative efficacy and side effects of ursodeoxycholic and chenodeoxycholic acids in dissolving gallstones: a double-blind controlled study. *Gastroenterology*, 85:1257–1264.

- Gomez A. 2007. Litiasis Biliar, Actualización. Farmacia Profesional (Farmacia Comunitaria), 21(10):48-54. En: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-13112868>.
- Gonzalez M, Bastidas BE y Panduro A. 2005. Factores de riesgo en la génesis de la Litiasis Vesicular. La hepatología molecular: un enfoque multidisciplinar. Investigación en Salud. Medigraphic Artemisa, Vol. 7:71-78. En: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invsal/isg-2005/isgs051l>.
- Gordon L. (ed.). 1977. Green magic, flowers, plants and herbs in lore and legend. Wenn and Bower Limited, London.
- Harlan JR. 1971. Agricultural origins: centers and noncenters. Science 174:468–474.
- Hernández X E. 1985. «Autobiografía». En: Xolocotzia. Obras de Efraím Hernández Xolocotzi. Revista de Geografía Agrícola, 15-23.
- Heuman D. 2017. Gallstones (Cholelithiasis). Overview. Emedicine.medscape.com. Acceso: 20 august 2018.
- IMSS. 2010. Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento de Colecistitis y Colelitiasis. México, Instituto Mexicano del Seguro Social. 38 pp. ISBN 978-607-8270-71-2.
- Juárez-Rosete CR, Aguilar-Castillo JA, Juárez-Rosete ME et al. 2013. HIERBAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES EN MÉXICO: TRADICIÓN E INOVACION. Revista Biociencias 2(3):119-129. ISSN 2007-3380.
- Kaur G, Singh SP & Singh AP. 2013. Prevalence of Overweight and Obesity in Urban and Rural Women of Punjab. Hum Bio Rev, 2(4):306-313.
- Kim IS, Myung SJ, Lee SS, Lee SK & Kim MH. 2003. Classification and Nomenclature of Gallstones Revisited. Yonsei Medical Journal, 44(4):561-570.
- Klein R. 2004. Phylogenetic and phytochemical characteristics of plant species with adaptogenic properties. MS Thesis. Montana State University, Dept Plant Sciences & Plant Pathology. 130 p.
- Lee MR. 2011. The history of Ephedra (ma-huang). J R Coll Physicians Edinb 41(1):78–84. DOI: 10.4997/JRCPE.2011.116
- Leuschner U, Hellstern A, Ansell A, Gatzten M, Güldütuna S and Leuschner M. 1994. Manual and automatic gallstone dissolution with methyltert-butyl ether. Dig Dis Sci, 39(6):1302-1308.
- Lev E. 2002. Medicinal substances of the Medieval Levant. Eretz, Tel Aviv.
- Levy J & Sharoni Y. 2004. Lycopene and its role in human health. Herbal Gram 62:49-56.

- Lin XZ, Chou TC, Lin PW et al. 1994. LIVER AND BILIARY. Chemical dissolution of gallstones in Taiwan: An in vitro study. *J Gastroenter & Hepat*, 9:143-147.
- Lira R., Casas A., Rosas-López R., Paredes-Flores M., Pérez Negrón E., Rangel-Landa S., Solís L., Torres I. & Dávila P. 2009. Traditional Knowledge and Useful Plant Richness in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Economic Botany*, 63:271-287.
- Mack E, Patzer EM, Crummy AB, Hofmann AF and Babayan VK. 1981. Retained biliary tract stones. Nonsurgical treatment with capmul 8210, a new cholesterol gallstone dissolution agent. *Arch Surg*, 116(3):341-344.
- Mc Cleary B & Prosky L. 2000. *Advanced Dietary Fibre Technology*. Wiley-Blackwell Pub. 572 pp. ISBN-10 0632056347, ISBN-13 9780632056347.
- May GR, Sutherland LR, Shaffer EA. 1993. Efficacy of bile acid therapy for gallstone dissolution: a meta-analysis of randomized trials. *Aliment Pharmacol Ther*, 7:139-148.
- Moga MM. 2003. Alternative treatment of gallbladder disease. *Medical Hypotheses* 60(1):143-147.
- Moreno, Salvador.1995. *Historia de México*. México: Ediciones Pedagógicas.
- Moreno-Peña DP, Oranday-Cárdenas MA y Cordero-Pérez P. 2016. Actividad antihipercolesterolemica. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España. OmniaScience, 129-160.
- O'Leary DP & Johnson AG. 1993. Future directions for conservative treatment of gallbladder calculi. *Br J Surg* 80(2):143-147.
- Palevitch D, Yaniv Z. 2000. *Medicinal Plants of the Holy Land*. Tel Aviv, Israel: Modan Publishing House, Tel-Aviv, 104, 122, 205, 266-269.
- Pickersgill B. 2009. Domestication of plants revisited – Darwin to the present day. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 203-212. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2009.01007.x
- Pitt HA, McFadden DW & Gadacz TR. 1989. Agents for Gallstone Dissolution. *The American Journal of Surgery* 158:262-274.
- Pribam BOC. 1939. Ether treatment of gallstones impacted in the common duct. *Lancet* 1(1):1311-1313.
- Ramawat KG & Mérillon JM (eds.). 2008. *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*. Springer. DOI: 10.1007/978-3-540-74603-4. 391 pp.
- Ramirez JP. 1998. Tratamiento naturista de la litiasis biliar: lavado hepático con aceite de oliva; estudio de doce casos. *Natura Medicatrix* No. 50:39-42.

- Rivas-Morales C, Oranday-Cardenas MA y Verde-Star MJ (Ed.). 2016. Investigación en Plantas de Importancia Médica. OmniaScience, UANL, FCB, CA-QB. Omnia Publisher SL. 452 p. ISBN: 978-84-944673-7-0.
- Rzedowski GC de y Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Savnur HV. 1984. Ayurvedic materia medica: principles of pharmacology and therapeutics. Sri Satguru Publications, Delhi.
- Schoenfield LJ & Marks JW. 1993. Oral and contact dissolution of gallstones. *Am J Sur*, 165(4): 427-430.
- Spiridonov NA. 2012. Mechanisms of Action of Herbal Cholagogues. *Med Aromat Plants*;1:s107.
- SSA 2001. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, FEUM, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 228 p. ISBN: 968-811-982-2.
- Tepperman J, Caldwell F & Tepperman HM. 1964. Induction of gallstones in mice by feeding a cholesterol-cholic acid containing diet. *Am J Phys*, 206(3):628-634.
- ThermoFisher Sci. 2020. Ficha técnica de éter dietílico. En: https://www.fishersci.es/chemicalProductData_uk/wercs?itemCode=10171610&lang=ES, Access: Jul 2021.
- Tint GS, Salen G, Colalillo A, Graber D, Verga D, et al. 1982. Ursodeoxycholic acid: a safe and effective agent for dissolving cholesterol gallstones. *Ann Intern Med* 97(3):351-356.
- UNAM. 2009. Desmodium incanum DC. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México. En: www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Hoja_de_pega&id=7837. Access: Jan 2019.
- Vallejo Villalobos JR, Pardo de Santayana M y Peral Pacheco D. 2009. La historia de la fitoterapia en Egipto: un campo abierto a varias disciplinas. *Medicina Naturista*, 3(2):101-105.
- Vavilov, N. I., 1926. Origin and Geography of cultivated plants. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vergunst H, Terpstra OT, Nijs HGT & Steen G. 1991. In vitro comparison of different gall Stone dissolution solvents. *Gut*, 32:211-214.

- Vidyashankar S, Sambaiah K and Srinivasan K. 2010. Effect of dietary garlic and onion biliary proteins and lipid peroxidation with influence cholesterol nucleation in bile. *Steroids*, 75(3): 272-281, doi: 10.1016/j.steroids.2010.01.003. Epub 2010 Jan 14.
- Walker JW. 1891. The removal of gallstones by ether solution. *Lancet* 1(1):874-878.
- Wanjari MM, Gangoria R, Dey YN, Gaidhani SN, Pandey NK & Jadhav AD. 2016. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Bombax ceiba* flowers against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Hepatoma Res*, 2:144-50.
- Yamagata S & Maki T. 1986. New classification of gallstone in Japan. *Jpn Gastroenterol J*, 83:309-316.
- Zizumbo D & Colunga-GarcíaMarín P. 2010. Origin of agriculture and plant domestication in West Mesoamerica. *Genetic Resources Crop Evolution*, 57: 813-825.
- Zohary M. 1982. *Plants of the Bible. A complete handbook to all the plants with 200 full-color plates taken in the natural habitat.* Cambridge University Press, Cambridge, pp 1–220.

APÉNDICE I

Cuadro 5.- Análisis de Similitudes, comparando pérdida de la masa entre 30 muestras, con distancias Euclidianas y el uso de PRIMER+ v.6. (Anderson et al. 2008).

Disolución		Cálculo número																														
Distance (0 to inf)		7	14	18	19	25	2	9	16	17	29	12	22	24	27	30	1	4	6	10	20	3	11	21	23	28	5	8	13	15	26	
7	0																															
14	3E-2	0																														
18	3E-2	3E-2	0																													
19	4E-2	4E-2	1E-2	0																												
25	4E-2	4E-2	1E-2	0	0																											
2	1E-2	1E-2	1E-2	0	5E-2	0																										
9	0	0	3E-2	4E-2	4E-2	1E-2	0																									
16	2E-2	2E-2	1E-2	2E-2	2E-2	2E-2	3E-2	2E-2	0																							
17	1E-2	1E-2	2E-2	3E-2	3E-2	2E-2	2E-2	1E-2	1E-2	0																						
29	1E-2	1E-2	2E-2	3E-2	3E-2	2E-2	2E-2	1E-2	1E-2	0	0																					
12	2E-2	2E-2	1E-2	2E-2	2E-2	2E-2	3E-2	2E-2	0	1E-2	0	0																				
22	0	0	3E-2	4E-2	4E-2	1E-2	0	2E-2	1E-2	1E-2	2E-2	0	2E-2	0	2E-2	0	1E-2	1E-2	0	1E-2	0	2E-2										
24	2E-2	2E-2	1E-2	2E-2	2E-2	2E-2	3E-2	2E-2	0	1E-2	1E-2	0	2E-2	0	2E-2	0	1E-2	1E-2	0	1E-2	0	2E-2										
27	2E-2	2E-2	1E-2	2E-2	2E-2	2E-2	3E-2	2E-2	0	1E-2	1E-2	0	2E-2	0	2E-2	0	1E-2	1E-2	0	1E-2	0	2E-2										
30	1E-2	1E-2	2E-2	3E-2	3E-2	2E-2	2E-2	1E-2	1E-2	0	1E-2	0	1E-2	1E-2	1E-2	0	1E-2	1E-2	0	1E-2	0	2E-2										
1	4E-2	4E-2	1E-2	0	0	5E-2	4E-2	4E-2	2E-2	3E-2	2E-2	4E-2	2E-2	2E-2	2E-2	4E-2	3E-2	2E-2	0	1E-2												
4	5E-2	5E-2	2E-2	1E-2	1E-2	6E-2	5E-2	3E-2	4E-2	4E-2	3E-2	4E-2	3E-2	3E-2	3E-2	4E-2	4E-2	1E-2	0	1E-2												
6	4E-2	4E-2	1E-2	0	0	5E-2	4E-2	2E-2	3E-2	3E-2	2E-2	4E-2	2E-2	2E-2	2E-2	3E-2	3E-2	0	1E-2	0												
10	4E-2	4E-2	1E-2	0	0	5E-2	4E-2	2E-2	3E-2	3E-2	2E-2	4E-2	2E-2	2E-2	2E-2	3E-2	3E-2	0	1E-2	0												
20	5E-2	5E-2	2E-2	1E-2	1E-2	6E-2	5E-2	3E-2	4E-2	4E-2	3E-2	4E-2	3E-2	3E-2	3E-2	4E-2	4E-2	1E-2	0	1E-2												
3	7E-2	7E-2	4E-2	3E-2	3E-2	8E-2	7E-2	5E-2	6E-2	6E-2	5E-2	7E-2	5E-2	5E-2	5E-2	6E-2	6E-2	3E-2	2E-2	3E-2	3E-2	2E-2	1E-2	0	1E-2	0	1E-2	0	1E-2	0	1E-2	
11	6E-2	6E-2	3E-2	2E-2	2E-2	7E-2	6E-2	4E-2	5E-2	5E-2	4E-2	5E-2	4E-2	4E-2	4E-2	5E-2	5E-2	2E-2	1E-2	2E-2	2E-2	1E-2	0	1E-2								
21	5E-2	5E-2	2E-2	1E-2	1E-2	6E-2	5E-2	3E-2	4E-2	4E-2	3E-2	4E-2	3E-2	3E-2	3E-2	4E-2	4E-2	1E-2	0	1E-2												
23	6E-2	6E-2	3E-2	2E-2	2E-2	7E-2	6E-2	4E-2	5E-2	5E-2	4E-2	5E-2	4E-2	4E-2	4E-2	5E-2	5E-2	2E-2	1E-2	2E-2	2E-2	1E-2	0	1E-2								
28	9E-2	9E-2	6E-2	5E-2	5E-2	0.1	9E-2	7E-2	8E-2	8E-2	8E-2	7E-2	9E-2	7E-2	7E-2	8E-2	8E-2	4E-2	3E-2	4E-2	4E-2	3E-2	2E-2	1E-2	0	1E-2	0	1E-2	0	1E-2	0	1E-2
5	0.88	0.85	0.88	0.89	0.89	0.84	0.85	0.87	0.88	0.86	0.87	0.86	0.85	0.87	0.87	0.88	0.88	0.89	0.89	0.89	0.89	0.9	0.91	0.9	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
8	0.88	0.86	0.89	0.9	0.9	0.85	0.86	0.88	0.88	0.87	0.87	0.88	0.86	0.88	0.88	0.88	0.87	0.89	0.89	0.89	0.89	0.9	0.91	0.93	0.92	0.91	0.92	0.91	0.92	0.95	1E-2	
13	0.77	0.77	0.8	0.81	0.81	0.76	0.77	0.79	0.78	0.78	0.78	0.79	0.77	0.79	0.79	0.78	0.81	0.81	0.82	0.81	0.81	0.82	0.84	0.83	0.82	0.83	0.86	8E-2	9E-2			
16	0.83	0.83	0.86	0.87	0.87	0.82	0.83	0.85	0.84	0.84	0.84	0.85	0.83	0.85	0.85	0.84	0.87	0.88	0.88	0.87	0.88	0.88	0.9	0.89	0.88	0.88	0.89	0.92	2E-2	3E-2	6E-2	
26	0.92	0.92	0.95	0.96	0.96	0.91	0.92	0.94	0.93	0.93	0.93	0.94	0.92	0.94	0.94	0.93	0.98	0.98	0.97	0.96	0.96	0.97	0.99	0.98	0.97	0.98	1.01	7E-2	6E-2	0.16	9E-2	



Cuernavaca, Mor., a 08 de junio de 2021.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **"Capacidad disolutiva sobre cálculos biliares de colesterol de cuatro especies medicinales in vitro"**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Luis Enrique Valdivia Mares**

Comité de revisión de tesis:

Dra. Laura Patricia Alvarez Berber (Director de tesis)

Dra. Verónica Rodríguez López

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Dr. Manasés González Cortázar

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dra. Laura Patricia Alvarez Berber



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2021-08-05 17:30:45 | Firmante
GgTne2oCdRFP9cm7aobJkLNoevKfRrY6eQXBh5LpTDMxM4cZvzaUTWPCxbWT39Rg9iaDpN2AQRnbPeipv15UV7hw4yigUdQK3Vy9tJpn8Ad269W072XD+3FNTQ7NTvKQ
vuPTP8pC7gJZV2Uj431VpoiQe7Kma9d7azrJN70kz35Pvm+8AXSUKz5v9yQvVRFAQJyF29fM0u21WBW0wnAAwe5i00NkoDk2TAHocKvVrbz8yhxQ88nOgKUKZuPqwM18
Sqerd204nagMejth806KwQMzVWTku9UjkiDkK2ovWUawfP96a5EJqHtMna7u55aCReCb1ZiA**

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



scNqOg

<https://efirma.uaem.mx/hc/Repudio9NYRa5db6QCmkVMagkTvrQ8mQJZwQTD>



Una universidad de excelencia

RECTORIA
2017-2023



Centro de Investigación en Biotecnología

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Cuernavaca, Mor., a 08 de junio de 2021.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **"Capacidad disolutiva sobre cálculos biliares de colesterol de cuatro especies medicinales in vitro"**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Luis Enrique Valdívila Mares**

Comité de revisión de tesis:
Dra. Laura Patricia Alvarez Berber (Director de tesis)
Dra. Verónica Rodríguez López
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez
Dr. Manasés González Cortázar

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dra. Verónica Rodríguez López



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VERÓNICA RODRIGUEZ LOPEZ | Fecha: 2021-08-04 19:56:21 | Firmante
IqWwFmOTUQusd7Hm3DpZw6BeyPSihUyAhyeHMY7XD46BNUDytpPzBNhaPkaAG6hXQZ1HvzJLRejgWAPeSHhZKYVkoTazr6Hq4AUclMGeTawTvbGTL931BPO5DyXXa
G2nN8natoR-gj80+vtTEZrZ38igMH700azgVv9HAcjmiMqJEY5c+WeNMhaDe2HhYK07AInvkz63+YB1BJuq9G6FmwdWmppNmh757bd/Q8eGhcKPhR2DjgYIGKggulG
pLMe5p9QygQoz5SEAJOMrbFVL64RyAkMm8qD1JbLaA33MBKkx0QG3NLUZLA3QXU45XvA==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

E=Q3D6

<https://efirma.uaem.mx/hojarepublica/frmFVV3M8a1h6PYonFz2na6em1upcy56P>





Cuernavaca, Mor., a 08 de junio de 2021.

Programa:

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: "Capacidad disolutiva sobre cálculos biliares de colesterol de cuatro especies medicinales in vitro"

Alumno que presenta tesis a revisión: **Luis Enrique Valdivia Mares**

Comité de revisión de tesis:

Dra. Laura Patricia Alvarez Berber (Director de tesis)

Dra. Verónica Rodríguez López

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Dr. Manasés González Cortázar

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXANDRE TOSHERRICO CARDOSO TANETA | Fecha:2021-08-04 18:50:05 | Firmante
cBXjF4ep16D4j8f0gfc7zu0TUT1TW00TDp5d4y67RTYg7WfUgca4uv9bW166AHfWMDHfYK9kz06yedk0KTD4eepyo1bT9qv10VL1r5pouPYA0gihDipd2maQccJyNfbaM9jg0
03e0uJGWMj2ruMdY4e9qM1nqrd0XelMm9ev1Z8W9HppqHuNbXm0lqz3PUkMzaMX+V6HidR5P0Fuh7CP4806H1pccz25bXFB4JRA+VVi915Phe1Banc3CZ69ha80u1NuzRov
Y8PHUEJxVuc4BnvwRjOutg1ca8xh17z0PuaemvhaJF5gkLPR3X0jW54Pd0**



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

b7QaY

<https://efirma.uaem.mx/hoReputio/UQVxATg7VusM9kM5DATAc7akulqbgGig>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Centro de Investigación en Biotecnología

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Cuernavaca, Mor., a 08 de junio de 2021.

Programa:

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **“Capacidad disolutiva sobre cálculos biliares de colesterol de cuatro especies medicinales in vitro”**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Luis Enrique Valdivia Mares**

Comité de revisión de tesis:

Dra. Laura Patricia Alvarez Berber (Director de tesis)

Dra. Verónica Rodríguez López

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Dr. Manasés González Cortázar

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ | Fecha: 2021-08-06 12:26:26 | Firmante
XU7FeEefHZX352NUwNnYpSULHn5E56Uim8g2EUe6sn2fPmOJ4EUMXjX2c+rTOO0Wt7RmGg+ch2t45U6i9KnjzfHuZ7zRj7pd8gTYKl8aNFx+dnKUI07iXwtE5Fp1i2qK9
EVhtQsbE0ve9mc6eRMSXitCG+EFFLLe8E1Uw1viWB+AxJufmeC9wezTfMOJTaUOz6Prz8F/p6b0Yc0dNgmLuXUsm+QjKLmUuo5RZxz6kRcdQmJ6Bwkhvz5ZM3Jj3ovJ7+Cxl0h
Jl0LjTu5n8Js5mKVM356dcvtr8pqJb3kDI4PFoTU5gim5odcaRyQGUhw6bi00/WQ==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

CdyZ71

<https://efirma.uaem.mx/InoRepudio/DHTcq2DActCj47ZXcW9FAICNIXWUvrvz>



Cuernavaca, Mor., a 08 de junio de 2021.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: "Capacidad disolutiva sobre cálculos biliares de colesterol de cuatro especies medicinales *In vitro*"

Alumno que presenta tesis a revisión: **Luis Enrique Valdivia Mares**

Comité de revisión de tesis:
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber (Director de tesis)
Dra. Verónica Rodríguez López
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez
Dr. Manasés González Cortázar

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Manasés González Cortázar



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR | Fecha: 2021-08-05 10:57:50 | Firma: cQwISiHguGehHqEgaZwTexFMQIHQAchqFSYEzNS+yyOVTgWkicOwKdsuCOZED+V58eOrGoyanMRq8emVWGUHELqBT9RUEEDJAzvp5qEMwaHdYUvacb0ic5mcRbaNzpbWcl3j8KDEHqngnaci8oolmazqLMPMRPCHyeyLAWPgdHnnQZ3huTymaaRTuocy+ADukHpb0hhGok8GowNkkUmS0Ys+HFDNmygNaa7a0edNblqelqTtEuaAkaEjyhaRYPNjmm5Ka@34w0Fz6b+iz47UwGka9FYa5nLmw89RC7u7wv3tghFFQR8DBNIFQVYRzXnw**



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

cRgC63

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/75qUo/VWQ3KCvgY3Cakjgv0H05aGek>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023