



ORIGINAL

EFECTO IN VITRO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *PHYLLANTHUS SP.* SOBRE LA CRISTALIZACIÓN DE OXALATO DE CALCIO

Gabriela María Núñez Mössner¹, Camila Alejandra Palacios Pereira¹, Christopher Daniel Narváez Parra¹, Luana del Mar Ocariz Philipp¹, Patricia Funes², Rosa María Guillén Fretes²

¹ Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

² Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

RESUMEN

Introducción: El *Phyllanthus sp.* o “Para para’i” es conocido por disolver piedras de los riñones, la vejiga y la vesícula.

Objetivo: Analizar el efecto del extracto acuoso de *Phyllanthus sp.* sobre la cristalización de oxalato de calcio inducida in vitro, evaluando el número de cristales, sus dimensiones y el número de agregados cristalinos.

Métodos: Ensayo experimental de fase preclínica, realizado en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. De acuerdo con la técnica de Bensatal et. al. fueron utilizados tres grupos: *Phyllanthus sp.* al 5%, al 10% y un grupo control. Se realizaron dos lecturas, una lectura basal y otra a los 10 minutos teniéndose en cuenta el número de cristales/mm³, el tamaño (μm) y el número de agregados de cristales/mm³. Cada ensayo tuvo seis repeticiones.

Resultados: Se obtuvo asociación significativa (p<0,05) de la mediana de las variables número de cristales y cantidad de agregados de cristales de los extractos al 5mg% y 10mg% con las del ensayo control. La asociación de la mediana de la variable tamaño de los cristales, entre el grupo control y el extracto al 5%, no fue significativa; con el extracto al 10% si hubo significancia.

Conclusión: El extracto del *Phyllanthus sp.* disminuyó el número de agregados de los cristales de oxalato de calcio. Los efectos sobre el crecimiento de los cristales fueron inconclusos. El *Phyllanthus sp.* podría prevenir la formación de cálculos renales, se sugiere realizar estudios in vitro, repitiendo el experimento con otras concentraciones y un mayor número de ensayos, como así también in vivo.

Palabras clave: Fitoterapia, Litiasis, Oxalato de Calcio.

IN VITRO EFFECT OF AQUEOUS EXTRACT OF *PHYLLANTHUS SP.* ON THE CRYSTALLIZATION OF CALCIUM OXALATE

ABSTRACT

Background: *Phyllanthus sp.* also called “Para para’i” is known for its property to dissolve stones in kidneys, bladder and gallbladder

Objective: To analyze the effect of aqueous extract of *Phyllanthus sp.* on the crystallization of calcium oxalate induced in vitro by evaluating the number and the size of crystals and the number of crystal aggregates.

Methods: Preclinical phase experimental testing, done at the Health Sciences Research Institute. According to the technique of Bensatal et al. three groups were used: *Phyllanthus sp.* to 5%, to 10% and a control group. Two readings were taken: one basal reading and the other at 10 minutes, taking into account the number of crystals / mm³, the size (µm) and the number of aggregates of crystals / mm³. Each trial had six replicates.

Results: The comparisons of the medians of the variation recorded from the control and test solutions were analyzed. A $p < 0.05$ was considered as significant. A significant association ($p < 0.05$) was found between the medians of the number of crystals and the amount of crystal aggregates of the extracts at 5 mg% and 10 mg% with the control group. The association of the crystal size variable, between the control group and the 5% extract, was not significant; with the extract at 10% it was significant.

Conclusion: The extract of *Phyllanthus sp.* decreased the number of aggregates of calcium oxalate crystals. The effects on crystal growth were inconclusive. *Phyllanthus sp.* could prevent the formation of kidney stones. It is suggested that in vitro studies are performed, repeating the experiment with other concentrations and in a larger number of trials, as well as in vivo.

Keywords: Phytotherapy, Lithiasis, Calcium Oxalate.

INTRODUCCIÓN:

La litiasis renal, enfermedad conocida desde hace siglos, se caracteriza por ser un cuadro complejo en el que intervienen factores genéticos, anatómicos y ambientales. Existe cada vez más evidencia de que se trata de una enfermedad sistémica que puede llevar a una insuficiencia renal crónica susceptible de precisar diálisis(1,2).

Los cálculos renales son estructuras cristalinas incluidas en una matriz orgánica

y están compuestos por materiales que normalmente se eliminan por la orina. Su formación se inicia con la nucleación, seguida del crecimiento y culmina con la agregación de los cristales, dentro de un ambiente favorecido por múltiples eventos fisicoquímicos. Hasta un 70%-80% de los cálculos están constituidos por sales de calcio, siendo los más frecuentes los oxalocálcicos, que a su vez pueden ser monohidratos (whewellita o COM) o

dihidratados (weddellita o COD). La forma de cristales de oxalato monohidrato (COM) es termodinámicamente más estable, tiene mayor afinidad por las células tubulares renales y por tanto es responsable, en mayor medida, de la formación de los cálculos renales(2-4).

Es considerada como la tercera patología más común del tracto urinario, sin tener en cuenta la geografía, raza y cultura. La prevalencia de litiasis renal es del 10-12% en los países industrializados. La incidencia ha ido en aumento y la edad de inicio ha disminuido. Además, la tasa de recurrencia a los 10 años se describe en más del 50% de los pacientes (5,6).

En Latinoamérica la prevalencia de litiasis renal oscila entre el 1 y el 5%. En Paraguay hay estudios que describen la morfología de los cálculos, constituyendo las de naturaleza oxalocálcica como las más frecuentes, pero no hay datos que indiquen la prevalencia en la población general (7,8).

La actuación urológica depende fundamentalmente del tamaño y la localización de los cálculos. La litotricia por ondas de choque, la pielolitomía y nefrolitotmía percutánea conforman las técnicas más utilizadas, en el caso de que el tratamiento sintomático, que consiste en hidratación, analgesia y espasmolíticos, no funcione(2).

Teniendo en cuenta la alta prevalencia de las recurrencias, la prevención es fundamental en pacientes asintomáticos y posquirúrgicos. Consiste en el aumento de la ingesta de líquidos y agentes que eviten la formación o que favorezcan la reducción de cristales. Debido a las pocas opciones farmacológicas disponibles para tal fin, más los efectos secundarios de los tratamientos urológicos, en los últimos años se ha reportado un creciente interés

en el uso de las plantas medicinales. El fundamento de su utilización a través de estudios sistemáticos y lógicos no está completamente esclarecido, a excepción de algunas plantas (9-11).

El *Phyllanthus sp.*, comúnmente llamado “Para para’i” o “rompepiedras”, es una planta medicinal con propiedades diuréticas, y popularmente es utilizado para disolver los cálculos en los riñones, en la vejiga y en la vesícula biliar(12).

Sin embargo, este uso popular no cuenta con evidencia científica que lo respalde hasta el momento; por lo que el presente trabajo tiene como objetivo general analizar el efecto de extractos acuosos de esta planta sobre la cristalización del oxalato de calcio en un modelo in vitro. Los objetivos específicos serán determinar la cantidad, analizar las variaciones en el tamaño y cuantificar los agregados de los cristales de oxalato de calcio en presencia y ausencia del extracto acuoso de *Phyllanthus sp.* (“Para para’i”).

MATERIALES Y MÉTODOS:

Ensayo experimental de fase preclínica que sigue las condiciones establecidas en el trabajo de Bensatal et. al. Realizado en el Departamento de Bioquímica Clínica del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), localizado en la ciudad de San Lorenzo – Paraguay (13).

Preparación del extracto:

La obtención del material vegetal seco se realizó por medio de la compra a un vendedor particular, en formato de sobres con un peso promedio de 6,5 g adquirido del Mercado 4.

Se realizó la preparación de una infusión del *Phyllanthus sp.* (“Para para’i”), como se

describe a continuación: 10 g de la hierba seca se pesaron en una balanza de precisión, luego se resuspendió el material vegetal en 100 mL de agua destilada a una temperatura de 70°C dejando en incubación y reposo con agitación esporádica por 10 minutos. Se dejó enfriar y se filtró el extracto empleando papel de filtro Whatman 3 mm. El extracto obtenido correspondía a la solución madre de concentración 10 % (p/v), a partir de la cual se realizó una dilución al ½ con agua destilada para generar la solución de 5% (p/v).

Ensayo de cristalización

i. Preparación de la solución control

La solución control fue preparada con Cloruro de Calcio Dihidratado ($\text{CaCl}_{22}\text{H}_2\text{O}$) [10mM] y Oxalato de Sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) [4mM] en partes iguales como se muestra en la tabla I. Se utilizó Cloruro de Sodio (NaCl) [0,15 M] como blanco de reactivo (solución que contiene todos los reactivos). Las condiciones de reacción empleadas en los experimentos control se detallan en la tabla I.

ii. Ensayo con el inhibidor (*Phyllanthus sp.*)

Para estudiar el efecto del extracto de *Phyllanthus sp.* (Para para'i) se adicionó 500 µL del extracto acuoso en concentraciones de 5 y 10 mg% a la solución control. Las condiciones de reacción empleadas en los experimentos se detallan en la tabla I.

iii. Procedimiento de incubación

Los tubos fueron incubados a 37°C en baño María. Se realizó el estudio de microscopía para el recuento y la medición de cristales y agregados a tiempo 0 y a 10 min.

Se realizaron seis repeticiones de reacción para cada ensayo tanto los controles en ausencia de extracto acuoso y como de experimentos en presencia de dichos extractos para ambas concentraciones

analizadas (5 y 10 mg% de *Phyllanthus sp.*)

iv. Estudio microscópico

Los cristales formados fueron contados empleando microscopía óptica, utilizando la cámara de Neubauer y realizando el cálculo según procedimiento estandarizado. Se determinó el número y el tamaño de los cristales, así como el número de agregados.

Procedimiento estadístico

Se utilizó estadística no paramétrica, empleando mediana como medida de tendencia central y rango intercuartílico como medida de dispersión, debido a que el número de repeticiones es inferior a 30 con lo que se estima que la distribución de los datos podría no seguir la curva de Gauss. La prueba de los rangos con signo de Wilcoxon fue empleada para analizar las variaciones respectivas entre los ensayos de control y experimento. La prueba del signo de Wilcoxon se utiliza para muestras pareadas y no paramétricas; compara dos mediciones de rangos (medianas) y determina que la diferencia no se deba al azar, es decir, que la diferencia sea estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con un intervalo de confianza del 95%(14).

RESULTADOS:

Los parámetros analizados corresponden a la mediana como medida de tendencia central y al intervalo intercuartílico como medida de dispersión estadística.

En la tabla II se exponen las variaciones entre la lectura basal y a los 10 minutos de los grupos control, extracto acuoso al 5mg% y al 10mg%. En el grupo control se observó un aumento del parámetro medido de las variables números de cristales y agregados de cristales, no siendo así para la variable tamaño de cristales. Con el extracto al 5%

Tabla I. Concentraciones de los reactivos utilizados en el presente trabajo.

	Control	Experimento
Cloruro de Calcio dihidratado CaCl₂·2H₂O (10mM)	500 µl	500 µl
Oxalato de Sodio Na₂C₂O₄ (4mM)	500 µl	500 µl
Cloruro de Sodio NaCl (0,15M)	500 µl	---
Extracto acuoso	---	500 µl
Volumen final de la reacción	1500 µl	1500 µl

se constató una disminución de la mediana, tanto del número de cristales como del número de agregados, mientras que tamaño de los cristales registró un aumento. El experimento con el extracto al 10%, se registró un aumento de la mediana de las variables tamaño y número de agregados de cristales, a su vez se constató una disminución del número de cristales. (Ver Tabla II).

La tabla III registra el análisis de las comparaciones de la mediana de las variaciones de las soluciones control y ensayo. Se obtuvo una asociación significativa de las variables número de cristales y de agregados de cristales de los extractos al 5% y 10% con las del ensayo control. La asociación de la variable tamaño de los cristales, entre el grupo control y el extracto al 5%, no fue significativa; mientras que con el extracto al 10% si hubo significancia. (Ver Tabla III)

En el gráfico I se muestran las imágenes obtenidas durante la lectura basal y a los 10 minutos del grupo control y del ensayo con el extracto al 5mg%.

DISCUSIÓN:

Factores como el arraigo cultural, el fácil acceso, el bajo coste y la ineficacia de la medicina científica como tratamiento de ciertas patologías, han determinado un creciente interés en la fitoterapia como alternativa a la atención primaria de salud en varios países. En nuestro país es bastante conocido el uso de *Phyllanthus sp* (Para para 'i) como agente antiurolitiásico, por tanto con este estudio se procedió a evaluar en un ensayo in vitro, el efecto del extracto acuoso del material vegetal de dicha especie (15).

El principal efecto que se obtuvo con el extracto del material vegetal seco del *Phyllanthus sp.* fue la disminución del número de agregados.

La etapa que le sigue a la nucleación es la agregación de cristales, y es considerada como el paso más crítico en la formación del cálculo renal, ya que ocurre con suma rapidez, además de ser el factor determinante del tamaño del cálculo. Los

Tabla II. Variaciones de la mediana y de los intervalos intercuartílicos registrados (Lectura a 10 min – Lectura basal)

	Grupo Control	Extracto acuoso al 5%	Extracto acuoso al 10%
N.º de cristales/mm³	+620 (340 – 760)	+620 (340 – 760)	-15 (-190 – 150)
Tamaño (µm)	-0,4 (-0,9 – 0)	-0,4 (-0,9 – 0)	+0,05 (-0,2 – 1,7)
N.º de agregados de cristales/mm³	+75 (30 – 200)	+75 (30 – 200)	+5 (-10 – 20)

Interpretación de signos: (+) aumento o (-) disminución en parámetro medido

Tabla III. Comparación de variaciones de la solución control y los ensayos a concentración 5 mg% de *Phyllanthus sp.*

	p ^a (entre solución control y ensayo al 5mg%)	p ^a (entre solución control y ensayo al 10mg%)
N.º de cristales/mm ³	0,028	0,028
Tamaño (µm)	0,893	0,027
N.º de agregados de cristales (mm ³)	0,028	0,043

^a Prueba de rangos de Wilcoxon

cristales más grandes son menos propensos a ser eliminados espontáneamente a través del tracto urinario. Los estudios in vitro de las plantas de *Sorghassum wightii*, *Bergenia ciliata* y de ciertas plantas argelinas, demostraron una mayor inhibición de la formación de agregados. Dicho efecto podría deberse a ciertos componentes de las plantas. A diferencia de los trabajos anteriormente mencionados, nuestro trabajo no mostró ser dependiente de la concentración del extracto. (10,16–21)

El estudio in vitro del extracto acuoso de esta planta, utilizada principalmente por la población brasilera para el tratamiento de urolitiasis, demostró tener un efecto inhibitorio sobre agregación de cristales, lo cual coincide con el nuestro; aunque difiere por el hecho de que el número de cristales fue aumentando en función al tiempo. Por tanto, el *Phyllanthus niruri* no inhibe la precipitación de los cristales de oxalato. Cabe mencionar, que los cristales de oxalato de calcio son eliminados más fácilmente mientras estén dispersos por más tiempo. Estos resultados también fueron obtenidos en trabajo realizado con *Herniara hirsuta*, planta de Morocco, en el que aclaran que este efecto podría deberse a la falta de pureza del material vegetal empleado y además, la formación de cálculos no requiere necesariamente la presencia de cristaluria. (22–26)

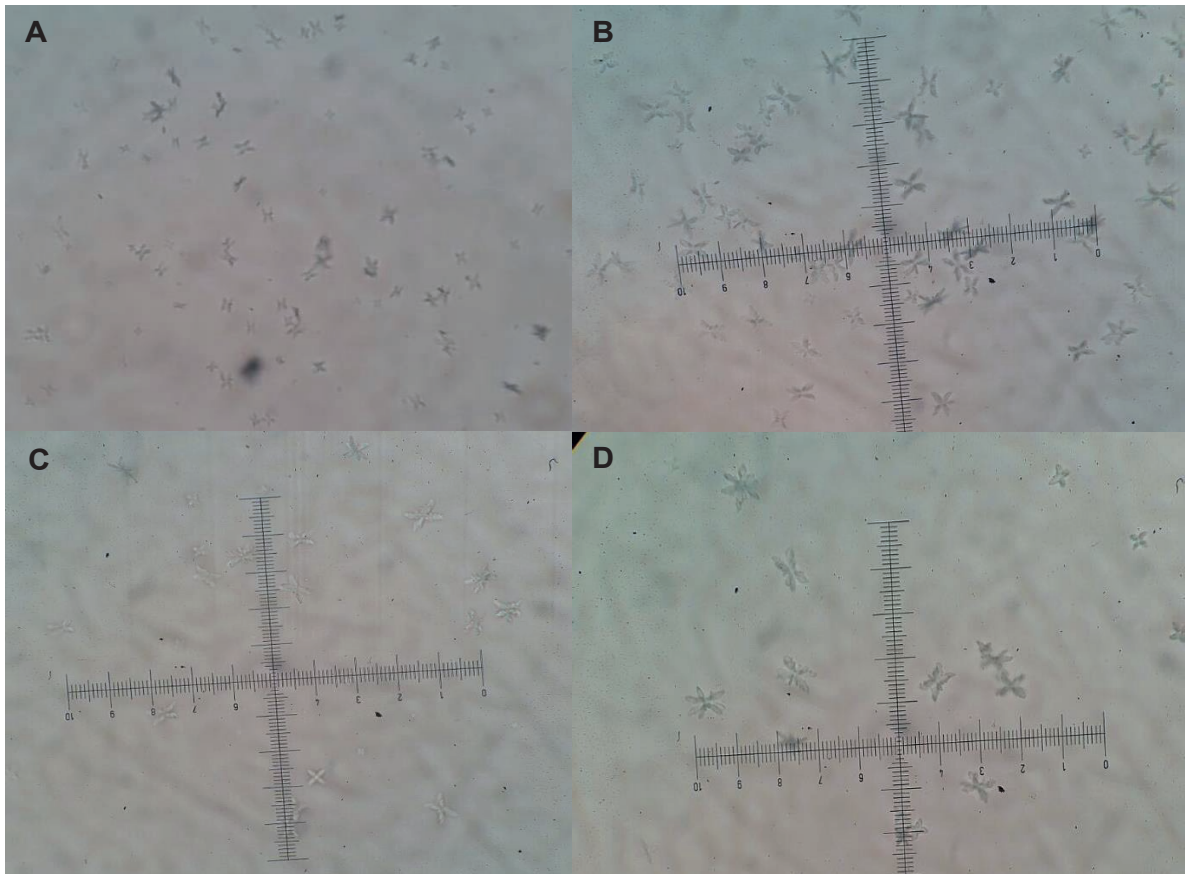
El análisis del crecimiento de los cristales, en los trabajos in vitro de las plantas Tribus terrestres, *Inji rasayanam*, *Sorghassum*

wightii y *Holarrhena antidysenterica*, demostró que a medida que se iba aumentando la concentración del extracto, más se reducía el número y tamaño de los cristales de oxalato de calcio. En el presente trabajo no se vio significancia en la reducción del tamaño dependiente de la concentración, lo cual podría deberse a que los autores de los trabajos mencionados anteriormente utilizaron otras técnicas de análisis, o que hayamos utilizado pocas concentraciones distintas o que el vegetal *Phyllanthus sp.* no tenga efecto sobre el tamaño de los cristales, lo que se contrapone con el trabajo de *Phyllanthus niruri*.(6,10,11,19)

Los cristales de oxalato pueden adoptar la forma monohidrato (COM) y la dihidrato (COD). En pacientes con litiasis renal la principal forma excretada es la COM, mientras que, en individuos sanos, la forma predominante es la COD. Nuestro trabajo no incluye el análisis del efecto del *Phyllanthus sp.* sobre la morfología de los cristales, pero los estudios realizados con *Phyllanthus niruri* reportan que el extracto indujo un aumento de las formas COD y una reducción de la cantidad de los cristales COM. Las propiedades antiurolitiasicas del *Phyllanthus niruri* son atribuidas a compuestos tales como flavonoides, polifenos y taninos. (22,27–30)

Las limitaciones del trabajo incluyen la obtención del material vegetal en su forma natural, la determinación de la especie analizada y la carencia de estructuras necesarias con el fin de adoptar

Gráfico I. Comparación de imágenes del grupo control y el extracto al 5mg%



A: T₀, grupo control; B: T₀: extracto al 5mg%; C: T₁₀: grupo control; D: T₁₀: extracto al 5mg%

la metodología de otros estudios, lo cual terminó dificultando el análisis de los resultados obtenidos.

Se sugiere realizar posteriormente ensayos experimentales para comprobar el efecto del extracto in vivo, considerando los múltiples factores relacionados a la formación, almacenamiento y excreción de la orina. Además de reproducir el experimento in vitro, utilizando el extracto de acuerdo con el consumo popular, y purificarlo con el fin de obtener el producto activo responsable de los efectos observados.

En conclusión, el extracto del material vegetal seco del *Phyllanthus sp.* demostró tener efectos inhibitorios sobre la agregación de los cristales de oxalato de calcio. Mientras que los efectos sobre el crecimiento de los cristales fueron

inconclusos.

La importancia de los resultados obtenidos en este trabajo radica en que la especie *Phyllanthus sp.* podría ser considerada, dentro de la medicina clínica, como un factor importante para la prevención de la litiasis renal, especialmente en personas que tengan un historial de litiasis renal y en aquellas propensas a desarrollarla.

Conflictos de interés:

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Financiamiento:

Autofinanciado.

Correspondencia:

Univ. Gabriela María Núñez Mössner
gabimossner@hotmail.es

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. López M, Hoppe B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatr Nephrol.* 1 de enero de 2010;25(1):49.
2. Borstnar CR, Cardellach F. Farreras Rozman. *Medicina Interna.* Elsevier España; 2016. 7081 p.
3. Verkoelen CF, Romijn JC, de Bruijn WC, Boevé ER, Cao L-C, Schröder FH. Association of calcium oxalate monohydrate crystals with MDCK cells. *Kidney Int.* 1 de julio de 1995;48(1):129-38.
4. Aggarwal A, Singla SK, Tandon C. Urolithiasis: phytotherapy as an adjunct therapy. *Indian J Exp Biol.* febrero de 2014;52(2):103-11.
5. Boim MA, Heilberg IP, Schor N. Phyllanthus niruri as a promising alternative treatment for nephrolithiasis. *Int Braz J Urol.* 2010;36:657-64.
6. Khan A, Khan SR, Gilani AH. Studies on the in vitro and in vivo antiurolithic activity of Holarrhena antidysenterica. *Urol Res.* diciembre de 2012;40(6):671-81.
7. Ramírez D, Ramos C, Requena J, Pinto M, Romero N, Bastidas G. Asociaciones entre nefrolitiasis, citrato y otros metabolitos presentes en orina y suero de pacientes. *Gac Médica Boliv.* 2015;38:6-10.
8. Funes P, Echagüe G, Ruiz I, Rivas L, Zenteno J, Guillén R. Perfil de riesgo litogénico en pacientes con urolitiasis en Paraguay. *Rev Médica Chile.* junio de 2016;144(6):716-22.
9. Vaitheeswari S, Sriram R, Brindha P, Kurian GA. Studying inhibition of calcium oxalate stone formation: an in vitro approach for screening hydrogen sulfide and its metabolites. *Int Braz J Urol Off J Braz Soc Urol.* 2015;41(3):503-10.
10. Khan A, Bashir S, Khan SR, Gilani AH. Antiurolithic activity of Origanum vulgare is mediated through multiple pathways. *BMC Complement Altern Med.* 17 de octubre de 2011;11:96.
11. Aggarwal A, Tandon S, Singla SK, Tandon C. Diminution of oxalate induced renal tubular epithelial cell injury and inhibition of calcium oxalate crystallization in vitro by aqueous extract of Tribulus terrestris. *Int Braz J Urol Off J Braz Soc Urol.* agosto de 2010;36(4):480-488; discussion 488, 489.
12. Juan Carlos «Caio» Scavone. Remedios naturales del Paraguay [Internet]. Asunción - Paraguay: Editorial Servilibro; 2011. 103 p. Disponible en: http://www.portalguarani.com/841_caio_scavone/17235_remedios_naturales_del_paraguay_2012_por_caio_scavone.html
13. Bensatal A, Ouahrani MR. Inhibition of crystallization of calcium oxalate by the extraction of Tamarix gallica L. *Urol Res.* 1 de diciembre de 2008;36(6):283-7.
14. Wilcoxon F. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biom Bull.* 1945;1(6):80-3.
15. Ceolin T, Heck RM, Pereira DB, Martins AR, Coimbra VCC, Silveira DSS. Inserción de terapias complementarias en el sistema único de salud atendiendo al cuidado integral en la asistencia. *Enferm Glob.* 2009;0-0.
16. Kok DJ, Khan SR. Calcium oxalate nephrolithiasis, a free or fixed particle disease. *Kidney Int.* 1 de septiembre de 1994;46(3):847-54.
17. Wesson JA, Worcester EM, Wiessner JH, Mandel NS, Kleinman JG. Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. *Kidney Int.* 53(4):952-7.
18. Tsujihata M. Mechanism of calcium oxalate renal stone formation and renal tubular cell injury. *Int J Urol.* 1 de febrero de 2008;15(2):115-20.
19. Sujatha D, Singh K, Vohra M, Kumar KV, Sunitha S. Antilithiatic Activity of phlorotannin rich extract of Sarghassum Wightii on Calcium Oxalate Urolithiasis – In Vitro and In Vivo Evaluation. *Int Braz J Urol Off J Braz Soc Urol.* 2015;41(3):511-20.
20. Beghalia M, Ghalem S, Allali H, Belouatek A, Marouf A. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal growth using Algerian medicinal plants. *J Med Plants Res.* 31 de marzo de 2008;2(3):066-70.
21. Saha S, Verma RJ. Inhibition of calcium oxalate crystallisation in vitro by an extract of Bergenia ciliata. *Arab J Urol.* 1 de junio de 2013;11(2):187-92.
22. Boim MA, Heilberg IP, Schor N. Phyllanthus niruri as a promising alternative treatment for nephrolithiasis. *Int Braz J Urol Off J Braz Soc Urol.* diciembre de 2010;36(6):657-664; discussion 664.
23. Atmani F, Khan SR. Effects of an extract from Herniaria hirsuta on calcium oxalate crystallization in vitro. *BJU Int.* abril de 2000;85(6):621-5.
24. Robertson WG, Peacock M, Marshall RW, Marshall DH, Nordin BE. Saturation-inhibition index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. *N Engl J Med.* 29 de enero de 1976;294(5):249-52.
25. Werness PG, Bergert JH, Smith LH. Crystalluria. *J Cryst Growth.* 1 de mayo de 1981;53(1):166-81.
26. Barros ME, Schor N, Boim MA. Effects of an aqueous extract from Phyllanthus niruri on calcium oxalate crystallization in vitro. *Urol Res.* febrero de 2003;30(6):374-9.
27. Dyer R, Nordin BEC. Urinary Crystals and their Relation to Stone Formation. *Nature.* 12 de agosto de 1967;215(5102):751-2.
28. Wesson JA, Ward MD. Role of crystal surface adhesion in kidney stone disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* julio de 2006;15(4):386-93.
29. Sheng X, Ward MD, Wesson JA. Crystal Surface Adhesion Explains the Pathological Activity of Calcium Oxalate Hydrates in Kidney Stone Formation. *J Am Soc Nephrol.* 1 de julio de 2005;16(7):1904-8.
30. Bagalkotkar G, Sagineedu SR, Saad MS, Stanslas J. Phytochemicals from Phyllanthus niruri Linn. and their pharmacological properties: a review. *J Pharm Pharmacol.* 1 de diciembre de 2006;58(12):1559-70.