

## COMUNICACIONES

### ACTIVIDAD ANTIUROLITIASICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Mammillaria compacta* EN RATAS



Rosa Martha Pérez Gutiérrez y Rosario Vargas Solís\*

Laboratorio de Investigacion de Productos Naturales. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias extractivas IPN. (México, D.F.)

\*Laboratorio de Investigacion de Fitofarmacología. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (Mexico, D.F.).

E-mail: rmpg@prodigy.net.mx

#### ***Introducción***

La *Mammillaria compacta* o *Coryphanta compacta* (Engelmann) Britton & Rose comúnmente conocida como "Bisnaga", pertenece a las Cactácea. Planta subcilíndrica a cilíndrico - columnar con la edad, terrestre o sobre rocas, parte superior redondeada, hundida con abundante lana blanca, cubierto por espinas ligeramente encorvadas, de color castaño - amarillentas o rojizas, tubérculos muy cercanos entre sí, dispuestos en 13 y 21 series de espirales de 5 a 16 mm de largo y 6 a 10 mm de ancho en la base verde oscuros a verde - azulosos. Espinas radiales 16 a 25, las inferiores 9 a 10, más largas, de 4 a 10 mm de largo, las laterales entrelazadas las unas con las otras; las superiores alrededor de 6, siendo las más cortas blancas con la base blanca o amarillentas; flores laterales formando círculos purpúreos de [11] 15 a 20 mm de largo; fruto en forma de clavo, perfumado, de 1.7 a 2 cm de largo y de 4 a 6 mm de ancho blanco verdoso, rosado o purpúreo - escarlata – azuloso. El fruto, llamado comúnmente "chilito" es apreciado y se come; otro uso es el ornamental (1).

El género *Mammillaria* contiene sustancias enteógenas, tales como tetrahidroisoquinolinas (2). Este género agrupa a los falsos peyotes más importantes. A

la *M. compacta* se la considera como un tipo de peyote y es bebida por los chamanes como una potente medicina que es a la vez respetada y temida "Bakana," "Bakanawa," "Hikuli," "Wichuri" no se conoce a esta especie como haber sido usada como narcótica o alucinógena, pero sí muy conocida por sus usos medicinales (3). Uno muy extendido es para combatir el reumatismo. Los frutos sirven como comida y para hacer vino (4). Esta planta también es usada en la medicina popular como remedio para el tratamiento de la urolitiasis y una amplia variedad de enfermedades urinarias en algunas áreas de los estados de San Luis Potosí, Durango, Querétaro y Morelos (5). Para este propósito los nativos usan un te de las partes verdes de la planta. En la investigación exhaustiva en la literatura de la *M. compacta* no se encontró reportado ningún estudio químico y farmacológico. En este artículo evaluamos el efecto del tratamiento oral del extracto acuoso de *M. compacta* sobre el crecimiento de las piedras mediante implante de un cuerpo extraño en la vejiga urinaria de las ratas.

### ***Materiales y Métodos***

#### **Planta**

La planta se colectó en el Estado de Morelos en mayo de 2004, taxonómicamente se identificó en el Departamento de Botánica de la Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, un espécimen de la planta se encuentra depositado en el herbario para referencia.

#### **Animales**

Se emplearon ratas Wistar de ambos sexos con pesos de 180-250 g. Los animales se hospedaron en cajas bajo condiciones estándar de (luz a partir de las 7.0 a.m. a 7.0 p.m.), temperatura ( $22\pm1$  C) humedad del cuarto ( $60\pm10\%$ ). Las ratas se mantuvieron en estas condiciones una semana antes del experimento. Se mantuvieron *ad libitum* de comida y agua durante el estudio. En los experimentos que involucran animales su cuidado se llevó conforme a los principios internacionales del cuidado de los animales.

#### **Preparación del extracto**

1 kg de la planta fresca se cortó en piezas pequeñas, se extrajeron durante 6 h con 8 l de agua destilada, el extracto se evaporó a sequedad al vacío obteniendo un residuo café (8 g, 0.8%). Una suspensión fresca (0.5 g/ml) se preparó diariamente antes de su administración a los animales.

#### **Preparación de cistona**

El extracto acuoso de cistona se preparó pulverizando una tableta de 500 mg. El polvo (se mezcló con 5mL de agua destilada dejando reposar durante 2-3 h posteriormente se centrifugó a 1000 rpm. El supernadante se usó para el estudio. En las pruebas se utilizó 2mL del extracto acuoso (50 mg).

#### **Implantación por cirugía del cuerpo extraño**

La urolitiasis fue inducida en ratas adulto (Wistar, hembras 180-200 g; machos 200-250 g) sobre anestesia con pentobarbitona sódica (35 mg/kg, i.p.) de acuerdo a Vermeulen et

al. (6) La vejiga urinaria fue expuesta y haciendo una incisión suprapubica un disco de zinc con una textura y tamaño estandarizado ( $42.5 \pm 3$  mg) (7) fue insertado dentro del lumen, la incisión se cerro con una simple sutura usando tripa de gato absorbible 4-0 (Ethicon). Todos los animales se mantuvieron en un ciclo controlado de luz/oscuridad y temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) con libre acceso de comida y agua.

#### Grupos experimentales

Las ratas operadas se dividieron en 6 grupos de 10 animales cada uno y se les administraron los siguientes tratamientos:

1. Un grupo de animales se mantuvo como control al cual se le dio agua (4 ml/Kg/día), durante 60 días (3 animales muertos durante el experimento).
2. Un grupo de animales tratados con el extracto acuoso *M. compacta* (50 mg/Kg/día, oral), durante 60 días (2 animales muertos durante el experimento)
3. Un grupo de animales tratados con el extracto acuoso *M. compacta* (100 mg/Kg/día, oral), durante 60 días (1 animal muerto durante el experimento).
4. Un grupo de animales tratados con el extracto acuoso *M. compacta* (200 g/Kg/día, oral), durante 60 días (1 animales muertos durante el experimento)
5. Un grupo de animales tratados con el extracto acuoso *M. compacta* (300 g/Kg/día, oral), durante 60 días (0 animales muertos durante el experimento)
6. Un grupo de animales tratados con el extracto acuoso *M. compacta* (500 mg/Kg/día, oral), durante 60 días (0 animales muertos durante el experimento)

Los animales que murieron durante el periodo experimental se excluyeron de la evaluación y no fueron remplazados. Los animales se sacrificaron con éter, los discos de zinc de cada animal fueron extraídos y lavados con agua destilada y secados en la estufa. Los discos de zinc se pesaron anotando la cantidad de cálculo depositado. Las piedras se analizaron cualitativamente (8).

#### Actividad diurética

Para determinar la actividad diurética las ratas se mantuvieron en cajas individuales, se trataron con agua o con el extracto de la planta, la orina se colectó cada 12 h. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua durante el intervalo de colecta (9). A las muestras de orina se les determinó el pH, calcio (10) y el oxalato (11). El volumen urinario de las ratas se determinó cada 12 h y se comparó con el producido por el diurético furosemida (20 mg/kg.p.o.), usado como control positivo.

El examen radiográfico se realizó antes del sacrificio de los animales para confirmar la formación de la piedra. El animal se mantuvo con anestesia ligera en posición anteroposterior para exponer la región pélvica en un aparato Pleodor 3 X-ray machine (Siemens India Ltd).

#### Peso de la piedra

La diferencia entre el peso del disco de zinc implantado y el peso final del cálculo seco extraído al final de las 8 semanas del experimento indican la cantidad de piedra depositada.

### Estudio In vitro

Se uso para el estudio de la actividad antilitiasica el método de precipitación homogénea en tubos de vidrio (en ausencia de matrices externas) manteniendo constante el pH y la isotonicidad (12). Se empleo un sistema buffer 0.1 M TRIS con un pH 7.4. La solución A se preparo con 0.4 M TRIS [48.4 g de Tris (trihidroximetil)amino metano por 1000 mL]; En la preparación de la solución B se colocaron 0.4 M ácido clorhídrico [33.6 mL de ácido clorhídrico concentrado por 1000mL]; Se mezclaron 25 mL de la solución A, y 20.7 de la solución B aforando a 100 mL, el pH fue de 7.4. Posteriormente se añadió en ambos tubos (control y ensayo) 25 ml de 25 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, o 24mM Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. A cada tubo se le adicionó el extracto (200 mg/ml) o igual cantidad de agua. Despues se incubaron a 37 °C durante 4 h. El precipitado de fosfato de calcio y oxalato de calcio se generaron de la siguiente manera:

- 1) El precipitado de oxalato de calcio se generó mezclando 10 mL de solución del tubo que contiene 20 mL de cloruro de calcio dihidratado (25 mM) y fosfato de calcio monohidratado (20 mL de 25mM).
- 2) El precipitado de fosfato de calcio se generó mezclando 10 mL de solución del tubo conteniendo 20 mL de cloruro de calcio dihidratado (25 mM) y fosfato de calcio monohidratado (20 mL de 25mM).

El calcio se determinó por medio de titulación y para el fósforo se empleó un análisis calorimétrico. Se realizaron curvas estándar para cada serie de experimentos. La cantidad del precipitado de calcio y fosfato se determinaron en cada serie por el método de Varley (13). El porcentaje de inhibición de la serie se calculó en comparación con los tubos control. El efecto del extracto de la planta se comparó con la cistone (formula herbal usada para el tratamiento de la urolitiasis)

### Análisis estadístico

Los resultados se describen como error estándar y son expresados como promedio ± SEM. Los datos obtenidos fueron estadísticamente analizados usando la t- Student's usando el programa "Microcal Origen". Los valores de P de 0.05 o menos fueron tomados como significativos. También fueron sujetos a un análisis ANOVA (14,15).

### **Resultados**

En los estudios de toxicidad aguda, el extracto se encontró poco tóxico. A una dosis única oral de 7 g/Kg, no se registraron muertes en los animales de experimentación. Las ratas no mostraron ningún cambio en su comportamiento excepto en el incremento del volumen urinario.

La implantación de discos de zinc en la vejiga urinaria en las ratas del grupo control induce un crecimiento de las piedras urinarias e hipertrofia de la musculatura del músculo liso siendo mayor en machos que en hembras. A dosis de 500 mg de *M. compacta* después de 8 semanas de la cirugía el peso de los cálculos formados en ratas hembras se incrementa de  $40.23 \pm 1.4$  mg a  $43.66 \pm 1.57$  mg mientras que el peso del órgano se incrementa por 1.1 fold (intacto:  $63.71 \pm 1.98$  mg a  $70.08 \pm 1.21$  mg). En

machos, el peso de las piedras formadas incrementa de  $44.61 \pm 1.09$  a  $48.08 \pm 2.40$  mg) después de 8 semanas de cirugía. El peso de la vejiga urinaria en el último grupo incrementa por 1.1 fold (Intacto:  $74.21 \pm 2.18$  mg a  $81.63 \pm 2.11$  mg). La formación urolítica se confirmó mediante un examen por rayos-X. Todos los animales produjeron piedras con la inserción de discos de zinc. El análisis cualitativo de los cálculos formados en todos los grupos indica que son del tipo de fosfato de amonio magnesio con trazas de oxalato de calcio (16).

Se observó una reducción dosis-dependiente en el tamaño de las piedras a dosis de 50, 100, 200, 300 y 500 g/kg. El grupo tratado con 50 mg/kg mostró una pequeña deposición del cálculo en comparación con el grupo no tratado. El extracto acuoso de *M. compacta* (500 mg/kg p.o.) presentó 94.6% de reducción en la deposición de la piedra comparada con el grupo control. Con dosis de 200 y 300 mg/kg se obtuvo una reducción de 50.9 y 65.19% respectivamente (Ver Tabla 1). La Cistona (50 mg) muestra una inhibición de 55.9% en la formación del cálculo. La vejiga urinaria del grupo control mostró estar más delgada e inflamada, en cambio los animales tratados con el extracto de *M. compacta* indican una reducción dosis-dependiente de estos signos. A dosis de 300 y 500 g/Kg. de extracto los grupos tratados tienen una normalización casi completa.

**Tabla 1. Efecto del extracto acuoso de *M. compacta* (Mc) sobre el peso de las piedras renales**

<b>Tratamiento mg/kg</b>	<b>Incremento del peso del cálculo (mg)</b>	<b>% Reducción</b>
Control	$21.03 \pm 4.62$	-
Mc 50	$19.8 \pm 3.27^{**}$	5.8
Mc 100	$14.25 \pm 2.99^{**}$	32.2
Mc 200	$10.31 \pm 1.87^*$	50.9
Mc 300	$7.32 \pm 1.16^*$	65.19
Mc 500	$3.43 \pm 0.99^{**}$	83.68
Cistona 100	$9.27 \pm 2.65^*$	55.9

**n = 10, Los valores son promedio  $\pm$  ES. \*p<0.05, \*\*p<0.001 vs el grupo control. (ANOVA), Nivel de confidencia: 0.989, valores de p 0.0001**

Los resultados de la actividad diurética se presentan en la Tabla 2. Las mismas dosis se usaron para el estudio antiurolítico y diurético. La dosis de 500 mg/kg del extracto acuoso produce el máximo volumen de orina (12.23 ml). El pH inicial de la orina fue de 7-8 y de 7.9 después del estudio. El tratamiento con el extracto acuoso de *M. compacta* no produce ningún cambio significativo en el pH urinario. Algunas muestras de orina examinadas durante el estudio contienen microorganismos G+ y G- estos resultados fueron descartados. En la orina del grupo control se encontraron altos niveles de calcio y oxalato. La concentración de calcio y el oxalato en la orina a dosis de 1000 mg/kg fue de 8.1 mg/dl y 7.69 mg/dl respectivamente estos valores son semejantes a los obtenidos en las ratas normales. En el grupo tratado con furosemida usado como control positivo el volumen fue incrementado a  $4.3 \pm 0.5$  mL después de 12 h. En los grupos tratados con el extracto acuoso a dosis de 50, 200, 300 y 500 mg/kg los niveles muestran una reducción dosis-dependiente hacia la normalización (Ver Tabla 2).

**Tabla 2. Actividad diurética del extracto acuoso de *M. compacta* (Mc). Excreción urinaria de calcio y oxalato**

<b>Tratamiento (mg/kg)</b>	<b>Volumen de orina ml/24 h</b>	<b>Excreción urinaria (mg/dl)</b>	
		<b>Calcio</b>	<b>Oxalato</b>
Normal	5.1 ± 3.1	8.64 ± 0.48	7.77 ± 0.21
Control	4.76 ± 2.93	11.01 ± 0.82	9.32 ± 0.14*
Mc 50	4.1 ± 2.52**	10.25 ± 0.24*	9.21 ± 0.35**
Mc 200	6.0 ± 3.41**	9.43 ± 0.76**	8.40 ± 0.17*
Mc 300	8.47 ± 0.82*	8.75 ± 0.99*	8.12 ± 1.4*
Mc 500	10.12 ± 0.98*	8.63 ± 1.2*	7.81 ± 0.86**
Mc 1000	12.23 ± 1.64*	8.1 ± 1.9**	7.69 ± 1.1*
Furosemida 20	4.3 ± 2.61**	—	—

n= 10, Cada valor es el promedio ± ES. \*p<0.05, \*\*p< 0.01 vs el grupo control. (ANOVA), nivel de confidencia: 0.996, valores de p 0.0001

El extracto acuoso de *M. compacta* (0.1 g/mL) muestra un buen efecto inhibitorio en la formación de precipitado de oxalato de calcio y fosfato de calcio presentando una inhibición de 27.28% y 71.57 % respectivamente (Ver Tabla 3). También reduce significativamente la formación del precipitado de fosfato de calcio y oxalato de calcio en 46.86 y 25.35% respectivamente (Ver Tabla 4).

**Tabla 3. Porcentaje de inhibición producido por el extracto acuoso de las tabletas de cistona (2 mL de extracto acuoso)**

	<b>Cantidad de precipitado (μmol)</b>		<b>Inhibición (%)</b>	
	Fosfato	Oxalato	Fosfato	Oxalato
Cistone				
Control	6.05 ± 0.53	6.45 ± 0.82	-----	-----
Prueba	1.72 ± 0.47	4.69 ± 0.48	71.57 ± 1.03	27.28 ± 0.96

**Tabla 4. Porcentaje de inhibición producido por el extracto acuoso de *Mammillaria compacta* (cantidad : 2mL of 0.1 g/mL solución)**

	<b>Cantidad de precipitado (μmol)</b>		<b>Inhibición (%)</b>	
	Fosfato	Oxalato	Fosfato	Oxalato
Extracto				
Control	6.85 ± 0.79	6.98 ± 0.39	-----	-----
Prueba	3.64 ± 0.84	5.21 ± 1.01	46.86 ± 1.46	25.35± 0.43

### **Discusion y Conclusiones**

Los ensayos *in vitro* y *in vivo* confirman la eficacia del extracto acuoso de *M. compacta* como antiurolítico al comparar los resultados obtenidos en los grupos control con los lotes tratados con el extracto acuoso de *M. compacta*. También se compararon con los producidos por la cistona el cual es un antiurolítico usado como control positivo, este es prescripto en el tratamiento de cálculos renales.

Es conocido que los cuerpos extraños actúan como nidos en los cuales los cristales tienden a precipitar conduciendo a la formación de un cálculo en la vejiga urinaria. El crecimiento del cristal *in vivo* consiste en la deposición a partir de una solución saturada

o supersaturada o por precipitación mediante una reacción química, seguida por la deposición sobre el núcleo (17).

El extracto acuoso de *M. compacta* significativamente inhibe la formación de la urolitiasis en una forma dosis-dependiente así como también cambia varios parámetros hacia los niveles normales. No es posible postular el mecanismo de acción preciso en base a los datos disponibles. Este puede inhibir la formación de la fase mineral y su subsecuente crecimiento. El otro posible mecanismo puede ser por estimulación de la desmineralización o disolución de la fase mineral (18,19).

El extracto mostró un incremento en el volumen de orina colectado en 24 h comparado con el control, la ingestión de agua fue normal, no hay incremento significativo en el peso durante el tratamiento. La administración del extracto acuoso de *M. compacta* reduce la deposición de oxalato de calcio en el riñón y su excreción urinaria. Esto indica una acción selectiva del *M. compacta* en prevenir el depósito de calcio. Esta investigación muestra que el extracto de la planta previene la formación de urolitiasis lo cual confirma la información folklórica de la planta. Los resultados muestran que la administración crónica del extracto acuoso de *M. compacta* reduce el crecimiento de las piedras urinarias en ratas con urolitiasis inducida experimentalmente. Este fue efectivo en la prevención de la formación y en la disolución de las piedras del tipo de fosfato de amonio magnesio.

*M. compacta* presentó una actividad antiurolitiasica similar a otras plantas usadas en la medicina Ayurvedica en la India tales como : *Crateva nurvala*, *Zingiber officinale*, *Alpinia galanga*, *Desmodium gangeticum*, *Dendrophthoe falcata*, *Homonia riparia*, semillas de *Dolichos biflorus* y rizomas de *Bergenia ligulata* (20,21,22,23,24). *Alpinia galanga*, también es utilizada ampliamente en Arabia Saudita al igual que *Petroselinum sativum* y *Trichyspermum ammi* por inhibir la concentración de oxalatos en la urolitiasis experimental en ratas (25). En Nepal y Pakistán se utiliza la legumbre *Vigna unguiculata* (Gahat) en el tratamiento de cálculos urinarios (26). En la medicina folklórica Brasileña se emplea la planta *Costus spiralis* para expeler las piedras renales (27). En México algunas de plantas más usadas en el tratamiento de la urolitiasis son *Eysenhardtia polystachya* comúnmente conocido como palo azul (28), *Raphanus sativus* (29) (rabano negro) y *Randia echinocarpa* (30) .

## **Resumen**

Se probó la actividad diurética y antiurolitiasica del extracto acuoso de *Mammillaria compacta*. En el experimento *In vivo* la urolitiasis fue inducida mediante la implantación de un disco de zinc en la vejiga urinaria de ratas albinas, la actividad antiurolitiasica del extracto se probó sobre cálculos de fosfato de amonio y magnesio. Para determinar la actividad diurética las ratas se mantuvieron en cajas individuales y se trataron con el extracto acuoso de la planta y la orina se colectó cada 12 h. El volumen urinario se comparó con el obtenido con la furosemida usada como control positivo. *In vitro* se uso el método de precipitación homogénea para estudiar la actividad antilitiasica manteniendo el pH y la isotonicidad del medio constante. El estudio se realizó en tubos de vidrio colectando el precipitado sobre papel filtro. Se observó una significante reducción dosis-respuesta en el tamaño y peso de las piedras en los animales después de recibir el tratamiento con el extracto acuoso. También el extracto presenta un incremento en el volumen de orina a las 24 h comparado con el

control. En el método de precipitación homogénea el extracto de *Mammillaria compacta* significativamente reduce la precipitación de fosfato de calcio y oxalato de calcio. El extracto de *M. compacta* es efectivo en reducir la formación de las piedras de fosfato de amonio magnesio así como también disuelve las piedras pre-formadas. La actividad antiurolitiasica del extracto acuoso se comparó con la producida por la cistona (preparación comercial) siendo menos efectiva que esta.

*Palabras clave:* *Mammillaria compacta, actividad antilitiasica, actividad diurética*

### **Abstract**

The aqueous extract of the *Mammillaria compacta* was tested for diuretic and antiurolithiatic activity. In vivo the urolithiasis was experimentally induced by implementation of zinc disc in the urinary bladder of rats and the extract was tested for its antiurolithiatic activity against magnesium ammonium phosphate stones in albino rats. To determine the diuretic activity fasting rats were kept in individual cages, treated with either tap water or the plant extract, and the urine collected every 12 hours. Urinary volume of rats were compared with the obtained with diuretic furosemide used for positive control. In vitro homogenous precipitation method was used to study the antilithiatic activity by keeping the pH and isotonicity of medium constant. The study was carried out in glass tubes instead of collecting the precipitate over filter papers. Significant dose dependent reduction in the size and weight of the stones was observed after treatment in animals which received aqueous extract. This extract showed an increase in the 24 hours urine urine volume as compared to the control. In homogenous precipitation method the aqueous extract of *Mammillaria compacta* significantly reduced the formation of calcium phosphate type stones. All the test were compared with an aqueous extract of cystone (a marketed preparation) for their activity. The aqueous extract was found to be less active than cystone.

*Key words:* *Mammillaria compacta, antilithiatic activity, diuretic activity*

### **Referencias**

1. Bravo-Hollis, H. y M.H: Sánchez 1991: Las Cactáceas de México, Vol.3. - Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
2. Bravo-Hollis, H. 1978. *Las cactáceas de México*. Tomo I. México, UNAM
3. Bravo-Hollis, H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. *Las cactáceas de México*. Vols. II y III. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
4. Hernández, H y H. Godínez 1994. Contribución al conocimiento de la cactáceas mexicanas . Acta Botánica Mexicana. 26:33-52.
5. Villamar, A.A. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. 1ed Instituto Nacional Indigenista: México D.F. 1994. p.1206-1207.
6. Vermeulen, C.W., W.J. Crove, R.Goetz, H.D. Ragins and N.O.Correl 1950. Experimental urolithiasis I. Development of calculi upon foreign bodies surgically introduced into bladders of rats. J. of Urology ; 64 : 541-548.

7. Meyer J.L. and L.H. Smith 1975. Growth of calcium oxalate crystals I. A modelk for urinary stone growth. *Investigative Urology*.13 : 31-35.
8. Singla, S.K. and R.K. Jethi 1981. A simple metho for the study of *in vitro* calculogenesis *Indian.J. Exp. Biol.* 19 : 283-285.
9. Davidsohn, I.and J.B. Henry 1969. Todd–Sanford clinical diagnosis by laboratory methods, W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 368.
10. Lorentz K. 1982.Improved determination of serum calcium with orthocresolphthalein complexone. *Clin. Chim. Acta*. 126 : 265-273.
11. Hodgkinson, A. and A. Williams A 1972 An improved colorimetric. procedure for urine oxalate. *Clin Chim Acta* 36:127-132.
12. Anand, R., G.H. Patnaik, D.K. Kulshreshtha, B.N. Mehrotra, R.C. Srimal and B.N. Dhawan 1993. Antiurolithiatic activity of *Crateva nurvala* ethanolic extract on rats. *Fitoterapia*. 1993; LXIV: 345-350.
13. Varley H. 1996.Practical Clinical Biochemistry, 4<sup>th</sup> edn. CBS Publishers and Distributors; Delhi, p. 431.
14. Wayne W. D. 1992. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3a Ed. Limusa, Grupo Noriega Editores, 1992. p.48-56.
15. Bolton S. 1990. Statistics, in Remington´s Pharmaceutical Sciences. Edit by Gennaro A.R. 18th ed. Mack Publishing Company, Easton. PA, p. 104-110.
16. Chow, F.H.C., D.W. Harper and R.H. Udall 1974. Prevention of oxalate and phosphate lithiasis by alanine. *Invest. Urol.* 12: 50-53.
17. Tsujihata, M., O. Miyake, K. Yoshimura, K. Kakimoto, S. Takahara and A. Okuyama 2001. Fibronecetin as a potent inhibitor of calcium oxalate urolithiasis. *Journal urology*. 165: 1718-1723.
18. Aleykutty N.A., K.K. Srinivasan and P.G. Rao 1993. Diuretic and antilithiatic activity of *Dendrophthoe falcate*. *Fitoterapia*. 64: 325-331.
19. Susuki, K. and R.L. Ryall 2001 The effect of heparin sulphate on the crystallization of calcium oxalate in undiluted ultrafiltered human orine. *British Journal of Urology*. 78: 15-21.
20. Anand, R., G.K. Patnaik, D.K. Kulshreshtha, B.N. Mehrotra, R.C. Srimal and B.N. Dhawan 1993 Antiurolithiatic activity of *Crateva nurvala* ethanolic extract on rats, *Fitoterapia* 64, 4, 345-350.
21. Prabhakar Y.S. and R.D.S. Kumar 1990. The varuna tree, *Crataeva nurvala*, a promising plant in the treatment of urinary stones. A review. *Fitoterapia*. 61, 99-111.

22. Aleykutty N.A., K.K. Srinivasan and P.G. Rao 1993. Diuretic and antilithiatic activity of *Dendrophthoe falcate*. *Fitoterapia* 64, 325- 331.
23. Garimella T.S., C.I.Jolly and S. Narayanan 2001. In vitro studies on antiurolithiatic activity of seeds of *Dolichos biflorus* Linn. And Rhizomes of *Bergenia ligulata* Wall.. *Phytother. Res.* 15: 351-355.
24. Prasad K.V.R.G., R. Abraham, K. Bharathi and Srinivasan 1997. Evaluation of *Homonia riparia* Lour, for antiurolithiatic activity in albino rats. *Int. J. of Pharmacognosy*. 35: 278-283.
25. Ahsan S.K., A.H. Shah, M.O.M. Tanira, M.S. Ahmad, M. Tariq and A.M. Ageel 1990. Studies of some herbal drugs used against kidney stones in Saudi folk medicine. *Fitoterapia*. 61: 435-438.
26. Schawartz B. F., N. Schenkman, R. Nguyen, M.L. Stoller and A. Gahat 2000. Napalese cure for urolithiasis. *Urology*. 912-914.
27. Viel T. A., C.D. Domingos, A.P.S. Monteiro, M.T.R. Lima-Landman, A.J. Lapa and C. Souccar 1999. Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* Roscoe in rats. *J. Ethnopharmacol.* 66. 193-198.
28. Perez G., R.M., R. Vargas S., S. Perez G. and M. Zavala S. 1998. Antiurolithiatic activity of *Eysenhardtia polystachya* aqueous extract on rats *Phytotherapy Research Volume 12, Issue 2 , 144 - 145*
29. Vargas S., R., R.M. Perez G., S. Perez G., M.A. Zavala S. and C. Perez G. 1999. Antiurolithiatic activity of *Raphanus sativus* aqueous extract on rats, *Journal of Ethnopharmacology* 68, 335-338.
30. Vargas Solís, R.and R.M. Perez-Gutierrez. 2002. Diuretic and urolithiatic activities of *Randia echinocarpa* fruit aqueous extract on rats. *J. Ethnophar.* 83 145-147.