

# Establecimiento del protocolo de micropropagación para la planta medicinal *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae)

Marcela Jiménez<sup>1</sup>

Silvana Alvarenga<sup>2</sup>

Elizabeth Alan<sup>3</sup>

Fecha de aceptación: 20/11/06

*Phyllanthus niruri* es una planta medicinal nativa de América, bastante común en terrenos húmedos y sombreados. Esta planta es usada popularmente para la expulsión de cálculos renales y biliares, como antiespasmódico, diurético, y auxiliar en la eliminación del ácido úrico.

## Palabras claves

*Phyllanthus niruri*, cultivo de tejidos, micropropagación, ácido naftalenacético (ANA), Bencil Adenina (BA) Ácido Giberélico (AG<sub>3</sub>).

## Key Words

*Phyllanthus niruri*, tissue culture, micropropagation, Naphthalene acetic acid (NAA), 6-Benzyladenine (6-BA), Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>).

## Resumen

*Phyllanthus niruri* es una planta medicinal nativa de América, bastante común en terrenos húmedos y sombreados. Esta planta es usada popularmente para la expulsión de cálculos renales y biliares,

como antiespasmódico, diurético, y auxiliar en la eliminación del ácido úrico. La presente investigación permitió analizar el efecto de diferentes tratamientos en la inducción de germinación de la semilla (inmersión en AG<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, agua destilada y escarificación con agua caliente) de esta planta medicinal. Se estudió la respuesta morfológica in vitro con dos reguladores de crecimiento BA y ANA, en concentraciones de 1, 3 y 5 mg/L, respectivamente. Se determinó el porcentaje de germinación y el desarrollo de las vitroplantas. El porcentaje más alto de germinación en el cultivo in vitro (60%) se obtuvo con el tratamiento de inmersión en AG<sub>3</sub> durante 4h. El tratamiento con 3mg/L de BA fue el que generó los mejores resultados en cuanto al número de yemas y brotes producidos. Este fue significativamente diferente a los demás tratamientos, con

1. Lab. Biología Molecular. Servicio Fitosanitario del Estado. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: [majimenez@proteconet.go.cr](mailto:majimenez@proteconet.go.cr)
2. Profesora de la Escuela de Biología, ITCR. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: [salvarenga@itcr.ac.cr](mailto:salvarenga@itcr.ac.cr)
3. Pensionada. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: [elizabeth.alan@gmail.com](mailto:elizabeth.alan@gmail.com)

una exactitud del 0.05 y una precisión del 95% empleando la prueba de Tukey.

## Abstract

*Phyllanthus niruri* is a medicinal plant native of America and common in moist and shaded soils. This plant is used commonly to bring up stones of the kidneys and bilious, antiespasmotic, diuretic and auxiliary in the elimination of uric acid. This research was aimed to analyze the effect of different treatments in the induction of seed germination (immersion in GA<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, distilled water and scarification with hot water) of this medicinal plant. The in vitro morphogenetic response to two growth regulating 6-BA and NAA in concentrations of 1, 3, and 5 mg/L respectively was studied. The percentage of germination and vitroplants growth were determined.

The higher percentage of in vitro germination (60%) was obtained in the GA<sub>3</sub> immersion treatment during 4 hours. The treatment with 3 mg/L of 6-BA brought out the best results in number of buds and shoots produced, which was significantly different of other treatments, with an exactitude of 0.05 and a precision of 95% with Tukey proof.

## Introducción

Existe mucho interés en conservar y promover la correcta utilización de plantas silvestres que están presentes en nuestros ecosistemas en forma natural. En los casos donde hay gran demanda y un valor agregado, pueden existir un peligro real de extinción para determinadas especies (González *et al.*, 1999).

En Costa Rica la gran biodiversidad de especies animales y vegetales, aunado a la gran riqueza de hábitats, ha favorecido el conocimiento y la aplicación de nuevas medicinas caseras. El incremento en la demanda de productos naturales en los

países industrializados ha incidido en la explotación del recurso por herbalistas indiscriminados que extraen el material de los bosques. Como resultado, muchas de estas especies de plantas se han extinguido y otras están en peligro (Monge, 2002). Por esto se hace necesario que se introduzca un sistema de cultivo con el fin de aprovechar estos recursos sin causar daño a la biodiversidad. Una de estas técnicas es el cultivo de tejidos. Consiste en el cultivo aséptico de segmentos de tejidos, células u órganos aislados de la planta bajo condiciones controladas. Comprende la micropropagación, el aislamiento y cultivo de embriones, la regeneración a partir del callo y de suspensiones celulares y el cultivo de protoplastos, anteras y microsporas. La micropropagación es la reproducción vegetativa de plantas *in vitro* (Rivas 2001).

*Phyllanthus niruri* pertenece a la familia Euphorbiaceae y es ampliamente usada en la medicina tradicional para favorecer la expulsión de cálculos renales o biliares, molestias de la vejiga, retención urinaria, diabetes, afecciones del hígado, como diurético, entre otras. Es conocida comúnmente como: *riñoncillo*, *quebrapiedra*, *erva-pombinha*, *bahupatra*, *bhuiamla*, *bhuy amalaki*, *niruri* y *stone breaker* (Melillo 1999).

Esta especie ha sido objeto de muchos estudios desde mediados de los años sesenta con el fin de determinar los componentes activos y su actividad farmacológica (Lancet 1988). Los grupos indígenas y los investigadores brasileños fueron los primeros en realizar estos estudios. El empleo tradicional de esta planta en la eliminación de piedras en el riñón y cálculos biliares han sido validados por investigaciones clínicas. En 1999, un estudio clínico realizado con extractos de *P. niruri* exhibió un efecto poderoso y efectivo en la inhibición de la formación de cristales de oxalato de calcio (compuesto de la mayoría de las piedras en

*Existe mucho interés en conservar y promover la correcta utilización de plantas silvestres que están presentes en nuestros ecosistemas en forma natural. En los casos donde hay gran demanda y un valor agregado, pueden existir un peligro real de extinción para determinadas especies (González et ál., 1999).*

*El objetivo principal de la investigación fue el estudio y establecimiento de un protocolo que permitiera la regeneración y multiplicación de la planta medicinal Phyllanthus niruri, con estudios de germinación in vitro y el análisis de la respuesta morfogénica a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (ANA, BA) en el medio de cultivo.*

los riñones). La actividad antiespasmódica de los alcaloides presentes en la Chanca Piedra fue documentada por investigadores brasileños a mediados de los años ochenta (Raintree Nutricion 2000).

Un estudio realizado en 1985 por investigadores indígenas demostró que la protección del hígado es mediada por la *phyllantina* y la *hipophyllantina* presentes en esta planta. La actividad analgésica se demostró en 1994 y 1995 por otro grupo de investigadores brasileños. El efecto como diurético e hipoglicémico se documentó en 1995, en un estudio realizado en humanos que demostró un efecto diurético significativo (Melillo 1999).

Estudios farmacológicos llevados a cabo con extractos de callo de *P. niruri*, *P. tenellus* y *P. urinaria* mostraron que los principales compuestos identificados en estos son flavonoides, taninos y fenoles (Santos *et ál.*; 1994).

La investigación más reciente en *chanca piedra* revela que posee actividad contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Raintree Nutricion 2000). Un equipo de investigación, en 1992, descubrió que el extracto *P. niruri* inhibe la transcriptasa HIV-1. En 1996, el trabajo realizado por Myers de Bristol Squibb aisló un componente responsable de esta actividad al que denominaron “*niruriside*”.

*P. niruri* es reportado por sus múltiples aplicaciones efectivas para una gran cantidad de enfermedades, siendo un producto de la biodiversidad del bosque lluvioso. En los últimos años, ha obtenido mucha popularidad a nivel mundial. Lo más importante es que no se ha informado sobre efectos tóxicos en ninguno de las investigaciones clínicas realizadas, ni en los muchos años de uso en la medicina herbolaria (Raintree Nutricion 2000).

Los pocos estudios disponibles del cultivo de tejidos de *Phyllanthus spp.* se cita el cultivo de callos de *P. emblica*, *P. urinaria*, *P. amarus*, *P. abnormis*, *P. caroliniensis*,

*P. tenellus*, y *P. Niruri*, el cultivo de raíz de *P. niruri* (Khanna & Nag 1973) (Unander 1991, Ishimaru *et ál.*; 1992, Santos *et ál.*; 1994).

Es de suma importancia la implementación del cultivo *in vitro* de *P. niruri* debido a sus múltiples usos medicinales y a la necesidad de propagación masiva para la comercialización. Por medio de la técnica de cultivo de tejidos se pueden seleccionar grupos de individuos que produzcan mayor cantidad de metabolitos secundarios y posteriormente obtener plantas en grandes cantidades, en un espacio reducido y con condiciones controladas.

El objetivo principal de la investigación fue el estudio y establecimiento de un protocolo que permitiera la regeneración y multiplicación de la planta medicinal *Phyllanthus niruri*, con estudios de germinación *in vitro* y el análisis de la respuesta morfogénica a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (ANA, BA) en el medio de cultivo.

## Materiales y métodos

### Recolección del material

La recolección del material vegetal fue realizada en los alrededores del río Macho, ubicado en Orosí (1480 msnm), en la ciudad de Cartago, Costa Rica. Se extrajeron plantas completas, las cuales se transportaron hacia el invernadero ubicado en el ITCR envueltas en papel absorbente humedecido y en bolsas plásticas hasta que fueron utilizadas. También, se tomaron muestras de esta planta de los alrededores del ITCR. Con cuidado se escindieron los frutos más grandes y se mantuvieron al sol durante tres días, cubiertos con papel toalla para evitar la pérdida de las semillas al momento de la expulsión. Se tomó como criterio los frutos de mayor tamaño y las semillas de coloración café (Oliveira y Randy, 1996).

## Obtención y desarrollo de vitroplantas

Para la obtención y desarrollo de las vitroplantas, se tomaron las semillas como explantes iniciales, fueron esterilizadas superficialmente con una solución comercial de hipoclorito de sodio (2,5% de cloro activo). Para romper la dormancia de las semillas se utilizaron diferentes tratamientos (cuadro 1). Posteriormente, las semillas se cultivaron en un medio que contenía las sales y vitaminas de Murashige

& Skoog (1962) (M&S) y se sometieron a diferentes tratamientos: complementamos el medio de cultivo con 2mg/L de ácido giberélico, escarificando las semillas con el empleo de inmersión con ácido giberélico, y de inmersión en agua caliente, o con inmersión en agua destilada o con nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) al 2% (cuadro 1). Las condiciones de crecimiento fueron  $25 \pm 2^\circ C$  y 16 horas luz. Se determinó el porcentaje de germinación.

Cuadro 1. Tratamientos empleados en las semillas para inducir la germinación.

ID	Tratamiento	Descripción	Procedimiento	Tiempo	Medio de cultivo
A	---	Control	---	---	M&S(1962) *
B	Medio con $AG_3$ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Adición al medio	---	M&S(1962) * + 2mg/L $AG_3$
C	$AG_3$ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Inmersión	4h	M&S (1962) *
D	$AG_3$ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Inmersión	6h	M&S(1962) *
E	$AG_3$ (2mg/L), previo a la inoculación se colocaron en agua caliente	Regulador de crecimiento y escarificación con agua caliente	Inmersión	4h en $AG_3$ 10 min Agua Hirviendo	M&S(1962) *
F	$AG_3$ (2mg/L), previo a la inoculación se colocaron en agua caliente	Regulador de crecimiento y escarificación con agua caliente	Inmersión	4h en $AG_3$ 10 min Agua Hirviendo	M&S(1962) * + $AG_3$ (2mg/L)
G	$AG_3$ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Inmersión	24 h	M&S(1962) *
H	Nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) al 2%	Agente químico	Inmersión	24 h	M&S(1962) *
I	Semillas mantenidas durante 24 h en agua destilada	---	Inmersión	24 h	M&S(1962) *

\* M&S: Sales orgánicas y vitaminas del medio MS (1962) suplementado con 3% de sacarosa y 0,2% de Phytigel

## Respuestas morfogénicas del cultivo *in vitro*

Se siguió la metodología propuesta por Catapan *et ál.* (2001). Una vez que las plántulas alcanzaron una altura de 10 cm, se cortaron, se inocularon microestacas con nudos individuales. En un medio de cultivo complementado con las sales y vitaminas del medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con 3% de sacarosa. Se probó el efecto de los siguientes reguladores de crecimiento: 6-bencil adenina (BA) y ácido naftalen acético (ANA), con concentraciones de 1, 3 y 5 mg/L para ambos reguladores. En todos los medios de cultivo, los valores de pH fueron ajustados a 5,8 antes de autoclavar a 121°C y 15lb de presión, por 20 minutos. Los frascos de cultivo fueron incubados a 25°C y 16 horas de fotoperíodo. Se compararon los diferentes tratamientos en cuanto a número de brotes y yemas producidas (entendiendo como brote el renuevo en un estado desarrollado que a su vez contiene yemas axilares). Se realizó la prueba Tukey de comparación múltiple para el análisis de los datos obtenidos. Los datos fueron analizados estadísticamente por medio del programa Statistic, con el Modelo Lineal Categórico.

*Se realizó la prueba Tukey de comparación múltiple para el análisis de los datos obtenidos. Los datos fueron analizados estadísticamente por medio del programa Statistic, con el Modelo Lineal Categórico.*

## Resultados y discusión

### Obtención y desarrollo de vitroplantas

La desinfección de las semillas, se realizó según la metodología propuesta por Catapan *et ál.* (2001) para el establecimiento del protocolo de micropropagación de *Phyllanthus stipulatus*. La desinfección que se realizó (hipoclorito de sodio, 3 gotas de champú Mennen por 30 minutos, y agua destilada estéril por diez minutos) mostró ser muy efectiva, se obtuvo un porcentaje de contaminación entre el 30 y 34%. Por tratarse de explantes provenientes de campo se considera un porcentaje aceptable.

Se realizaron pruebas de germinación de la semilla, ya que estudios conducidos por Figueira y Pereira (1998), con seis especies de *Phyllanthus* (*P. niruri*, *P. tenellus*, *P. amarus*, *P. urinaria*, *P. carolinensis* y *P. sp*) demostraron que las semillas presentan latencia, principalmente en los primeros cuatro meses después de la cosecha. Unader y Bryan (1995) también citan la latencia de las semillas recién cosechadas de *P. amarus*.

El porcentaje más alto en la inducción de la germinación se alcanzó mediante la aplicación del tratamiento C: inmersión en AG<sub>3</sub> (2mg/L) durante 4 horas, se observó un 60% de semillas germinadas (cuadro 2). Con el tratamiento B que consistió en la adición de 2mg/L de AG<sub>3</sub> al medio de cultivo, se obtuvo un porcentaje de germinación muy similar al testigo (A). Cabe mencionar que los tratamientos: inmersión en AG<sub>3</sub> (24h); KNO<sub>3</sub> y agua (tratamientos G, H e I respectivamente) no lograron superar al testigo (35% de germinación). De los tratamientos físicos (E y F), la escarificación con agua caliente inhibió totalmente la germinación, probablemente porque el embrión no logró sobrevivir.

A pesar de los diferentes tratamientos realizados el porcentaje de germinación obtenido en la mayoría de los casos fue bastante bajo (cuadro 2). Los mejores resultados se obtuvieron con la utilización del ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) que se reporta como agente promotor de la ruptura de la dormancia de gran número de semillas y brotes.

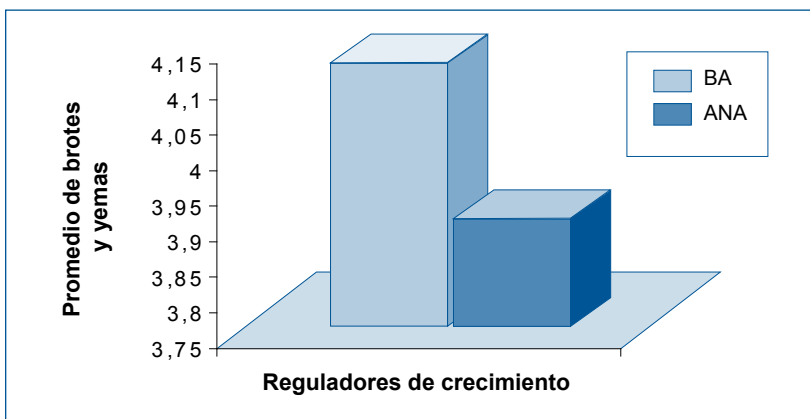
Se ha determinado que, una vez que se produce la germinación, comienzan a actuar las giberelinas que regulan el crecimiento desde esa temprana fase (Raintree Nutricion 2000). Sin embargo, se requiere más investigación para incrementar el porcentaje de germinación de *P. niruri*.

**Cuadro 2.** Porcentajes de germinación obtenidos en los diferentes tratamientos de inducción de la germinación

ID**	Tratamiento	% Germinación
A	Sin tratamiento	35
B	Medio con AG <sub>3</sub> (2mg/L)	34
C	AG <sub>3</sub> (2mg/L)	60
D	AG <sub>3</sub> (2mg/L)	18
E	AG <sub>3</sub> (2mg/L), previo a la inoculación se colocaron en agua caliente	0
F	AG <sub>3</sub> (2mg/L), previo a la inoculación se colocaron en agua caliente	0
G	AG <sub>3</sub> (2mg/L)	13
H	Nitrato de potasio (KNO <sub>3</sub> ) al 2%	11
I	Semillas mantenidas durante 24 h en agua destilada	14

### Respuestas morfológicas del cultivo *in vitro*

El número de brotes y yemas promedio producidas en los dos medios de cultivo estudiados fueron 4,15 con el empleo del BA y 3,9 cuando se cultivaron en un medio suplementado con ANA (fig.1).



**Figura 1.** Promedios de la producción de yemas y brotes comparando los diferentes reguladores de crecimiento (ANA, BA) presentes en los medios de cultivo

Se determinó que el medio de cultivo enriquecido con el regulador de crecimiento BA (tomando en cuenta todas las concentraciones probadas de dicho regulador fue más efectivo para promover el desarrollo y la regeneración de las microestacas inoculadas, que presentaron un mayor número de brotes y yemas producidas. (fig. 1; cuadro 3).

**Cuadro 3.** Prueba de Tukey (HSD) para la comparación de la producción de YEMAS por tratamiento (BA, ANA).

Tratamiento	Media	Grupos homogéneos
M&S (1962) con BA	4,9615	I**
M&S (1962) ANA	0,5769	..I

\* Las medias de los tratamientos son significativamente diferentes entre sí. \*\*Su alineación indica si los tratamientos son significativamente diferentes o no.

Los tratamientos en los que se empleó BA mostraron una diferencia significativa en la respuesta de producción de yemas, entre las concentraciones analizadas (1, 3 y 5 mg/L). La concentración de 5 mg/L inhibió el desarrollo de los explantes (cuadro 4).

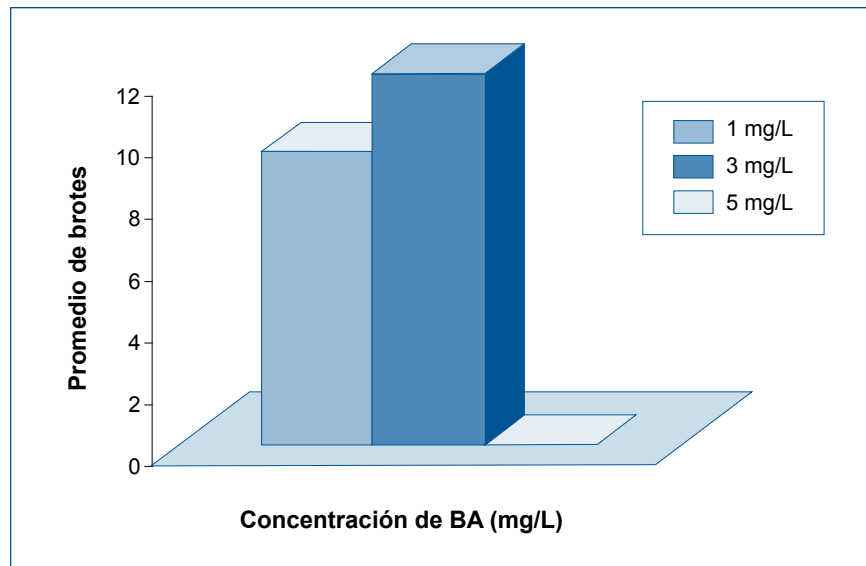
Estos datos demuestran que la especie produjo mayor número de brotes a una concentración media de esta citocinina. (fig. 2) y una mayor cantidad de yemas a una concentración mínima de BA.

La respuesta morfológica favorable de los explantes cultivados es probablemente ocasionada por la acción de la BA, este regulador de crecimiento promueve la división celular y la elongación de yemas (Salisbury y Ross, 1994).

**Cuadro 4.** Prueba de Tukey (HSD) para la comparación de medias entre la producción de **BROTOS** y **YEMAS** para los dos tratamientos en sus diferentes concentraciones

Tratam.	(mg/L)	Media*	Grupos homogéneos
BA Brotos	1	8.5962	I**
	2	6.2885	..I
	3	00000	....I
ANA Brotos	4	0.9400	....I
	5	0.7308	....I
	6	0.0926	....I
BA Yemas	1	42.058	I
	2	23.212	..I
	3	00000	....I
ANA Yemas	4	6.8000	....I
	5	4.2308	....I
	6	0.2593	....I

\*Las medias del tratamiento BA son significativamente diferentes entre sí. Mientras que para el tratamiento ANA estas no son significativamente diferentes. \*\*Su alineación indica si los tratamientos son significativamente diferentes o no.



**Figura 2.** Promedio de brotes producidos en un medio de cultivo M&S (1962) complementado con 1, 3 y 5mg/L de BA

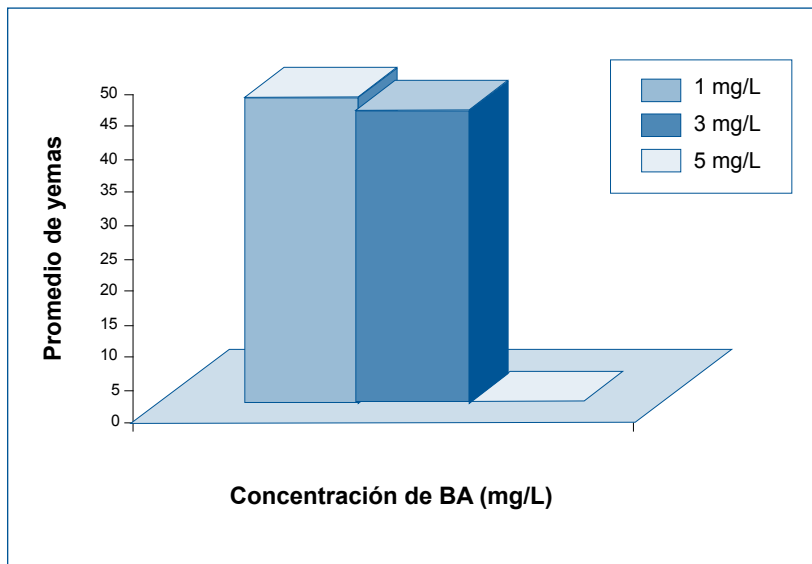


Figura 3. Promedio de yemas producidas en un medio de cultivo M&S (1962) con tres concentraciones diferentes de BA

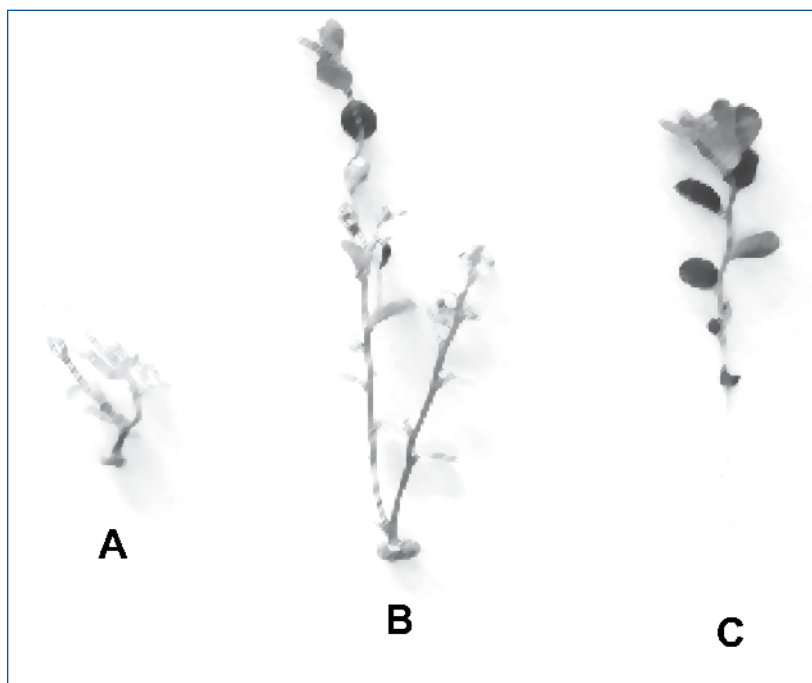


Figura 4. Desarrollo de las vitroplantas en medio M&S (1962) complementado con reguladores de crecimiento diferentes (A: 1 mg/L BA, B: 3 mg/L BA y C: 2 mg/L AG<sub>3</sub>)

La respuesta morfológica favorable de los explantes cultivados es probablemente ocasionada por la acción de la BA, este regulador de crecimiento promueve la división celular y la elongación de yemas (Salisbury y Ross, 1994).

La concentración de 1 mg/L de BA promovió la elongación de las plántulas, no así la producción de brotes laterales. Este efecto se obtuvo con el empleo de la concentración 3 mg/L de BA (fig. 4).

En ambas concentraciones se dio la formación de un callo basal. Un comportamiento similar se observó en el tratamiento con ANA (1, 3 y 5mg/L). Las plántulas germinadas *in vitro* en medio M&S (1962) complementado con 2mg/L de AG<sub>3</sub>, no formaron callo; por el contrario se dio la formación de raíces (figura 4, C).

## Conclusiones

La desinfección propuesta por Catapan y colaboradores (2001) fue relativamente exitosa para esta especie: se obtuvo entre el 30 y 34% de contaminación, considerada baja para explantes provenientes de campo.

La presencia de 3 mg/L de Bencil Adenina (BA) en el medio de cultivo M&S (1962) suplementado con 3% de sacarosa y 0,2% de Phytigel indujo una mayor producción de brotes y yemas, como el medio óptimo para la micropropagación de la especie.

Las semillas de *P. niruri* presentan un periodo de dormancia significativo, que fue superado con mayor eficiencia por el tratamiento de las semillas en inmersión con AG<sub>3</sub> durante 4 horas. Sin embargo, se recomienda más investigación para lograr un incremento en el porcentaje de germinación.

En estudios posteriores con la especie, se recomienda establecer las etapas de enraizamiento y aclimatación para su posible comercialización.



Esta investigación fue financiada por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR, en la modalidad de proyecto estudiantil.

## Bibliografía

- Catapan, E., Fleith, M., y Viana, A. 2001. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulatus* (Euphorbiaceae)(en línea). Brasil. Brasileira de Botânica 24:1 Disponible en <http://www.scielo.br/>
- Figueira, G. M. y Pereira, B. 1998. Estudos Sobre a Germinacao de Quebra Pedra. XV Simposio de Plantas Mediciniais do Brasil.
- González, A; Raciman, J. y Aguirre M. 1999. Hormonas Vegetales. Disponible en <http://fai.unne.edu.ar/biologia/planta/auxinas.htm>
- Ishimaru, K., Yoshimatsu, K., Yamakawa, T., Kamada, H. & Shimomura, K. 1992. Phenolic constituents in tissue cultures of *Phyllanthus niruri*. *Phytochemistry* 34:2015-2016.
- Khana, P. & Nag, T.N. 1973. Isolation, identification and screening of phyllembin from *Emblica officinalis* Gaertn tissue culture. *Indian Journal of Pharmacology* 35:23-25.
- Lancet. 1988. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. 2: 764-766. Disponible en <http://www.scielo.br/>
- Monge, R. 2002. Plantas Medicinales Cuara o Folklore. *Programa Educación Biológica ACG*. Disponible en <http://www.acguanacaste.ac.cr/rothschildia/v4n2/textos/plantas.htm>
- Melillo, P., 1999. Agrotecnología para el cultivo de quebra-pedra o erva-pombinha. *Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas*. 334-340 p.
- Oliveira, E. y Randi, A. 1996. Polimorfismo em Sementes de Algumas Espécies de *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) e enraizamiento de *P. niruri*. XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. 72-73p.
- Rivas, L.. 2001. Cultivo de Tejidos. Tropical y Subtropical Agricultural Institute. Disponible en [http://czu.cz/struktura/itsz/ktsp/ktsppages/os\\_stranky/eloywww/cultivodetejidos.html](http://czu.cz/struktura/itsz/ktsp/ktsppages/os_stranky/eloywww/cultivodetejidos.html)
- Santos, A.R.S., Cechinel Filho, V., Viana, A.M., Moreno, F.N., Campos, M.M., Yunes, R.A. & Calixto, J.B. 1994. Analgesic effects of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus* in mice. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology* 46:755-759.
- Salisbury, B. y Ross, C. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica. Cuarta Edición. California, Estados Unidos. 759p.
- Raintree Nutricion, 2000. Database entry for Chanca Piedra - *Phyllanthus niruri*. Raintree Nutrition, Inc., Austin, Texas. Disponible en <http://www.rain-tree.com/chanca.htm>
- Unader, D. W. y Bryan, H. H. 1995. Factors Affecting Germination and Stand Establishment of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae). *Ecology Botanical* 49: 49-55.
- Unander, D. W. 1991. Callus induction in *Phyllanthus* species and inhibition of viral DNA polymerase and reverse transcriptase by callus extracts. *Plant Cell Reports* 10:461-466.