

Efecto protector del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. "achiote" sobre la hiperplasia prostática benigna en ratas

Protective effect of ethanol extract of leaves *Bixa orellana* L. "achiote" on benign prostatic hyperplasia in rats

Efeito protetor do extrato etanólico das folhas de *Bixa orellana* L. "urucum" na hiperplasia benigna da próstata em ratos

Braulio Cisneros Hilario¹, Jorge Arroyo Acevedo², Bertha Fernandez Araujo¹, Juniors Chinin Vilchez¹

Resumen

Se determinó el efecto protector del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) en ratas; se utilizaron 36 especímenes albinos machos cepa Holtzmann orquiectomizados siete días antes del inicio de los tratamientos y distribuidos aleatoriamente en 6 grupos de 06 ratas c/u, recibiendo: el primero: 2mL/kg de solución suero fisiológico, el segundo: Propionato de testosterona 2 mg/Kg (T) + SSF 4mL/Kg, el tercero: (T) + cefasabal, y el cuarto, quinto y sexto grupo: (T) + extracto de achiote a 50, 250 y 500 mg/Kg, respectivamente. Se evaluaron las concentraciones de antígeno prostático específico (PSA) en sangre, así como el peso y volumen de las próstatas. El grupo que recibió cefazabal 15 mg/kg disminuyó el peso de las próstatas en un 19.86%, el volumen en un 64.10% y el PSA en un 65.08%, mientras que el grupo que recibió extracto de *B. orellana* L. 500 mg/kg evidenció un mejor efecto protector, al encontrarse constantes los pesos y volúmenes de las próstatas, además de una inhibición considerable del PSA (53.44%). Se concluye que en condiciones experimentales, el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. es protector frente a la inducción de hiperplasia prostática benigna en ratas.

Palabras clave: Extracto etanólico, *Bixa orellana* L., hiperplasia prostática benigna, antígeno prostático específico.

Abstract

It was determined the protective effect of the ethanolic extract of leaves of *Bixa orellana* L. (achiote) in rats; used 36 male albino specimens strain Holtzmann orchiectomized seven days prior to the start of treatment and randomly distributed into 6 groups of 06 rats c/u, receiving: the first: 2mL/kg serum solution physiological, second: testosterone propionate 2 mg / kg (T) + SSF 4mL/Kg the third: (T) + cefasabal, and the fourth, fifth and sixth group: (T)+ achiote extract at 50, 250 and 500 mg/Kg respectively. Concentrations of prostate specific antigen (PSA) levels, as well as the weight and volume of the prostates were evaluated. The group receiving cefazabal 15 mg/ kg decreased the weight of the prostates by 19.86%, volume by 64.10% and 65.08% in the PSA, while the group receiving *B. orellana* L. extract 500 mg/kg showed a better protective effect, finding constant weights and volumes of the prostate, as well as a considerable inhibition of PSA (53.44 %). It is concluded that under experimental conditions, the ethanol extract of the leaves of *B. orellana* L. is protective against the induction of benign prostatic hyperplasia in rats.

Keywords: Ethanolic extract, *Bixa orellana* L., benign prostatic hyperplasia, prostate specific antigen.

Resumo

Foi determinado o efeito protetor do etanol extrato de folhas de *Bixa orellana* L. (Urucum) em ratos; usado 36 espécimes de macho albino coe Holtzmann orquiectomizados sete dias antes do início do tratamento e distribuídos aleatoriamente em 6 grupos de 06 ratos cada, recebendo: o primeiro: 2 mL/kg de

¹Universidad San Pedro, Facultad de Medicina Humana. cbraulio_cisnerosh@hotmail.com

²Instituto de Investigaciones clínicas de la Facultad de Medicina. UNMSM. Lima-Perú.

solução salina normal, o segundo: propionato de testosterona 2 mg/Kg (T) + SSF 4 mL/Kg, a terceira: (T) + cefasabal e o quarto, quinto e sexto grupo: (T) + extrato de urucum 50250 e 500 mg/Kg, respectivamente. Antígeno prostático específico (PSA) sangue concentrações, bem como o peso e o volume das próstatas foram avaliados. O grupo que recebeu cefazabal 15 mg/kg diminuiu o peso de próstatas 19,86%, o volume em um 64.10% e PSA em um 65,08%, enquanto o grupo recebendo extrato de *B. orellana* L., 500 mg/kg mostraram um melhor efeito protetor, enfrentou constantes pesos e volumes de próstatas, além de uma inibição significativa do PSA (53.44%). Conclui-se que, em condições experimentais, o extrato etanólico das folhas de *B. orellana* L. é protetora contra a indução de hiperplasia benigna da próstata em ratos.

Palavras-chave: extrato etanólico, *Bixa orellana* L., hiperplasia benigna da próstata, antígeno específico da próstata.

Introducción

La Hiperplasia Benigna de Próstata (HBP), es la enfermedad neoplásica más común en los hombres caracterizada por el agrandamiento de la próstata. La incidencia de HBP aumenta con la edad. Aproximadamente, la mitad de todos los hombres de 60 años de edad muestran evidencias histológicas de HBP, con estimados de prevalencia que se incrementan hasta el 80% a los 80 años, usualmente no constituye una amenaza contra la vida, pero la variedad de síntomas relacionados con la obstrucción parcial o total de la uretra que incluyen urgencia urinaria, polaquiuria, incontinencia, debido al crecimiento de la glándula prostática; puede tener un impacto negativo profundo en la calidad de vida en los pacientes de edad avanzada, con estilos de vida alterados, sueño interrumpido, lo constituyen un problema de salud pública (Sagnier, 1996).

Los extractos vegetales han demostrado poseer efectos terapéuticos gracias a los múltiples metabolitos que contienen, de los cuales los flavonoides, sus múltiples propiedades biológicas observadas experimentalmente y su abundancia en la dieta, junto con su presencia en numerosos remedios de la medicina tradicional, los convierten en posibles candidatos a explicar la asociación encontrada entre el consumo de determinados productos de origen vegetal y la prevención de diversas enfermedades (Carhuapoma, 2008).

B. orellana L. “achiote” es utilizada para *diabetes mellitus*, ictericia, astringente, antidisentérico, diurético, afrodisiaco, antipirético antiemético, antidiarréico, hemostático, antihemorroidal, antianginoso, analgésico, antitusígeno, antibronquial, expectorante, antiinflamatorio, antimalárico, cicatrizante, antihipertensivo, cardiotónico, repelente de insectos, depurativo, digestivo, sedante, antiséptico vaginal, hepatoprotector, antiprostático, hipolipemiante entre otros (Alonso, 2004; Lans, 2006); además, también es utilizado como colorante de alimentos, y utilizado en la industria cosmética (Brack, 1999).

En *B. orellana* L. se han identificado 35 componentes de los cuales acetato de (Z-E)-farnesilo (11,6%), acetato de occidentalol (9,7%), espatulenol (9,6%), ishwarane (9,1%), bixina y norbixina son los mayores constituyentes, en las hojas encontramos: Bixaganeno, ishwarano (aceite esencial) entre otros mono y sesquiterpenos; flavonoides, flavonas, antocianidinas y sesquiterpenlactonas, carotenoides: bixina, norbixina, orelina, β -caroteno, criptoxantina, metilbixina, zeaxantina, luteína; ácido tomentósico; vitaminas (A, B, y C); proteínas; azúcares; celulosa; grasas; calcio, fierro y fósforo; diterpenos: farnesilacetona, geraniol, geranil formato, alcaloides (vestigios), ácido gálico (benzenoide) y ácido alfitólico (Ramírez, 2001).

En la actualidad el tratamiento médico es difícil y costoso, lo que ha llevado a la búsqueda constante de nuevas terapias, así los extractos de plantas son actualmente

prescritos en muchos países por disminuir el diámetro de la glándula prostática, por todas estas razones la presente investigación se evaluará el efecto protector del extracto etanólico de achiote sobre la HBP en ratas. El problema planteado fue ¿El extracto etanólico de las hojas de achiote tendrán efecto protector al administrarlo por vía oral en ratas con inducción de HBP por testosterona?; siendo el objetivo determinar el efecto protector del extracto achiote sobre la HBP inducida con testosterona en ratas orquiectomizadas.

Material y métodos

La población estuvo formado por las ratas albinas cepa Holtzman criadas en el bioterio del Instituto Nacional de Salud Lima-Chorrillos, y la muestra que se utilizó fueron 36 ratas albinas machos. cepa Holtzmann, Var albinus de 275 ± 25 g de peso corporal, además de 10 Kg de hojas de *muestra vegetal* (achiote), recolectadas en el centro poblado de Cascajal, distrito de Santa, Provincia del Santa Departamento de la Ancash, Perú; durante el mes de marzo del 2013. El diseño es de tipo analítico-experimental, aleatorizado, completo, pre-clínico *in vivo*.

Las plantas de *Bixa orellana* L. fueron recolectadas en el centro poblado de Cascajal, distrito de Santa, Provincia del Santa Departamento de la Ancash, Perú; durante el mes de marzo del 2013, durante las mañanas.

La identificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La muestra vegetal (planta completa) se estudió y clasificó según el sistema de Cronquist (1988).

Para la preparación del extracto alcohólico, las hojas de achiote fueron lavadas y sometidas a deshidratación, a 40 °C en horno con aire circulante, luego el material seco, se trituró en un molino de mano, hasta obtener un polvo fino, y se sometió a un proceso de maceración con etanol de 96° a temperatura ambiente. Luego de 7 días se filtró y dicho filtrado se desecó a 40°C en estufa hasta peso constante. El residuo seco, se denominó extracto etanólico, el cuál fue conservado en un frasco de color ámbar a 4°C, luego éste residuo sirvió para realizar el estudio fitoquímico y ensayo farmacológico, previa reconstitución con agua destilada, utilizando como agente tensoactivo polisorbato de sodio-80 al 3% del volumen de la solución a preparar (CYTED, 1995).

El estudio fitoquímico del extracto etanólico de achiote se realizó en el laboratorio de farmacología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Pedro, al cual se le practicó, las reacciones de Molisch, Fehling, tricoloruro férrico, Ninhidrina, Shinoda, Dragendorff, Bortrager Liebermann, Vainillín sulfúrico. Para determinar cualitativamente la presencia y cantidad de metabolitos secundarios presentes en el extracto, y se utilizó la siguiente codificación: ausencia (-), poca cantidad (+), regular cantidad (++) , abundante cantidad (+++) (Lock de Ugaz, 1994).

Para la determinación del efecto protector hepático de *B. orellana* L. la inducción experimental de la hiperplasia prostática benigna se realizó según el método de Mitra, 1999, donde se utilizaron 36 ratas albinas machos cepa Holtzmann ente 275 ± 25 g de peso corporal. Las cuales fueron adquiridos del bioterio del Instituto Nacional de Salud (Lima-Chorrillos), las cuales fueron previamente aclimatadas 7 días antes de la experimentación y fueron alojadas en jaulas metálicas con alimento balanceado en pellets (ratonina) y agua a libertad a temperaturas 25 ± 1 °C, con 12 horas ciclo luz / oscuridad y humedad relativa aproximadamente 60%, luego se procedió a la orquiectomía, siete días después fueron distribuidas de manera aleatoria en grupos de

seis ratas cada grupo según el siguiente diseño experimental: El grupo 01 recibió SSF 4 mL/Kg Solución suero fisiológico (SSF), el grupo 02 recibió Propionato de testosterona 2 mg/Kg (T) + SSF, el grupo 03 recibió (T) + Cefasabal 15 mg/kg, el grupo 04, 05 y 06 recibieron: (T) + extracto de achiote 50, 250 y 500 mg /kg respectivamente. El propionato de testosterona fue administrado por vía subcutánea diariamente durante 15 días y a la misma vez recibieron los productos a evaluar y el estándar farmacológico (cefazabal) por vía oral, se usó como vehículo aceite de oliva para el propionato de testosterona, y se utilizó una cánula metálica para la administración de las sustancias a evaluar. Después de la última dosis las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico 30 mg/kg para extraerles sangre por punción cardiaca, la cual se utilizó para determinar el PSA. Al finalizar la inducción se eutanizaron a las ratas con sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg), para retirar las próstatas, medirlas y pesarlas.

Los datos fueron expresados mediante la estadística descriptiva expresados en valores medios \pm error estándar (EA), límites inferior y superior a un intervalo de confianza del 95%, e inferencialmente por el análisis de varianza y de múltiples comparaciones de Duncan, los valores fueron significativos con una $p < 0,05$; se usará el programa estadístico SPSS versión 13, 2008.

Resultados

Tabla 1. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote).

Metabolito Secundario	Reacción de identificación	Cantidad
Carbohidratos	Molisch	+++
Azúcares Reductores	Fehling	+++
Taninos	Tricloruro de hierro al 1%	+++
Aminoácidos libres	Ninhidrina	++
Flavonoides	Shinoda	++
Alcaloides	Dragendorff	++
Heterósidos antraquinónicos	Borntrager	+
Esteroides triterpénicos	Lieberman	+
Glicósidos	Vainillin Sulfurico	++

(+++)= Abundante cantidad; (++)=Regular cantidad, (+)= Poca cantidad; (-)=Ausencia.

Tabla 2. Análisis descriptivo de los valores medios de longitud dorsal, ventral y anteroposterior obtenidos al evaluar el efecto protector del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. (achiote), sobre la hiperplasia prostática benigna en ratas inducida por propionato de testosterona.

Variable	Tratamiento	VM \pm EE	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Longitud dorsal de la próstatas (cm)	Suero fisiológico 4 mL/Kg	0.95 \pm 0.03	0.86	1.04
	Testosterona 2 mg/Kg (T)	1.25 \pm 0.02	1.19	1.31
	T + cefazabal 15 mg/Kg	0.86 \pm 0.02	0.81	0.92
	T + achiote 50 mg/kg	1.28 \pm 0.04	1.18	1.39
	T + achiote 250 mg/kg	1.56 \pm 0.02	1.51	1.62
	T + achiote 500 mg/kg	1.1 \pm 0.04	1.01	1.19
Longitud ventral de la próstatas	Suero fisiológico 4 mL/Kg	0.78 \pm 0.05	0.66	0.91
	Testosterona 2 mg/Kg (T)	1.13 \pm 0.02	1.08	1.19
	T + cefazabal 15 mg/Kg	0.75 \pm 0.03	0.66	0.84

(cm)	T + achiote 50 mg/kg	1.1 ± 0.04	1.01	1.19
	T + achiote 250 mg/kg	1.2 ± 0.04	1.09	1.31
	T + achiote 500 mg/kg	1.03 ± 0.02	0.98	1.09
Longitud antero-posterior de la próstata (cm)	Suero fisiológico 4 mL/Kg	0.36 ± 0.02	0.31	0.42
	Testosterona 2 mg/Kg (T)	0.55 ± 0.02	0.49	0.61
	T + cefazabal 15 mg/Kg	0.43 ± 0.02	0.38	0.49
	T + achiote 50 mg/kg	0.75 ± 0.02	0.69	0.81
	T + achiote 250 mg/kg	0.95 ± 0.02	0.89	1.01
	T + achiote 500 mg/kg	0.7 ± 0.04	0.61	0.79

Tabla 3. Análisis descriptivo de los valores medios de los pesos, volúmenes y antígeno prostático específico obtenidos al evaluar el efecto protector del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. (achiote), sobre la hiperplasia prostática benigna en ratas inducida por propionato de testosterona.

Variable	Tratamiento	VM ± EE	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Peso de las próstatas (g)	Suero fisiológico 4 mL/Kg	1.05 ± 0.01	1.03	1.08
	Testosterona 2 mg/Kg (T)	1.51 ± 0.03	1.43	1.6
	T + cefazabal 15 mg/Kg	1.21 ± 0.03	1.12	1.29
	T + achiote 50 mg/kg	1.68 ± 0.04	1.58	1.78
	T + achiote 250 mg/kg	1.86 ± 0.05	1.74	1.98
	T + achiote 500 mg/kg	1.49 ± 0.03	1.42	1.56
Volumen de las próstatas (cm ³)	Suero fisiológico 4 mL/Kg	0.27 ± 0.03	0.2	0.34
	Testosterona 2 mg/Kg (T)	0.78 ± 0.06	0.64	0.93
	T + cefazabal 15 mg/Kg	0.28 ± 0.02	0.23	0.34
	T + achiote 50 mg/kg	1.06 ± 0.07	0.88	1.24
	T + achiote 250 mg/kg	1.78 ± 0.07	1.6	1.97
	T + achiote 500 mg/kg	0.79 ± 0.06	0.65	0.94
Antígeno Prostático específico (PSA)	Suero fisiológico 4 mL/Kg	0.23 ± 0.03	0.16	0.3
	Testosterona 2 mg/Kg (T)	2.32 ± 0.28	1.6	3.03
	T + cefazabal 15 mg/Kg	0.812 ± 0.15	0.43	1.2
	T + achiote 50 mg/kg	1.483 ± 0.2	0.96	2
	T + achiote 250 mg/kg	1.12 ± 0.11	0.84	1.39
	T + achiote 500 mg/kg	1.08 ± 0.23	0.49	1.67

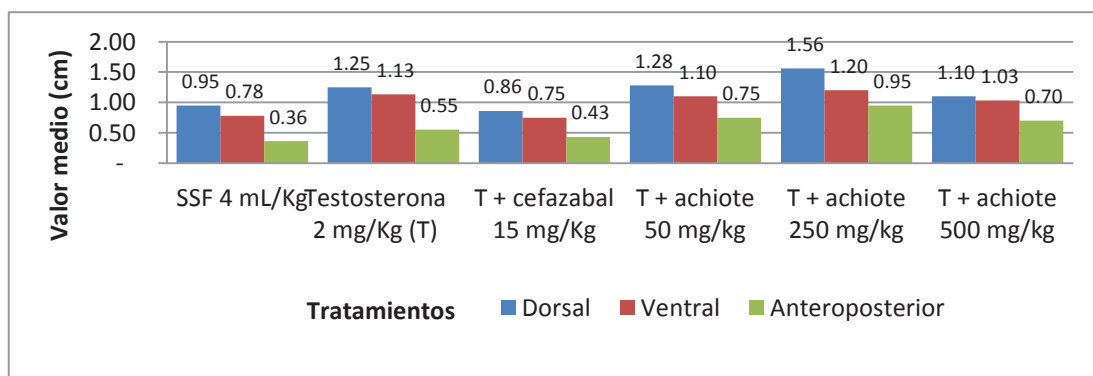


Figura 1. Efecto del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. (achiote) sobre la longitud dorsal, ventral y anteroposterior (g) y volumen (mL.) de las próstatas de las ratas.

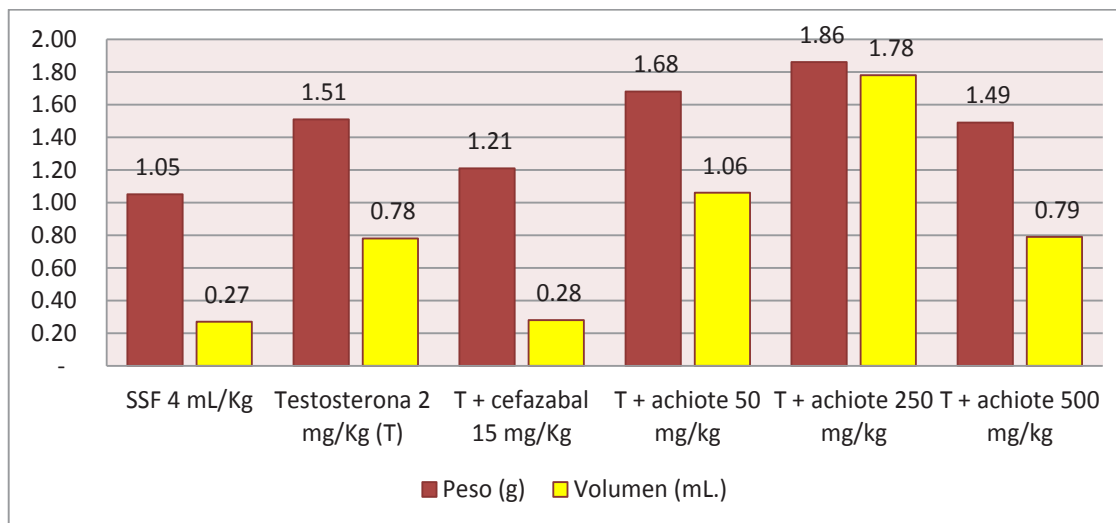


Figura 2. Efecto del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. (achiote) sobre el volumen de las próstatas en ratas con inducción de hiperplasia prostática benigna por testosterona.

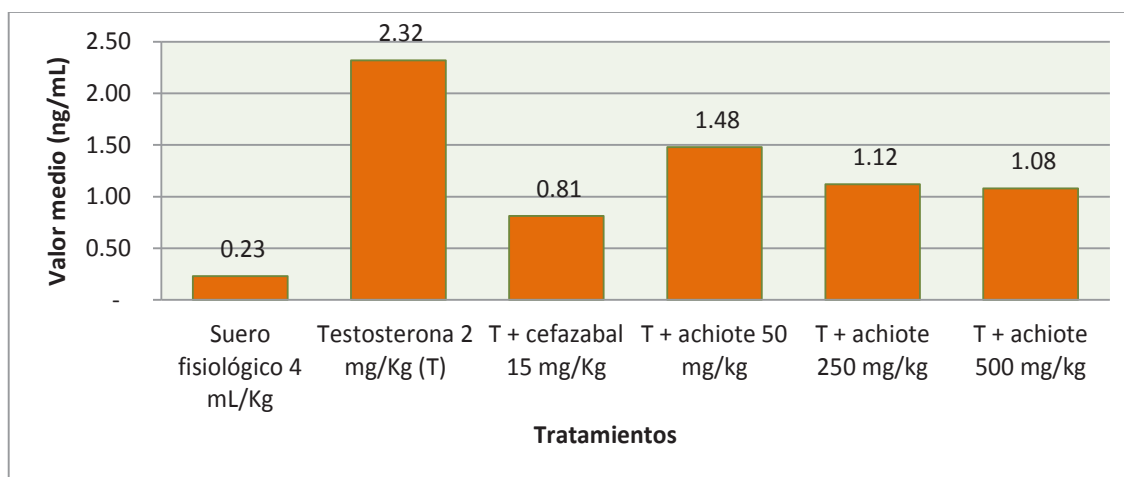


Figura 3. Valores medios de antígeno prostático específico (PSA) al evaluar el efecto protector de las hojas de *B. orellana* L. (achiote) sobre la hiperplasia prostática benigna inducida en ratas por testosterona.

Discusión

Dentro de los componentes fitoquímicos del extracto de achiote se ha reportado la presencia de carbohidratos, azúcares reductores y taninos en abundante cantidad (+++); aminoácidos libres, flavonoides, alcaloides y glicósidos en regular cantidad (++); mientras que heterósidos antraquinónicos y esteroides triterpénicos en pequeñas cantidades (+) (tabla 1), lo cuales tendrían implicancia sobre la protección de HBF inducida en ratas.

En las tablas 2 y 3 y las figuras 1 y 2 se muestran los cambios sobre la longitud dorsal, ventral y anteroposterior de las próstatas, donde se evidencia que la testosterona indujo incremento de las próstatas, por ende también incremento el peso y volumen de las mismas; los tratamientos con extracto de achiote a dosis de 500 mg/kg presentó mayor eficacia, ya que impidió notablemente el aumento del tamaño, peso y volumen de las próstatas.

En la figura 3 se evidencia que el extracto de achiote permitió mantener los valores de antígeno prostático específico (PSA) dentro de los parámetros normales, como son los valores menores a 2.5 ng/mL, alcanzando valores similares al grupo experimental que recibió cefazabal 15 mg/kg. Se evidenció que el grupo que recibió cefazabal disminuyó el peso de las próstatas en un 19.86%, el volumen en un 64.10% y el PSA en un 65.08%, mientras que el grupo que recibió extracto de achiote 500 mg/kg evidenció un mejor efecto protector ya que mantuvo los pesos y volúmenes constantes de las próstatas, además de observarse una inhibición considerable del PSA (53.44%).

La etiología de la HPB se asocia a cambios hormonales y no hormonales que ocurren durante el envejecimiento, de los cuales el cambio hormonal más relevante es el aumento de la conversión de la testosterona (T) en su metabolito más activo, la dihidrotestosterona (DHT), catalizada por la enzima 5 α -reductasa prostática, de modo que la acumulación de DHT en el tejido prostático produce un conjunto de eventos que promueven el crecimiento celular. Por otra parte, el principal cambio no hormonal relacionado con el desarrollo de la HPB es el aumento del tono de la musculatura lisa de la vejiga y la próstata mediado por los adrenoreceptores α_1 de modo que en la próstata hipertrofiada existe un aumento de la población de estos receptores y consecuentemente, del tono del músculo liso prostático (Bartsch, 2002). Los principales tratamientos farmacológicos de la HPB incluyen, por tanto, a los inhibidores de la enzima 5 α -reductasa prostática, los antagonistas de los adrenoreceptores α_1 y la terapia combinada con ambos, los fitofármacos también se utilizan ampliamente para tratar la HPB, dentro de los cuales el más utilizado y estudiado es el extracto lipídico de los frutos de saw palmetto (ELSP) (*Serenoa repens*, Arecaceae), el cual contiene principalmente una mezcla de ácidos grasos, tales como oleico, láurico, mirístico, palmítico, linoleico, cáprico, esteárico y caprílico (Suzu, 2009), cuyo efecto farmacológico se atribuye a la inhibición de la enzima 5 α -reductasa prostática y el antagonismo de los adrenoreceptores α_1 , auxiliado por su efecto antiinflamatorio a consecuencia de la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa y 5-lipooxigenasa (Breu, 1992).

Cada tableta de cefasabal contiene extractos vegetales fluidos 112,5 mg. (Sabal serrulata 12,5 mg, Aesculus hippocastanum 62,5 mg, Solidago virga aurea 37,5 mg): Sabal serrulata (*Serenoa repens*, Saw palmetto), principal componente de posee efecto antiandrogénico no hormonal y antiinflamatorio prostático. El efecto antiandrogénico lo ejerce bloqueando la 5 α -reductasa impidiendo la transformación de la testosterona en dihidrotestosterona y el efecto antiinflamatorio al bloquear la fosfolipasa 5 α . Aesculus hippocastanum (castaño de las Indias) tiene como principal componente aescina, de propiedades antiexudativas y antiedematosas, ya que actúa en la primera fase del proceso inflamatorio. Solidago virga aurea, entre cuyos componentes tiene saponinos triterpenos, bayogenina y ácido oleánico, que adicionalmente le confieren al producto acciones antiedematosas y estimulantes de la diuresis. La acción en conjunto descongestiona la próstata inflamada, disminuye la orina residual y favorece la diuresis (Carbajal, 2004); igualmente achiote demostró poseer taninos, flavonoides, alcaloides, aminoácidos libres, azúcares reductores, entre otros metabolitos secundarios que le estarían confirmando el efecto protector sobre la hiperplasia prostática benigna inhibiendo la enzima 5 α -reductasa prostática, la ciclooxigenasa y 5-lipooxigenasa.

Conclusión

El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) evidenció efectos beneficiosos al prevenir el aumento del, volumen y peso de las próstatas, así como mantener los valores de antígeno prostático específico dentro de los valores normales en ratas con inducción de hiperplasia prostática benigna por testosterona.

Referencias bibliográficas

- Alonso, J. (2004). Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. Rosario (Argentina): Editorial Corpus. pp 41-45.
- Bartsch, G., Rittmaster, R. S. and Klocker, H. (2002). Dihydrotestosterone and the role 5 alpha-reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia. *Urologe A*; 41:412-24
- Brack, A.; PNUD (1999). Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Cuzco: Centro de Estudios Regionales Andinos “Bartolomé de las Casas” (CBC); p 70-71
- Breu, W., Hagenlocher, M., Redl, K., Tittel, G., Stadler, F and Wagner H. (1992). Antiphlogistische wirkung eines mit hyperkritischem kohlendioxid gewonnenen Sabal frucht Extraktes. *in vitro* Hemmung des Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase Metabolismus. *Arzneimittelforschung*; 42:547-51.
- Carbajal, D., Arruzazabala, M. L., Mas, R., Molina, V., Rodríguez. E and González V. (2004). Effect of D-004, a lipid extract from Cuban Royal Palm fruit, on inhibiting prostatic hypertrophy induced with testosterone or dihydrotestosterone in a rat model: A randomized controlled study. *Curr Ther Res*; 65:505–514
- Carhuapoma, M., López, S. (2008). *Maíz Morado Purple Corn Moléculas bioactivas antioxidantes y anticancerígenas*. Edit. Concytec, 53– 90.
- CYTED. (1995). *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-I. Búsqueda de principios bioactivos de plantas de la región. Manual de técnicas de investigación*; 220.
- Cronquist, A. (1988). The evolution and classification of flowering plants. New York, N.Y.: *The New York Botanical Garden*, 555.
- Lans CA. (2006). Ethnomedicines Used in Trinidad and Tobago for Urinary Problems and Diabetes mellitus. *J Ethnobiol Ethnomed*. 13; 2:45.
- Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales*. (2° Ed.). Lima, Perú: Fondo Editorial PUCP.
- Mitra, S.K., Sundaram, R., Mohan, A.R., Venkataranganna M.V., Venkatesha et al. (1999). Protective effect of Prostate in experimental prostatic hyperplasia in rats. *Asian J Androl*. 1:175-9.
- Ramírez, T. (2001). Evaluación de la Actividad Hipoglicémica del Extracto Acuoso de las Hojas de *Bixa Orellana* “Achiote” [Tesis]. Ayacucho (Perú): Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. p 23-26, 29-31.
- Sagnier, P. P. (1996). Internacional comparison of the community prevalence of symptoms of prostatism in four countries. *Eur. Urol*. 29: 15-20.
- Suzu, Ki. M., Ito, Y., Fujino, T., Abe, M., Umegaki, Ki., Onoue, S., et al. (2009). Pharmacological effects of Saw Palmetto extract in the lower urinary tract. *Acta Pharmacol Sin*;30(3):227-81.