

## ESTUDIO DEL EFECTO HIPOGLICEMIANTE DE *Cordia alliodora* (NOGAL CAFETERO) EN RATONES TRATADOS CON ALOXANO

### STUDY OF THE HIPOGLYCEMIC EFFECT OF *Cordia alliodora* (NOGAL CAFETERO) ON MICE TREATED WITH ALLOXAN

Elizabeth MURILLO P.,<sup>1\*</sup> Martha L. MORENO<sup>2</sup> y Neyibe N. GUTIÉRREZ H.<sup>2</sup>

#### RESUMEN

En éste estudio se propone realizar el análisis fitoquímico del extracto etanólico de *Cordia alliodora* (nogal cafetero), examinar su efecto sobre los niveles de glicemia en ratones machos sanos y aloxanizados ( $50 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) y correlacionar los metabolitos secundarios encontrados con la bioactividad del vegetal. El potencial hipoglicémico del extracto etanólico se evalúa a las 24 y 48 horas después de haberse administrado por vía intraperitoneal ( $500 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) del mencionado extracto a ratones de 60 días de edad y con 40 g de peso corporal (línea ICR). La acción del vegetal se contrasta contra insulina (3 unidades/1500 g peso corporal) y agua destilada (1 mL), utilizados como control. El trabajo demuestra que *Cordia alliodora* reduce los niveles de glucosa en un promedio de  $180.7 \text{ mg dL}^{-1}$  a  $134.8 \text{ mg dL}^{-1}$ . El efecto hipoglicemiante revelado por el vegetal podría atribuirse en principio a su contenido de alcaloides y a la capacidad que tiene bien estos metabolitos secundarios de dejarse oxidar.

**Palabras Clave:** Ratones, diabetes, aloxano, *Cordia alliodora*, extracto etanólico, hipoglicemiante.

#### ABSTRACT

This study attempts to carry out the phytochemical analysis of the ethanolic extract of *Cordia alliodora* (nogal cafetero), to examine its effect on the glycemic levels of intact male mice and mice groups inoculated with alloxan ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and to correlate the detected secondary metabolites with the bioactivity of the vegetable. The hypoglycemic potential of the ethanolic extract is evaluated after 24 and 48 hours of its i.p. administration ( $500 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) to sixty days-old male mice having a body weight of 40 g (Line ICR). The action of the vegetable is contrasted against insulin (3 units/1500g corporal weight) and distilled water (1 mL), used as a control. The results demonstrate that the *C. alliodora* reduces the levels of glucose in an average of  $180.7 \text{ mg dL}^{-1}$  to  $134.8 \text{ mg dL}^{-1}$ . The hypoglycemic effect revealed by the vegetable could be attributed, in principle, to its alkaloidal content and the capacity that these secondary metabolites have to be oxidized.

**Keywords:** Mice, diabetes, alloxan, *Cordia alliodora*, ethanolic extract, hypoglycemic

1 Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. A.A. 546 Barrio Santa Elena. Ibagué. Tolima. Colombia.

2 Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. A.A 546. Barrio Santa Elena. Ibagué. Tolima. Colombia.

\* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: emurillo8@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

Diabetes mellitus es el desorden metabólico más común en el mundo occidental, afectando más de 120 millones de personas; no obstante, más de la mitad de ésta población no es consciente de que padece la enfermedad. Esta patología metabólica se presenta cuando el páncreas no produce suficiente insulina (diabetes Tipo I) o cuando el organismo no puede utilizar eficazmente la insulina producida por el páncreas (diabetes Tipo II), sus mayores complicaciones son retinopatías, nefropatías, neuropatías y enfermedades cardiovasculares.

En Colombia, la enfermedad es padecida por el 8 al 10% de la población mayor de 20 años, aunque esta prevalencia aumenta en mayores de 50 años. Si se tiene en cuenta que la población colombiana es un poco más de 40 millones de habitantes, es fácil darse cuenta que estos porcentajes demuestran que la diabetes constituye un grave problema de salud pública (1).

Las plantas con actividad antidiabética suelen aportar una fuente útil de nuevos compuestos orales hipoglicemiantes, ya sea como entidades farmacéuticas o coadyuvantes de las terapias existentes. Estudiarlas permite validar científicamente su efectividad a fin de recomendar su uso y probablemente reducir el costo del cuidado de la salud de estos pacientes (2).

Un cierto número de plantas tradicionalmente aplicadas en el tratamiento de la diabetes han mostrado actividad hipoglucémica en animales de laboratorio, tal es el caso de *Agrimonia eupatoria* (hojas), *Eucalyptus globulus* (hojas), *Coriandrum sativum* (semillas), *Juniperus communis* (bayas), *Rubus fruticosus* (hojas), *Agaricus bisporus* (seta), *Corinus comatus* (seta), *Amanita phalloides* (seta), *Opuntia stracantha* (tallos), *Phaseolus vulgaris* (semillas), *Lettuca sativa*, *Solanum tuberosa*, *Zea mays* (tallos). Sin embargo, a muchas de estas plantas no se les han identificado todavía el o los agentes responsables (3).

En una encuesta realizada por el grupo de Fitoquímica de la Universidad del Tolima en el Municipio de Palocabildo-Tolima, se detectó que la población utiliza a *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav) Oken (Boraginaceae), en el tratamiento de la gripa, el acné y el cocimiento de sus hojas en la diabetes. Se trata de una especie heliófita que ha encontrado gran aplicación en carpintería, construcción de muebles, gabinetes, pisos, paneles decorativos y

adicionalmente se considera como una especie con grandes posibilidades para pulpa de papel. Adicionalmente, la medicina folclórica la utiliza en contusiones, catarros, dermatosis, tumores, llagas, actúa como desinflamatorio, estimulante, tónico y es usado en la elaboración de ungüentos (4).

La diabetes mellitus espontánea o provocada en los animales ha aportado una serie de conocimientos sobre la diabetes humana, a través de estudios experimentales en laboratorio. En este trabajo nos propusimos comprobar la actividad hipoglicemiantes del extracto vegetal de hojas de *C. alliodora* mediante un modelo de ensayo biológico en ratones e intentar asociar la bioactividad observada en el vegetal con los metabolitos secundarios encontrados en el extracto etanólico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

La planta estudiada se colectó en la Vereda Bajo Gualí del Municipio de Palocabildo-Tolima, ubicado entre 1000 y 1600 m.s.n.m., con una precipitación promedio anual de 2000 mm y temperatura promedio de 18° C. Según la literatura (5), la especie se le conoce como nogal, laurel blanco (Honduras), laurel y laurel negro (Ecuador, Colombia y Panamá).

Se trabajó con la parte aérea del vegetal, recolectada manualmente, posteriormente se lavó, se secó a temperatura ambiente y se pulverizó. Con el polvo obtenido se preparó un macerado utilizando como solvente etanol del 96% (proporción 1:20). Cada 24 horas se filtró el extracto y se renovó el solvente hasta agotamiento de la muestra. Los filtrados reunidos se concentraron a presión reducida. Al extracto concentrado se le evaporó totalmente el solvente, obteniéndose un sólido en polvo, que luego se resuspendió en agua destilada (proporción 1:20), para su posterior administración. El producto de la resuspensión se almacenó en frascos de vidrio ámbar (4° C) hasta su utilización.

### Estudio fitoquímico

Se realizó un análisis fitoquímico preliminar para hojas de *C. alliodora*, siguiendo las marchas aplicadas para tal efecto en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad del Tolima y de acuerdo a lo recomendado por Domínguez (6) y Sanabria (7).

Los ensayos realizados se observan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Ensayos fotoquímicos aplicados al extracto etanólico de *Cordia alliodora*

Ensayos	Metabolitos
Dragendorff, Mayer	Alcaloides
Borntrager	Quinonas
Lieberman Burchard, cromatográficos (CCD)	Triterpenos y esteroides
Cloruro férrico, gelatina-sal	Fenoles, taninos
Prueba de la espuma, hemólisis	Saponinas
Shinoda	Flavonoides
Hidroxamato férrico terpénicas	Cumarinas, lactonas
Raymond, Kedde	Glicósidos cardiotónicos

### Bioensayo

Para el bioensayo se utilizaron 40 ratones machos ICR (línea isogénica, suministrados por el Instituto Nacional de Salud), de 60 días de edad y 40 g de peso promedio. Los animales se sometieron a un periodo de adaptación durante una semana, en jaulas de acero inoxidable (40 x 40 x 20cm) con libre acceso de agua y alimento (rodentina). Las condiciones de laboratorio fueron: temperatura 24°C, fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas oscuridad (8).

Previo a la aplicación de los tratamientos se realizaron pruebas conductuales en todos los animales, a fin de garantizar homogeneidad de comportamiento, posibilitar la designación al azar de cualquier individuo a un grupo experimental y posteriormente realizar comparaciones entre grupos. La misma prueba se realizó después de inducir la diabetes experimental y administrar los respectivos tratamientos.

Se conformaron 4 grupos experimentales, cada uno de los cuales contó con 10 individuos distribuidos de la siguiente forma: grupo control (totalmente sano). G1 (insulina, 3 unidades/1500g de peso corporal, vía intraperitoneal). G2 (extracto de *C. alliodora*, 500mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal, por vía intraperitoneal día de por medio). G3 (agua destilada, 1 mL en dosis diaria, vía intraperitoneal).

El estudio se llevó a cabo en diversas etapas: determinación de los niveles de glucosa en condiciones normales, inducción de diabetes con la inyección i.p de 50 mg kg<sup>-1</sup> de aloxano en dosis única a los grupos G1, G2 y G3, administración de tratamientos y toma de tres glucometrías diarias para todos los grupos.

La obtención de los niveles de glucosa en sangre se realizó mediante punción de la cola y lectura a través de la utilización de un glucómetro digital modelo ADVANTAGE II tomando 3 muestras diarias (8 a.m., 3 y 7 p.m.) durante la semana de experimentación.

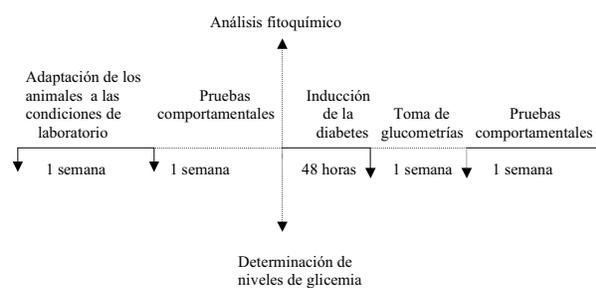
### Pruebas conductuales

Para evidenciar cambios comportamentales se aplicó un Test Neurológico de comportamiento innato y motivado a cada uno de los animales. En el test se evaluaron los siguientes reflejos: reflejo de flexión, movimiento de cola, reflejo de habilidad, reflejo de escape, reflejo de ubicación y reflejo de equilibrio. Las respuestas observadas para los estímulos en cada prueba se llevaron a una escala de 1 a 3 de acuerdo a su intensidad: muy leve (1), leve (2), notoria (3).

### Pruebas post-mortem

Se efectuaron pruebas histopatológicas de hígado y páncreas en dos individuos de cada grupo, con el propósito de comprobar el efecto diabético del aloxano.

La representación esquemática del diseño general del experimento, aparece esquematizada en la figura 1.



**Figura 1.** Diseño general del experimento que muestra el orden de las diferentes etapas

### Análisis Estadístico

Mediante comparación de medias (ANOVA) se procedió a verificar la posible existencia de diferencias significativas en los grupos antes de la inducción de la diabetes. Se hizo una comparación intra-grupos a través de la aplicación del mismo tipo de análisis estadístico, a fin de verificar la existencia de diferencias significativas internas, durante los días 1 y 2 establecidos para observar la evolución de la enfermedad, luego de aplicar el aloxano.

De igual manera, se aplicó un ANOVA de medias repetidas con el fin de evidenciar diferencias significativas inter-grupos, en los días 1 y 2, tomando como referencia el grupo control.

Para verificar la actividad del extracto en los 5 días de tratamiento y observar la posible existencia de diferencias significativas a lo largo del tiempo, o fluctuaciones en los niveles de glucosa, se realizó un ANOVA de medias repetidas.

Mediante ANOVA se comparó, al final de la experimentación, las glucometrías de los 4 grupos, lo cual determinaría el tratamiento más efectivo. Con posterioridad a la aplicación de ANOVA se procedió a elaborar una prueba post-hoc de Newman-Keuls que muestra específicamente entre qué grupos se encuentran las diferencias significativas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudio fitoquímico

A través del análisis fitoquímico preliminar efectuado al extracto etanólico de *C. alliodora*, se evidenciaron los metabolitos secundarios que deja ver la tabla 2.

**Tabla 2.** Resultados del análisis fitoquímico realizado al extracto etanólico de *C. alliodora*

Metabolito	Presencia relativa
Alcaloides	+++
Flavonoides	ND
Quinonas	++
Fenoles y taninos	ND
Saponinas	+++
Triterpenos y esteroides	+++
Cumarinas	ND
Glicósidos cardiotónicos	ND
Lactonas terpénicas	++

Convenciones: abundante +++, mediana cantidad ++, No Detectado: ND

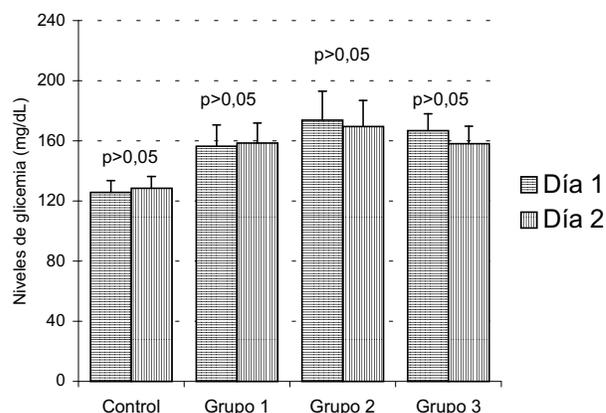
Los resultados obtenidos muestran que el extracto etanólico del vegetal objeto del interés de este estudio está constituido por alcaloides, quinonas, saponinas, triterpenos y/o esteroides y lactonas terpénicas. Es evidente la prevalencia en el extracto de compuestos derivados del isopreno por la vía del ácido mevalónico (triterpenos y esteroides, lactonas terpénicas, saponinas).

La actividad hipoglicemiante de taninos (via shiquimato) y flavonoides (de ruta mixta) ha sido reconocida (9-11); fundamentada esta actividad en gran parte por la habilidad de interactuar con los radicales libres y acomplejarse con ellos (12). Corral et al. (13), no sólo incluye a los metabolitos anteriormente mencionados sino además a los polisacáridos y a los alcaloides (de origen biosintético múltiple) con acción hipoglicemiante. Dado que taninos y flavonoides no fueron detectados en el extracto vegetal analizado, podría entonces pensarse que la bioactividad revelada por *C. alliodora* es proveniente, en principio, a la abundante cantidad de alcaloides revelados, sin desestimar la acción sinérgica que pudieran manifestar las quinonas o quizá los isoprenoides.

### Bioensayo

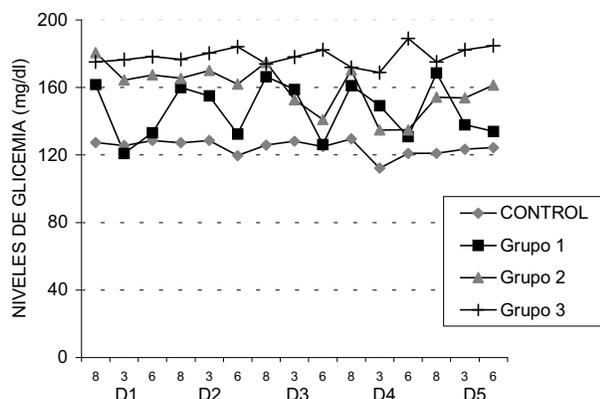
En condiciones normales se registraron niveles de glucosa sanguínea entre 82 y 138 mg dl<sup>-1</sup>. 48 horas después de la administración del aloxano, se consideraron animales diabéticos aquellos individuos que presentaran glicemia mayor o igual a 150 mg dl<sup>-1</sup>.

La figura 2 muestra los niveles de glicemia presentados en los 4 grupos durante las 24 y 48 horas post-inyección de aloxano, dejando ver la ausencia de diferencias significativas intra-grupos entre las 24 a las 48 horas ( $p > 0.05$ ).



**Figura 2.** Comportamiento intra-grupo durante las 48 horas post-inyección aloxano.

Por su parte, la figura 3 ilustra las variaciones en los niveles de glicemia, obtenidos en los 3 momentos diarios, durante el transcurso de los 5 días de tratamiento.



**Figura 3.** Comparación de los niveles de glicemia en los cuatro grupos durante los 5 días de tratamiento.

De la figura se infiere que desde el inicio se observaron marcadas diferencias en el comportamiento de los grupos. El grupo control mantuvo los niveles de glicemia entre 112 y 129 mg dL<sup>-1</sup>, con una conducta constante durante los 5 días de tratamiento. Entre tanto el grupo 3, tratado con agua destilada, mantuvo los niveles de glucosa entre N 175 y 188 mg dL<sup>-1</sup>, presentando ligeras fluctuaciones.

Por su parte el grupo 1, tratado con insulina, se mantuvo en un rango de 120 y 168 mg dL<sup>-1</sup>, presentando cambios bruscos, principalmente en el día 1 a las 5 horas de administración (120.9 mg dL<sup>-1</sup>) y el día 3 a las 8 horas (126.8 mg dL<sup>-1</sup>). Estos resultados son similares a los valores de glicemia obtenidos en el grupo control. El mayor efecto de la insulina se observó 10 horas después de ser suministrada.

El grupo 2, tratado con extracto vegetal, mantuvo un comportamiento casi constante, si se le compara con el grupo insulínico. En la segunda administración del extracto el efecto hipoglicemiante se manifestó notoriamente, al descender la glucosa en sangre de 174.89 a 141.28 mg dL<sup>-1</sup>.

Sin embargo, en el tercer día de experimentación (segunda administración del extracto), el efecto hipoglicemiante fue notorio al descender de 174.89 mg dL<sup>-1</sup> (8:00 a.m.) a 152.78 mg dL<sup>-1</sup> (3:00 p.m.), alcanzando niveles de 141 mg dL<sup>-1</sup> a las 6:00 p.m., momento en el cual el grupo tratado con agua destilada presentó glucometrías significativamente diferentes a las obtenidas en el grupo control y en los restantes ( $p > 0.01$ ).

Es importante mencionar que aunque en el cuarto día de experimentación no se administró extracto vegetal, la glicemia de los individuos se

mantuvo menor o igual a 150 mg dL<sup>-1</sup> hasta las horas de la tarde. Además, la prueba post-hoc mostró que no se presentaron diferencias significativas entre este grupo y el tratado con la insulina ( $p > 0.05$ ). Las glucometrías obtenidas el último día de tratamiento (3 p.m.) revelaron la existencia de diferencias significativas entre el grupo 3 (agua destilada) y los demás ( $p < 0.05$ ).

De acuerdo al comportamiento registrado desde el cuarto día a las 3:00 p.m. hasta el día 5 a las 8:00 a.m., se puede pensar que el efecto hipoglicemiante del extracto es acumulativo, prolongado y uniforme comparado con la insulina. Esta característica es favorable para dicho tratamiento (extracto de *Cordia alliodora*), pues aunque la insulina es un medicamento utilizado para este tipo de diabetes, puede también ocasionar shock hipoglicémico como consecuencia de marcadas fluctuaciones en los niveles de glicemia.

#### Pruebas comportamentales

Por otra parte, el test neurológico aplicado a los ratones se constituyó de pruebas de comportamiento innato y motivado. El examen clínico neurológico aprovecha la elevada regularidad y reproductibilidad de involuntariedad, reacciones innatas, la presencia o ausencia de la cual suministra una importante información sobre un amplio espectro de las funciones cerebrales (14).

Al inicio de la experimentación, el test permitió evidenciar respuestas notorias a los estímulos en la casi totalidad de los individuos (40), lo que significa que en su gran mayoría los ratones se encontraban en óptimas condiciones.

Dado que las respuestas más evidentes se notaron en la prueba de "movimiento de la cola", esta fue tomada como base de la explicación. En este test de sensibilidad se evidenció diferencia en porcentaje de respuesta notoria, entre el grupo control y los restantes, que a su vez se diferenciaron entre sí. El grupo tratado con extracto vegetal presentó diferencia porcentual al inicio y al final (30%) con respecto a los otros tratamientos.

Durante la experimentación los ratones aloxanizados mostraron ligeros descensos de peso corporal, el adelgazamiento se produce por la gran pérdida acuosa consecutiva a la glucosuria, que a veces alcanza cifras muy elevadas y al catabolismo tisular por la necesidad de otras fuentes de energía. De otra parte el grupo de ratones diabéticos

manifestó poliuria (necesidad de orinar con frecuencia) y polidipsia (sed intensa), manifestada por un incremento en el consumo de agua (de 200 mL/día al doble) por cada grupo.

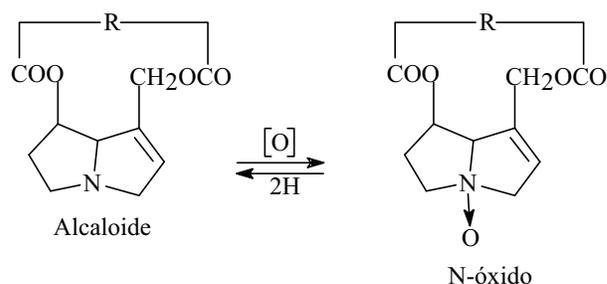
#### Pruebas post-mortem

En el modelo de diabetes tipo I inducida por aloxano, se pudo ver a nivel de páncreas, hipoplasia y homogeneidad de tipo celular en los islotes, evidenciada en los tres grupos aloxanizados; en el hígado se notó la presencia de una degeneración hidrópica, patología relacionada directamente con diabetes precoz y de evolución rápida. El origen de esta patología parece estar vinculado a la sobrecarga funcional de los islotes por la hiperglicemia producida. Se caracteriza por la formación de vacuolas en las células de los islotes con atrofia posterior de las mismas (15).

Se ha reportado, que algunos alcaloides aislados de extractos de *Catharanthus roseus* como la leurosina, la vindolina, la vindolinina y la catarantina han mostrado un débil efecto hipoglucemiante en ratas normales. Por su parte, las semillas de *Trigonella foenumgraecum* muestran un modesto efecto hipoglucémico en algunos modelos de animales diabéticos, pero son ineficaces en animales pancreatectomizados. Los efectos hipoglucemiantes han sido atribuidos a un alcaloide denominado trigonina. De igual forma, el extracto alcohólico de *Coccinia indica* disminuyó en un 50% las concentraciones basales de glucosa en conejos (dosis 1.25 g/Kg), aunque no se ha caracterizado todavía el alcaloide responsable de este efecto (3). Análogamente, podría pensarse que el efecto hipoglucemiante evidenciado por *C. alliodora*, bajo las condiciones experimentales de este estudio, podría deberse a su contenido de alcaloides.

De otra parte, es ampliamente aceptado que la diabetes genera estrés oxidativo provocado por radicales libres, especies químicas caracterizadas por ser muy reactivas, de ellas resultan de gran interés las especies reactivas derivadas del oxígeno entre las que se cuentan: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), el oxígeno singlete y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). (15). En modelos experimentales de inducción de diabetes con aloxano se demostró un aumento considerable de  $O_2^-$  (16). Se piensa que el radical  $OH^\cdot$  sería uno de los responsables del daño a las células endoteliales inducido por diabetes (9).

Adicionalmente, se conoce la capacidad que tienen los alcaloides de ser convertidos en N-óxidos (figura 4), la reacción es fácilmente reversada por agentes reductores. Los N-óxidos son altamente solubles en agua y son rápidamente excretados. La oxidación ocurre metabólicamente en ratas y en ovejas (17).



**Figura 4.** N-oxidación de un alcaloide

Entonces podría pensarse que la acción de *Cordia alliodora*, podría ser por disminución de la disfunción endotelial o tal vez su acción sea restauradora de la función endotelial, o quizá su efecto sea debido a un retraso en la degradación de la insulina o a un efecto facilitador de los efectos de la hormona. En cualquier caso, los alcaloides presentes en el vegetal jugarían papel importante.

Si se compara la acción del extracto vegetal objeto del interés de este estudio con el de la insulina se tendrían ventajas adicionales, ya que la acción del vegetal es estable y no presenta marcadas fluctuaciones en su actividad.

Nuestros resultados se convierten en un preámbulo al estudio clínico que permita evidenciar a qué nivel orgánico actúa *C. alliodora* en pacientes con diabetes insulino dependientes. Desde el punto de vista químico este estudio sería la antesala al aislamiento del sistema alcaloídico presente en la planta, así como también podría compararse la bioactividad de estos metabolitos aislados con el del extracto crudo.

## CONCLUSIONES

- El extracto vegetal de *Cordia alliodora* puede actuar como hipoglucemiante, reduciendo los niveles de glucosa en un promedio de 180.7 mg dL<sup>-1</sup> a 134.8 mg dL<sup>-1</sup> en ratones machos, línea ICR.
- La acción hipoglucemiante de *C. alliodora* puede atribuirse en principio a la presencia de alcaloides.

- Se reafirmó que el modelo de diabetes inducido por aloxano, desarrolla los aspectos histopatológicos y fisiológicos de la enfermedad.
- Se puede sugerir que el efecto hipoglicémico del extracto de *C. alliodora* es acumulativo, prolongado y uniforme en una dosis de 500 mg dL<sup>-1</sup>, al compararse con la insulina.
- El grupo de ratones tratado con agua destilada mostró gran diferencia porcentual en los niveles de glucosa, al compararse con los otros grupos, permitiendo suponer que la insulina y el extracto de nogal cafetero logran contrarrestar satisfactoriamente algunos trastornos ocasionados por la neuropatía diabética.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Comité Central de investigaciones y del Laboratorio de Parasitología y Enfermedades Tropicales de la universidad del Tolima. Las sugerencias de la Dra. Liliana Francis T. (profesora Universidad del Tolima.) son altamente apreciadas.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Domínguez, C.A. (1999). Diabetes mellitus. En: Revista de investigación clínica. Vol. 51, No 3 (may-jun.); p 11-13.
2. Farnsworth NR. (1993). Ethnopharmacology and future drug development: the North American experience. J. Ethnopharmacol; 51 (38): 145-52.
3. IV Congreso Internacional de Plantas Medicinales. (2001). Libro de Resúmenes. 4 al 6 de Octubre. Talca. Chile.
4. Gentry, A. H. (1993). A field guide to the families and genera of woody plants of northwest South America. The university of Chicago Press, p 896.
5. Boshier, D. (1997). *Cordia alliodora*: Genética y mejoramiento de árboles. United Kingdom: Oxford university Press, p 94.
6. Domínguez, X. (1973) Métodos de investigación fitoquímica. México: Centro regional de ayuda técnica; pp. 281.
7. Sanabria, G. (1983). Análisis fitoquímico preliminar. Universidad Nacional. Bogotá; pp. 113
8. Zúñiga J.; Tur Marí, J. A.; Milocco, S.N.; Piñero, R. (2001). Ciencia y tecnología en la protección y experimentación animal. Capítulo Biología general del reactivo biológico. McGraw-Hill.
9. Bustamante, S. E.; Muñoz, J.; Galardo, R.; Figueroa, H.; Morales, M.A. El extracto de *Vitis vinifera* revierte la disfunción vascular aortica inducida por diabetes en ratas. Sociedad Asturiana de Fitoterapia. Actas del III Congreso Internacional de Fitoterapia y Técnicas Afines. Ciudad de Oviedo. España. 22-24 de noviembre de 2002.
10. Vinod, K.; Augusti, KT. (1995). Insulin sparing action of a leucocyanidin derivative isolate from *Ficus bengalensis* L. Indian J. Biochem biophys; 45: 223-226,
11. Haslam, E. (1999). Che farò senza polifenoli? Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology, Edited by Gross et al. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, 15-40.
12. Pietta, P-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. Reviews. J. Nat. Prod. 63, 1035-1042
13. Corral Salvado, A.; De la Paz Naranjo, J. ; Evseeva, E.C.; Hernández Royero, R.; López Rodríguez, E. (1997). Tamizaje, tecnología, control de calidad y farmacología del extracto fluido de *Bougainvillea spectabilis* Willd. Rev Cubana Plant Med; 2(2-3):19-25.
14. Bures, J. (1983). Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. 2ed. Amsterdam: Elsevier science publisher, p. 77-86.
15. Anatomía Patológica del órgano insular (2000). www.smu.org.uy/publicaciones/libros/historicos/dm/cap8.
16. Céspedes, M. E.; Hernández, L. I. y Llopiz, J. N. (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. Rev Cubana Invest Biomed vol 15 (2).
17. Harborne, J.B. Phytochemical Ecology (1972). Academic Press INC. (London) LTD. pp.272.

Fecha de Recibo: Febrero 25 de 2004

Fecha de Aceptación: Marzo 30 de 2004

Mediante resolución del Ministerio de Educación Nacional número 1177 del 4 de mayo de 2004, se autoriza por 7 años el registro calificado al programa de Tecnología de Alimentos en la sede del Municipio de Envigado.