



# INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

---

**RESIDENCIA PROFESIONAL**

**INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

“EFECTO DE LUZ ULTRAVIOLETA EN CONCENTRACIONES DE FENOLES  
Y TERPENOS EN HOJA DE NEEM (*Azadirachta Indica*; A.Juss 1830)”

**PRESENTA**

ELIZABETH HERNÁNDEZ GUILLEN

**ASESOR**

DR. JOAQUÍN ADOLFO MONTES MOLINA

**REVISORES**

QFB. DULCE MA. HERNÁNDEZ BERISTAIN

DR. ROCÍO GORDILLO MEZA

## ÍNDICE GENERAL

CAP	CONTENIDO	Pág.
<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>II</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	7
<b>III</b>	<b>OBJETIVO</b>	7
3.1	Objetivo general	7
3.2	Objetivo específico	7
<b>IV</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL AREA DONDE SE DESARROLLO EL PROYECTO</b>	7
4.1	<b>misión</b>	7
4.2	<b>visión</b>	7
4.3	<b>Localización</b>	7
4.3.1	<b>Edificio j</b>	8
<b>V</b>	<b>PROBLEMAS A RESOLVER</b>	8
<b>VI</b>	<b>ALCANCES Y LIMITACIONES</b>	8
<b>VII</b>	<b>FUNDAMENTO TEORICO</b>	9
7.1	Radiación solar	9
7.2	Efecto uv-b sobre enzimas del ciclo de Calvin	10
7.3	Efecto de la radiación ultra violeta-b sobre el metabolismo secundario	10
7.4	Compuestos fenólicos	11
7.4.1	Flavonoides	13
7.5	Clasificación de flavonoides	14
7.6	Funciones en las plantas fenólicos	15
7.7	Neem ( <i>A. Indica</i> )	16
7.8	Toxicidad del Neem ( <i>A. Indica</i> )	17
<b>VIII</b>	<b>PROCEDIMIENTO</b>	18
8.1	Obtención de los extracto metanólicos	18
8.2	Obtención de los extractos acuoso	18
8.3	Preparación de curva de calibración con ácido gálico	19
8.4	Preparación de curva de calibración con Quercetina	19
8.5	Determinación de Fenoles en muestra	20
8.6	Determinación de Flavonoides en muestra	21
<b>IX</b>	<b>RESULTADOS Y GRAFICAS</b>	22
9.1	Curva de calibración para la determinación de fenoles.	22
9.2	Análisis estadístico de concentración de fenoles en hojas verdes a los 120 min sin luz ultravioleta.	22
9.3	Análisis estadístico de concentración de fenoles en extracto acuoso concentrado a los 120 min de exposición a la luz ultra violeta.	23
9.4	Análisis estadístico de concentración de fenoles en extracto metanólico seco concentrado a los 120 min sin exposición a la luz ultra violeta.	24
9.5		

9.6	Análisis estadístico de concentración de fenoles en extracto metanólico seco concentrado a los 120 min con exposición a la luz ultra violeta.	25
9.7	Curva de calibración para la determinación de flavonoides	26
9.8	Análisis estadístico de concentración de flavonoides en extracto acuoso verde diluido a los 120 min con exposición a la luz ultra violeta	26
9.9	Análisis estadístico de concentración de flavonoides en extracto acuoso verde sin exposición de luz ultravioleta en treinta minutos	27
9.10	Análisis estadístico de concentración de flavonoides en extracto metanolico seco con exposición de luz ultra violeta en treinta minutos	28
9.11	Análisis estadístico de concentración de flavonoides en extracto metanolico seco sin exposición de luz ultra violeta en treinta minutos	29
9.12		
<b>X</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	29
<b>XI</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	30
<b>XII</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

N° Fig.	Contenido	Pág.
1	Esquema de la biosíntesis de poli fenoles en plantas	11
2	Ruta del ácido shikímico.	12
3	Estructura de un flavonoide.	13
4	Estructura molecular de los flavonoides	15
5	Estructura de los principales tipo de flavonoides	15
6	Árbol de Neem , flores y semillas	16
7	Curva de calibración de ácido gálico	22
8	Análisis estadístico de las concentraciones de fenoles en los tratamientos acuosos concentrado y diluido sin luz ultra violeta.	22
9	Análisis estadístico de las concentraciones de fenoles en los tratamientos acuosos concentrado y diluido con luz ultra violeta	23
10	Análisis estadístico de las concentraciones de fenoles en los tratamientos metanólicos concentrado y diluido sin luz ultra violeta	24
11	Análisis estadístico de las concentraciones de fenoles en los tratamientos metanólicos concentrado y diluido con luz ultra violeta.	25
12	Curva de calibración para cuantificación espectrofotométrica de Quercetina a 415 nm.	26
13	Análisis estadístico de las concentraciones de flavonoides en los tratamientos acuosos verde con luz ultra violeta.	26
14	Análisis estadístico de las concentraciones de flavonoides en los tratamientos acuosos verde sin luz ultra violeta.	27
15	Análisis estadístico de las concentraciones de flavonoides en los tratamientos metanólicos secas con luz ultra violeta.	28
16	Análisis estadístico de las concentraciones de flavonoides en los tratamientos metanólicos secas sin luz ultra violeta.	29

## INDICE DE CUADROS

N° Cuadro	CONTENIDO	Pág.
1	Tratamientos acuosos y metanolicos de fenoles concentrados y diluidos	20
2	Tratamientos acuosos y metanolicos de flavonoides concentrados y diluidos.	21

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

Las hojas de Neem (*A. indica*; A.Juss 1830) desde la antigüedad ha sido utilizado como bioinsectidas, en la medicina elaboración de remedios caseros contra diversos padecimientos (Chopra 1956) (Chatterjee and Pakrashi, 1994).

Estudios ya hechos sabemos que las hojas de Neem contienen metabolitos secundarios como en muchas de las mayorías de las plantas, tales como los compuestos fenólicos o polifenoles, que constituyen un amplio grupo de sustancias químicas de 8,000 compuestos distintos, con diferentes estructuras químicas y diferentes actividades biológicas. La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuestos que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular (Martínez- Valverde et al., 2000). Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados como mecanismos de defensa [Balasundram et al., 2006]

Sin embargo la radiación ultra violeta es uno de los factores que afectan al crecimiento y función de las plantas.

Para ello en este presente trabajo el objetivo es conocer el efecto de luz ultra violeta en fenoles y flavonoides en las hojas de Neem, por lo que se realizó dos tratamientos diferentes, tales, como el extracto acuoso con hoja verde y el extracto como disolvente metanol con hojas secas, tomando una concentración al cien por ciento y la otra diluida, con y sin exposición de luz ultra violeta con tiempos de ciento veinte minutos.

Los tratamientos irradiados con luz ultra violeta en tiempos estudiados presentaron un aumento un nivel de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en concentraciones superiores respecto de las muestras no tratadas con luz ultra violeta.

## **CAPITULO II**

### **JUSTIFICACIÓN**

Las plantas generan metabolitos secundarios como atrayentes de defensores de insectos o del medio ambiente, una de estos son los fenoles y flavonoides, pero estos no sabemos si son afectados por la luz ultra violeta, la cual va aumentando cada día por la contaminación ambiental por la ruptura de la capa de ozono, por lo que el objetivo del presente trabajo es demostrar el efecto de este rango de radiación en las hojas de Neem ( *Azadirachta indica*) la que se está utilizando como bioinsecticida y podrían ser degradados estos compuestos que contienen el extracto antes mencionados.

## **CAPITULO III**

### **OBJETIVOS**

#### 3.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de luz ultra violeta sobre concentraciones de fenoles y flavonoides en hojas de Neem (*A. indica*; A. Juss 1830)

#### 3.2 Objetivo específico

- Evaluar los efectos de luz ultra violeta en hoja seca y fresca de Neem (*A. indica*; A. Juss 1830).

## **CAPITULO IV**

### **CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE DESARROLLO EL PROYECTO**

#### 4.1 Misión

Formar de manera integral profesionales de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

#### 4.2 Visión

Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste comprendido con el desarrollo socio-económico sustentable de la región.

#### 4.3 Localización

Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

Carretera Panamericana

Kilómetro 1080, Terán 29050; Tuxtla Gutiérrez, Chiapas



4.3.1 Edificio J (laboratorio de biotecnología).



## **CAPITULO V**

### **PROBLEMAS A RESOLVER**

Mediante la realización de este estudio de busca determinar en las hojas de Neem (A. Indica) a los fenoles y flavonoides presentes como metabolitos secundarios.

Determinar las concentraciones de fenoles y flavonoides que contienen las hojas antes y después de ser expuestas a la luz ultra violeta.

## **CAPITULO VI**

### **ALCANCES Y LIMITACIONES**

El proyecto pretende realizar extractos acuosos que son hechas con hojas de Neem verdes, extractos metanolicos con hojas secas. Utilizando cantidades pequeñas expresadas en micro litros, y hacer concentraciones diferente tanto



como concentrados y diluidos, en tiempos diferentes colocándolo en la campana de luz ultravioleta y obtener lecturas en el espectro de luz fotométrico.

Una vez obteniendo los resultados es posible saber que los fenoles tienden a aumentar su concentración con exposición de luz ultra violeta y en flavonoides estos tienden a disminuir.

Una de las limitaciones es de transportarse de un laboratorio a otro, para hacer el tratamiento de extracto de hoja seca como disolvente el metanol, ya que al trasladarse es riesgoso para la muestra por la exposición a los rayos de sol, así también el no realizar las muestras en terpenos.

## **CAPITULO VII**

### **FUNDAMENTO TEORICO**

#### 7.1 Radiación solar

La radiación solar es uno de los principales factores ambientales que afectan la vida en nuestro planeta. Esta radiación controla el funcionamiento de los ecosistemas terrestres y acuáticos tanto a través del control de procesos fotobiológicos (fotosíntesis, fotoperiodo, fototropismos, etc.) Como por medio de su acción sobre otros factores ambientales (temperatura, humedad, etc.) Y ciclos naturales (ciclos diarios, anuales, hídricos, etc.) Que finalmente inciden en la distribución de los organismos.

La radiación que llega a la Tierra abarca una amplia gama del espectro electromagnético y aproximadamente el 40% de ella es la que conocemos como luz o radiación visible. Esta comprende longitudes de onda que van de los 400 a los 700 nm, rango que abarca los colores violeta, azul, verde, amarillo, naranja y rojo y que por ser usado por los vegetales en el proceso de la fotosíntesis, también se le denomina radiación fotosintéticamente activa o PAR (sigla derivada del inglés: photosynthetic active radiation).

Para que la radiación ultra violeta-B sea interceptada y produzca alteraciones en la fisiología de la planta debe penetrar en la hoja y ser absorbida por cromóforos o moléculas susceptibles al efecto dañino de esta radiación. Por lo tanto, los cambios morfológicos y anatómicos que son inducidos por la radiación ultravioleta-B pueden llegar a ser determinantes en las respuestas de las distintas especies vegetales sometidas a un aumento de este tipo de radiación. Así, frente a un aumento de la radiación ultra violeta-B muchos de los cambios observados, tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, son principalmente atribuidos a la orientación de las hojas que tiene cada uno de estos grupos de plantas, lo que finalmente influirá en la capacidad de interceptar este tipo de radiación. Las

especies monocotiledóneas que presentan hojas delgadas con orientación vertical interceptan menos la radiación ultravioleta-B que las dicotiledóneas por presentar éstas hojas anchas y de orientación más bien horizontal, y por lo tanto son más susceptibles al daño [He, J. et al,1993]. Por tal motivo, las plantas monocotiledóneas parecen ser generalmente más tolerantes a niveles elevados de radiación UV-B.

## 7.2 Efecto de luz ultra violeta-b sobre enzimas del ciclo de Calvin

Distintas investigaciones han informado que la radiación UV-B induce la pérdida de actividades enzimáticas del ciclo de Calvin, con especial énfasis en la disminución directa de la enzima ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (Rubisco) que cataliza la incorporación de CO<sub>2</sub> en el ciclo de Calvin (Jordán, 1992). Alien y colaboradores, en 1997, demostraron que la radiación UV-B disminuye la tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> en hojas maduras de *Brassica napus* y que de acuerdo al modelo de Von Caemmerer y Farquhar (Von and Farquhar., 1981), la disminución de la tasa neta de asimilación de CO<sub>2</sub> medida en condiciones de saturación luminosa (Asat) es acompañada por la disminución de la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco (Vcmax), resultados que fueron confirmados por medio de ensayos in vitro de actividad Rubisco (Allen et al, 1997).

La disminución de la actividad y cantidad de Rubisco inducida por luz ultravioleta-B ha sido informada por distintos investigadores (Cv et al, 1982) (Strid et al, 1990).

La disminución de la actividad de la enzima Rubisco en condiciones de radiación UV-B es atribuida en la mayoría de los casos a una baja disponibilidad de sustrato ribulosa-1,5-bisfosfato, que ocurre a causa de la disminución de la velocidad máxima del transporte de electrones, proceso que limita la disponibilidad de NADPH y ATP requeridos en la síntesis de ribulosa-1,5-bisfosfato (Liu et al, 1995).

Otra acción atribuida a la radiación UV- B es la inducción de senescencia a través de la activación de proteasas específicas como ubiquitinas que degradarían las enzima del ciclo de Calvin (Hidema and kumagai 2006) (Brosché et al, 2002.) (Brosché 1999).

## 7.3 Efecto de la radiación de luz ultra violeta-b sobre el metabolismo secundario

Uno de los mecanismos de adaptación a radiación ultra violeta-B más documentado es el aumento de la producción de metabolitos secundarios tales como fenoles y flavonoides, los que se acumulan en las células de la epidermis de diversas especies vegetales, y por ser compuestos que absorben radiación entre los 280-360 nm, reducen el efecto deletéreo de la luz UV-B sobre los distintos componentes celulares [Rozema et al, 2002].

## 7.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas de 8,000 compuestos distintos, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y diferentes actividades biológicas. La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales, varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuestos que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular (Martínez-Valverde et al., 2000). Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados como mecanismos de defensa [Balasundram et al., 2006]

Los compuestos fenólicos son biosintetizados en diferentes rutas metabólicas que Hrazdina en 1992, menciona a los compuestos aromáticos vegetales, existentes: la ruta ácido shikímico convierte los precursores de carbohidratos derivados de la glicolisis y de la ruta de las pentosas fosfatos en aminoácidos (figura 1); y la vía del ácido malónico, aunque es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero poco empleada en plantas superiores. La ruta del ácido shikímico está presente en las plantas, hongos, bacterias pero no en animales, ya que no son capaces de sintetizar los aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano.

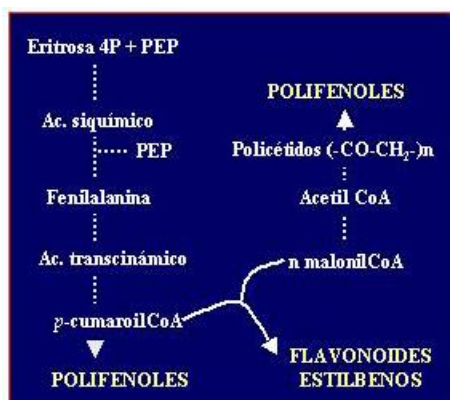


Figura 1. Esquema de la biosíntesis de polifenoles en plantas.

Uno de estos productos de esta vía es la fenilalanina por la eliminación de una molécula de amonio para formar ácido cianimico. Esta reacción está catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL).

La acción del PAL (Singh et al, 2010) es fundamental para la vida de las plantas y por ello está estrictamente modulada. Entre otros factores, esta enzima es activada por la luz, y depende además de la concentración de diferentes

hormonas vegetales. También, en general, la actividad PAL aumenta cuando a los vegetales se les somete a situaciones de estrés, como la falta de agua, infecciones fúngicas o bacterianas y radiaciones ultra violeta. Otro factor que activa la enzima PAL es el frío, y por ello, las plantas sometidas a bajas temperaturas suelen presentar coloraciones rojizas en tallos y hojas. También es conocido que al florecer las plantas en primavera que siguen a inviernos muy fríos, las flores desarrollan colores muy intensos.

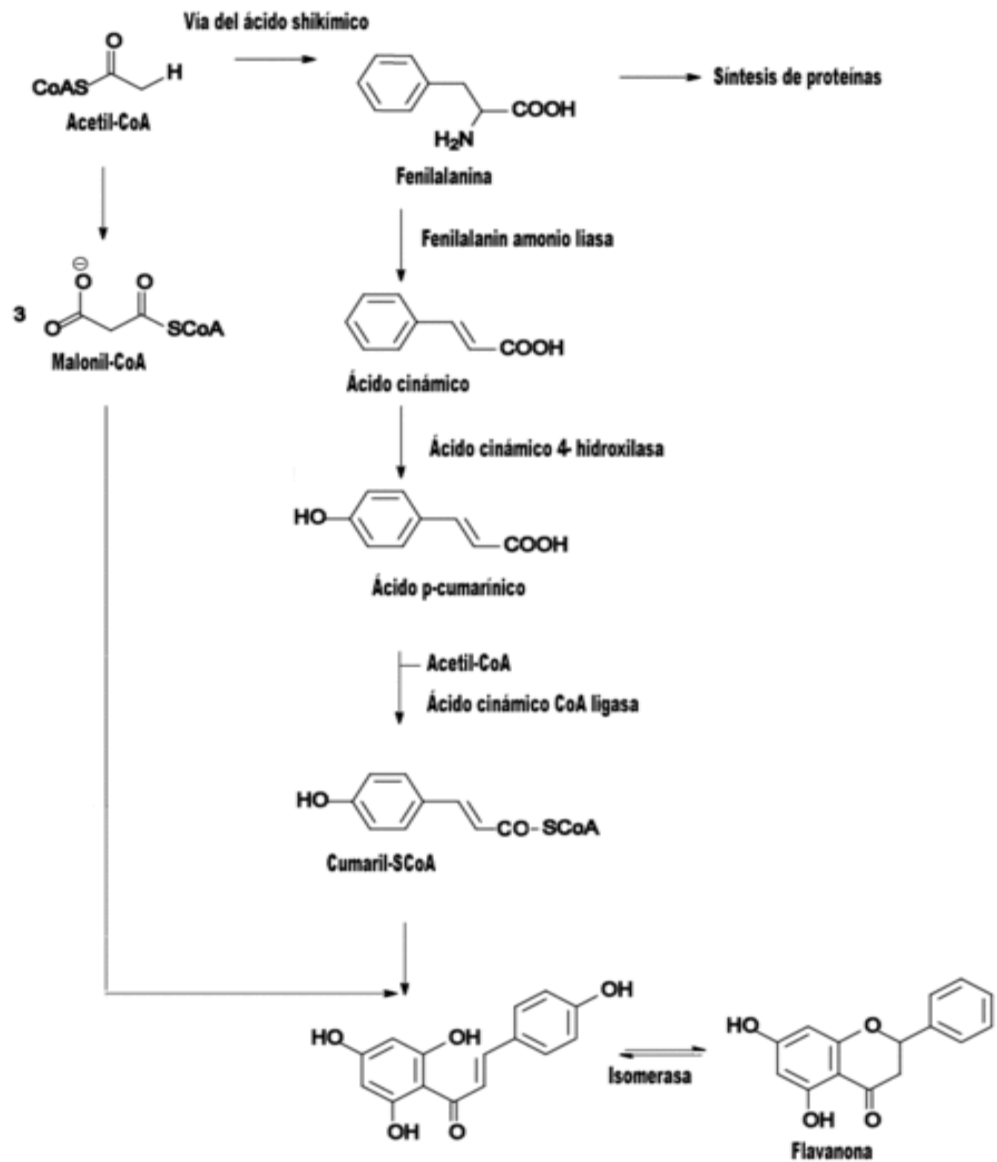


Figura 2. Ruta del ácido shikímico: desaminación de fenilalanina y formación de ácidos cinámico y cumárico, precursores de lignina, flaonas, isoflavonas y flavonoides.

De toda esta diversidad de compuestos fenólicos vegetales, los flavonoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) son los que tiene la distribución más amplia dentro del reino vegetal (Markham, 1982) y son los más abundantes y diversos. De manera natural los flavonoides pueden encontrarse en dos formas, unidos a un glicósido o sin un residuo de azúcar en su molécula.

## 7.5 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos (Schieber et al, 2001) C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (fig. 3). Sin embargo pueden sufrir muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales.

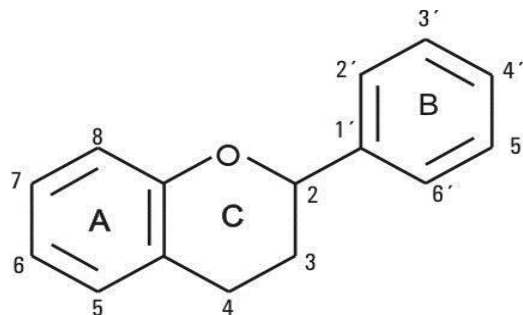


Figura 3. Estructura de un flavonoide.

Los flavonoides se biosintetizan en todas las "plantas terrestres" o embriofitas, y también en algunas algas Charophyta (Cache W.2000-2003), y aunque todas las especies comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente. Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares. Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas funciones son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxones. Como ejemplo de funciones universales, los flavonoides son

responsables de la resistencia de las plantas a la foto-oxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de la hormona auxina, y se cree que funcionan como defensa ante el herbivorismo. Una función importante cumplida en muchas plantas es la atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores. (Lunau 1992)

#### 7.5.1 Las principales clases de flavonoides son:

- **Chalcona:** Están implicadas en la estimulación de la polinización gracias a que inducen el desarrollo de colores en el espectro de lo visible y en la luz ultravioleta que atraen a insectos (mariposas y abejas).
- **Flavonas:** son amarillas y pueden estar en algunas flores, como en la primula, dándoles un color amarillo a sus pétalos, o en frutos, como en la piel de las uvas y son las responsables del color amarillento de los vinos blancos.
- **flavonoles:** suelen ser incoloros o amarillos y se encuentran en las hojas y en muchas flores. Los más importantes son tres: la Quercetina, es el flavonol amarillo del polen de muchas fagáceas (*Quercus sp.*); la miricetina, presente en la uva; y el kaempferol, presente en las inflorescencias y las protege de la luz ultravioleta. La Fisetina es un flavonol que se extrae de la planta del género *Amphipterygium*.
- **Flavanonas:** son precursores de otros flavonoides más complejos, pero se encuentran como tales en altas concentraciones en los cítricos. Las más importantes son naringenina, presente en el zumo de naranja, limón o pomelo, dándole un sabor amargo; liquiritigenina, presente en el regaliz; y eriodictiol, se presenta en el guisante actuando como quimioatrayente para interactuar con agrobacterias.
- **Las antocianinas:** son los pigmentos hidrosolubles presentes en el líquido vacuolar de las células responsables de la mayoría de las coloraciones rojas, azules y violetas de las flores y hojas (Francisco A.T. et al, 1994)

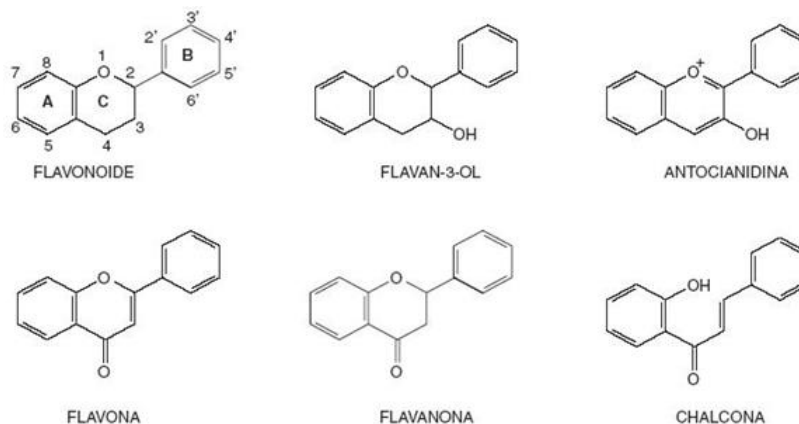


Figura 4. Estructura molecular de los flavonoides.

1. Flavanos, como la catequina (figura 5), con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la Quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. (Quijano et al 1982)

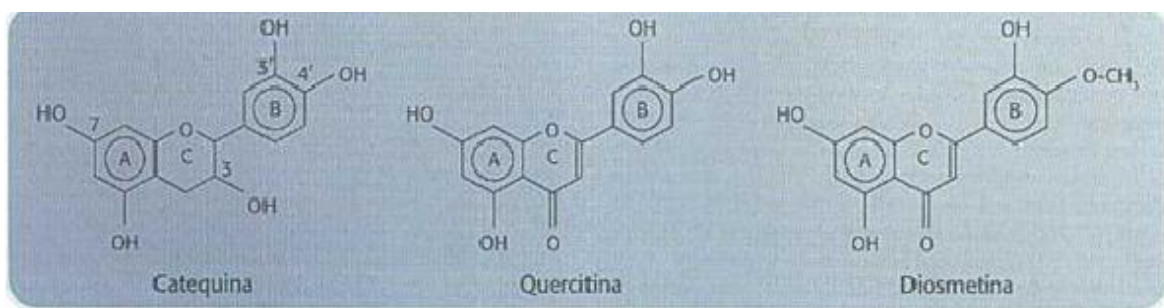


Figura 5. Estructura de los principales tipo de flavonoides

## 7.6 Funciones en las plantas

- Protección ante la luz ultra violeta. Los flavonoides incoloros suelen acumularse en las capas más superficiales de las plantas y captan hasta el 90% de las radiaciones de luz ultra violeta, impidiendo los efectos nocivos de estas radiaciones en los tejidos internos.
- Defensa ante el herbivorismo. Algunos flavonoides como los taninos, protegen a las plantas generando sabores desagradables para los herbívoros, principalmente amargos, o texturas que pueden resultar desagradables para los herbívoros, que se ven estimulados a elegir otras plantas.
- Regulación del transporte de la hormona auxina. Las plantas mutantes que no poseen la enzima chalcona sintasa, que forma parte de la vía biosintética de los flavonoides, muestran un crecimiento irregular debido a

una deficiencia en el transporte de auxina a través de la planta (Bors et al, 1990).

### 7.7 Neem

El Neem (*Azadirachta Indica*; A.Juss 1830) se conoce desde hace más de 2000 años como una de las plantas medicinales más versátiles, teniendo un amplio espectro de actividad biológica (Biswas et al., 2002). Es un árbol tropical siempre verde (Figura 6), de la familia Meliaceae y de la subfamilia Meloideae (Girish et al., 2008).



a) Árbol de Neem b) flores c) semillas

Figura 6. a) Árbol de Neem b) flores c) semillas.

El árbol de Neem es nativo de la zona Este de la India y Burma, crece al Sureste de Asia y Oeste de África; algunos árboles recientemente se plantaron en el Caribe, muchos países de Centroamérica y México. El árbol de Neem se introdujo a México por Baja California Sur en 1989, por un grupo de productores privados dedicados a la horticultura orgánica en San José del Cabo (Osuna, 2000) (Leos and Salazar, 2002). En 1992 se introdujo al Valle Yaqui, Sonora (Moreno 1996). A partir de 1994, los árboles se plantaron en otros estados, como; Baja California Sur, Sinaloa, Sonora, Nayarit, Colima, Campeche, San Luis Potosí, Guerrero, Quintana Roo, Yucatán, Nuevo León, Veracruz, Oaxaca, Morelos, Chiapas, Guanajuato, Tabasco, Tamaulipas y Durango, dentro de los más importantes (Cruz, 1998; INIFAP, 1999).

Desde la antigüedad, todas las partes del árbol de Neem se han utilizado para la elaboración de remedios caseros contra diversos padecimientos (Chopra 1956) (Chatterjee and Pakrashi, 1994), tanto las hojas, el fruto y la corteza (figura 6). El aceite de Neem y el extracto de corteza y hojas (Thakur et al., 1981), se utilizan como terapéuticos para padecimientos como la lepra, helmintiasis intestinal, desordenes respiratorios, constipación, así como del mejoramiento de la salud en general (Basu et al., 1931). El aceite de Neem también presenta varios usos en



infecciones de la piel (Chopra 1956). La corteza, las hojas, la raíz, las flores y el fruto, al mezclarse curan la mórbida sanguínea, afecciones biliares, prurito, úlceras en piel y ardor (Mitra et al., 1963). Entre otras propiedades conferidas al árbol de Neem, se encuentra su capacidad como antiséptico, cicatrizante y contra enfermedades de la piel (Kirtikar and Basu, 1931) (Biswas et al., 2002). También se ha revelado que la parte soluble en agua del extracto alcohólico de las hojas, posee importantes propiedades antiinflamatorias, antiserotonina, anticonceptivas y actividad hepatoprotectora (Chattopadhyay et al., 1986, 1987a, 1992, 1993), actividad hipolipidémica en ratas alimentadas con dieta aterogénica, antihiperlipémica así como actividad hipotensora (Chattopadhyay et al., 1987b; Chattopadhyay, 1995, 1997).

#### 7.8 Toxicidad del Neem (*A. Indica*; A.Juss 1830)

Entre los usos y aplicaciones de los extractos de Neem está su empleo como pesticida e insecticida, debido a las restricciones que existen por los químicos sintéticos que han sido identificados como altamente tóxicos o peligrosos, y por su alto espectro, ya que se sabe puede usarse como larvicida, acaricida y nematocida. Se ha observado que los extractos etanólicos de las semillas de Neem, protegen de pestes a los granos, durante el almacenamiento (Dunkel et al., 1995). El aceite de las semillas y las fracciones volátiles, tienen efectos adversos en el ciclo gonadotrófico y la ovoposición de las hembras de *Anopheles stephensi* y *Anopheles culicifacies*, afectando la vitelogenénesis (Dhar et al., 1996). También se ha demostrado toxicidad oral de extracto metanólico de hojas de Neem en ratones (Kanungo, 1996), se identificaron signos de enfermedad y malestar, espasmos gastrointestinales, apatía, hipotermia y convulsiones terminales, lo que llevó a la muerte de estos.

## CAPITULO VIII

### **METODOLOGIA**

Para la cuantificación de fenoles y flavonoides se utilizaron hojas de Neem (*A. Indica*) recolectadas de dos árboles que están ubicadas en el instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez colectado en el periodo de floración y fructificación (julio-agosto 2013). Se utilizaron hojas frescas para el tratamiento acuoso y hojas secas para tratamientos utilizando como solvente el metanol.

#### 8.1 Obtención de los extractos metanolicos

Se escogieron dos árboles ubicados en ITTG tomando de cada árbol 500 gr de hojas, eliminando el polvo con un lavado con agua potable; dejándolo remojar en agua que contiene 1 % de hipoclorito de sodio para esterilizar por un periodo de

10 minutos y haciendo tres lavados para eliminar el excedente de hipoclorito. De estas hojas solamente se tomó la cantidad de 50 g para ser colocadas en sobres hechas de papel estraza para su secado y sin contacto de luz en un aproximado de 15 días, por consiguiente las hojas son pulverizadas en una licuadora convencional (Osterizer, México) para obtener 20 gr de muestra, así mismo colocando la muestra en un matraz volumétrico de 250 ml donde fueron adicionados 450 ml de metanol. Mezclando por 15 min y se dejando reposar durante 24 h. La mezcla se sónico durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se filtró (Whatman No. 40), y posteriormente se centrifugo a 3000 rpm a 20 °C durante 10 min. El sobrenadante se colocó en un rota vapor (Buchí R-205, Suiza) para remover el solvente y así obtener el extracto, por ultimo resuspender en 100 ml de metanol para su almacenamiento a -20°C hasta su uso (Chang and Chern, 2002).

## 8.2 Obtención de los extractos acuoso

Se escogieron dos árboles ubicados en ITTG tomando de cada árbol 500 gr de hojas, eliminando el polvo con un lavado con agua potable; dejándolo remojar en agua que contiene 1 % de hipoclorito de sodio para esterilizar por un periodo de 10 minutos y haciendo tres lavados para eliminar el excedente de hipoclorito. Se pesaron 50 g de hoja fresca, se colocó en un vaso de precipitado de 1000 ml y se le adicionó 200 ml de agua destilada dejando remojar por 24 h. Al transcurrir el lapso de tiempo se trituró en una licuadora (Osterizer, México) durante 30 segundos y la solución se filtró 2 veces (Whatman No. 1), colocando en un frasco color ámbar para protegerlo de la luz. (Quevedo et al, 2010)

## 8.3 Preparación de curva de calibración con ácido gálico.

Se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de 200 µL a 2000 µL en intervalo de 200 µL y se completo el volumen de cada uno de 1800 µL a 0 µL de agua destilada (figura 7).

## 8.4 Preparación de curva de calibración con Quercetina.

Se utilizó una solución estándar de Quercetina (0.1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de 200 µL a 2000 µL en intervalo de 200 µL y se completo el volumen de cada uno de 1800 µL a 0 µL de etanol al 95 % (Figura 12).

## 8.5 Determinación de fenoles en una muestra.

La determinación se realizó de acuerdo el método Folin-Ciocalteu (Slinkard and Singleton 1977). Se tomaron 30 µl de muestra (metanolico y acuoso) y se le adicionaron 2.1 ml de agua destilada y 250 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu. Posteriormente, se le adicionaron 450 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% y nuevamente se le

agrego 2.1 ml de agua destilada, dejando reposar por 2 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro uv-visible a longitud de onda a 765 nm (cuadro 1). Los resultados se expresaron en mg equivalente de ácido gálico por g de muestra.

#### 8.6 Determinación de Flavonoides en muestra

La determinación se realizó de acuerdo al método de Zhishen ( Zhishen *et al.*, 1999). Se tomaron 500 µl de muestra (metanólico y acuoso) y se le adicionaron 1.5 ml de etanol al 95 %, 100 µl de AlCl<sub>3</sub> al 10% y se adicionaron 100 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> seguida de 2.8 ml de agua destilada. Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro uv-visible a longitud de onda de 415 nm (cuadro 2). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de (+) catequina por g de muestra.

Cuadro1. Tratamientos acuosos y metanolicos de fenoles concentrados y diluidos

tratamientos de fenoles	abreviatura
extracto acuoso verde sin luz uv en 30 min	eac-v-s-t
extracto acuoso verde sin luz uv en 60 min	eac-v-s-s
extracto acuoso verde sin luz uv en 90 min	eac-v-s-n
extracto acuoso verde sin luz uv en 120 min	eac-v-s-c
extracto acuoso verde con luz uv en 30 min	eac-v-c-t
extracto acuoso verde con luz uv en 60 min	eac-v-c-s
extracto acuoso verde con luz uv en 90 min	eac-v-c-n
extracto acuoso verde con luz uv en 120 min	eac-v-c-c
extracto acuoso verde sin luz uv en 30 min diluido	eac-v-s-t-d
extracto acuoso verde sin luz uv en 60 min diluido	eac-v-s-s-d
extracto acuoso verde sin luz uv en 90 min diluido	eac-v-s-n-d
extracto acuoso verde sin luz uv en 120 min diluido	eac-v-s-c-d
extracto acuoso verde con luz uv en 30 min diluido	eac-v-s-t-d
extracto acuoso verde con luz uv en 60 min diluido	eac-v-c-s-d
extracto acuoso verde con luz uv en 90 min diluido	eac-v-c-n-d
extracto acuoso verde con luz uv en 120 min diluido	eac-v-c-c-d
extracto metanolico seco sin luz uv en 30 min	em-s-s-t
extracto metanolico seco sin luz uv en 60 min	em-s-s-s
extracto metanolico seco sin luz uv en 90 min	em-s-s-n
extracto metanolico seco sin luz uv en 120 min	em-s-s-c
extracto metanolico seco con luz uv en 30 min	em-s-c-t
extracto metanolico seco con luz uv en 60 min	em-s-c-s
extracto metanolico seco con luz uv en 90 min	em-s-c-n
extracto metanolico seco con luz en 120 min	eac-s-c-c
extracto metanolico seco sin luz uv en 30 min diluido	em-s-s-t-d
extracto metanolico seco sin luz uv en 60 min diluido	em-s-s-s-d
extracto metanolico seco sin luz uv en 90 min diluido	em-s-s-n-d
extracto metanolico seco sin luz uv en 120 min diluido	em-s-s-c-d
extracto metanolico seco con luz uv en 30 min diluido	em-s-c-t-d
extracto metanolico seco con luz uv en 60 min diluido	em-s-c-s-d
extracto metanolico seco con luz uv en 90 min diluido	em-s-c-n-d
extracto metanolico seco con luz uv en 120 min diluido	em-s-c-c-d

Cuadro 2. Tratamientos acuosos y metanolicos de flavonoides concentrados y diluidos.

tratamientos de flavonoides	abreviatura
extracto acuoso verde sin luz uv en 30 min	eac-v-s-t
extracto acuoso verde sin luz uv en 60 min	eac-v-s-s
extracto acuoso verde sin luz uv en 90 min	eac-v-s-n
extracto acuoso verde sin luz uv en 120 min	eac-v-s-c
extracto acuoso verde con luz uv en 30 min	eac-v-c-t
extracto acuoso verde con luz uv en 60 min	eac-v-c-s
extracto acuoso verde con luz uv en 90 min	eac-v-c-n
extracto acuoso verde con luz uv en 120 min	eac-v-c-c
extracto acuoso verde sin luz uv en 30 min diluido	eac-v-s-t-d
extracto acuoso verde sin luz uv en 60 min diluido	eac-v-s-s-d
extracto acuoso verde sin luz uv en 90 min diluido	eac-v-s-n-d
extracto acuoso verde sin luz uv en 120 min diluido	eac-v-s-c-d
extracto acuoso verde con luz uv en 30 min diluido	eac-v-c-t-d
extracto acuoso verde con luz uv en 60 min diluido	eac-v-c-s-d
extracto acuoso verde con luz uv en 90 min diluido	eac-v-c-n-d
extracto acuoso verde con luz uv en 120 min diluido	eac-v-c-c-d
extracto metanolico seco sin luz uv en 30 min	em-s-s-t
extracto metanolico seco sin luz uv en 60 min	em-s-s-s
extracto metanolico seco sin luz uv en 90 min	em-s-s-n
extracto metanolico seco sin luz uv en 120 min	em-s-s-c
extracto metanolico seco con luz uv en 30 min	em-s-c-t
extracto metanolico seco con luz uv en 60 min	em-s-c-s
extracto metanolico seco con luz uv en 90 min	em-s-c-n
extracto metanolico seco con luz en 120 min	eac-s-c-c
extracto metanolico seco sin luz uv en 30 min diluido	em-s-s-t-d
extracto metanolico seco sin luz uv en 60 min diluido	em-s-s-s-d
extracto metanolico seco sin luz uv en 90 min diluido	em-s-s-n-d
extracto metanolico seco sin luz uv en 120 min diluido	em-s-s-c-d
extracto metanolico seco con luz uv en 30 min diluido	em-s-c-t-d
extracto metanolico seco con luz uv en 60 min diluido	em-s-c-s-d
extracto metanolico seco con luz uv en 90 min diluido	em-s-c-n-d
extracto metanolico seco con luz uv en 120 min diluido	em-s-c-c-d

## CAPITULO IX

### RESULTADOS Y GRAFICAS.

#### 9.1 Curva de calibración para la determinación de fenoles.

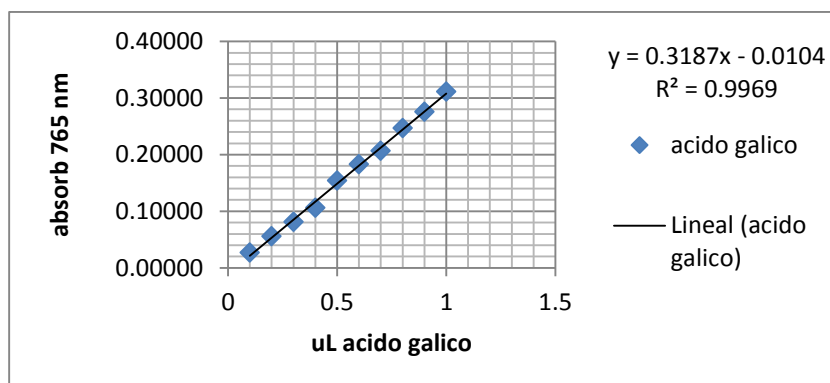


Figura 7. Ilustración la Curva de calibración para cuantificación espectrofotométrica de ácido gálico a 765 nm.

Para la curva de calibración se realizó por triplicado con diferentes concentraciones. El contenido de fenoles de cada extracto es expresado en mg/g de peso seco de la hoja de Neem, basándose en la curva de calibración del material de referencia de ácido gálico, de ahí que se utilice el término “Unidades de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto o materia vegetal desecada”.

#### 9.2 Análisis estadístico de concentración de fenoles en hojas verdes concentrado sin exposición de luz ultra violeta con un tiempo de ciento veinte minutos.

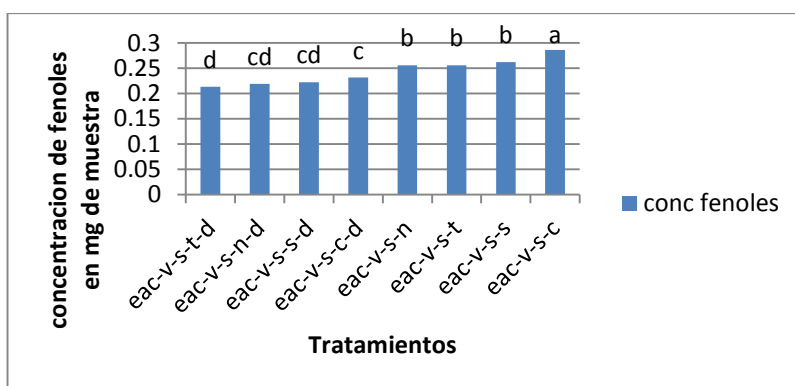


Figura 8. Representa el análisis estadístico de las concentraciones de fenoles en los tratamientos acuosos concentrado y diluido sin luz ultra violeta, utilizando el programa statgrafic con prueba de tukey 95% de probabilidad, letras iguales no hay diferencia significativa.

El análisis estadístico de la concentración de fenoles, en el extracto acuoso de hojas frescas Neem (*Azadirachta indica*), muestra diferencia significativa en el tratamiento extracto acuoso verde sin luz ultra violeta en un tiempo de ciento veinte minutos (eac-v-s-c) con respecto a todos los otros tratamientos.

9.3 Análisis estadístico de concentración de fenoles en extracto acuoso verde concentrado con exposición de luz ultra violeta con un tiempo de ciento veinte minutos.

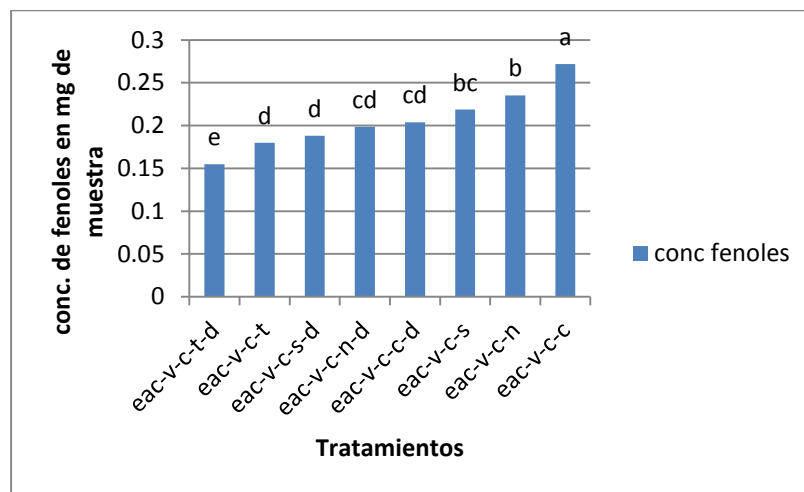


Figura 9. Representa el análisis estadístico de las concentraciones de fenoles en los tratamientos acuosos concentrado y diluido con luz ultra violeta, utilizando el programas statgraphic con prueba de tukey 95% de probabilidad, letras iguales no hay diferencia significativa.

El análisis estadístico de la concentración de fenoles, en el extracto acuoso de hojas frescas Neem (*Azadirachta indica*), muestra diferencia significativa en el tratamiento extracto acuoso verde con luz ultra violeta en un tiempo de ciento veinte minutos (eac-v-c-c), con respecto a todos los otros tratamientos.

9.4 Análisis estadístico de concentración de fenoles en extracto metanolico en hoja secas concentrado sin exposición de luz ultra violeta con un tiempo de ciento veinte minutos.

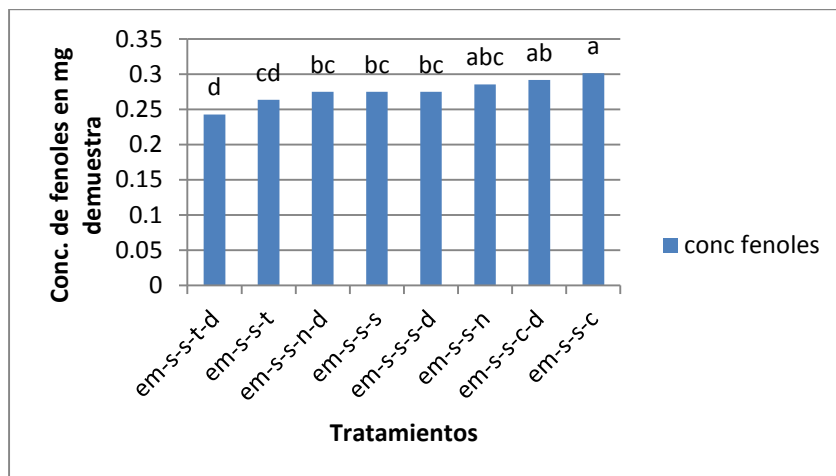


Figura 10. Representa el análisis estadístico de las concentraciones de fenoles en los tratamientos metanolicos concentrado y diluido sin luz ultra violeta, utilizando el programas statgraphic con prueba de tukey 95% de probabilidad, letras iguales no hay diferencia significativa.

El análisis estadístico de la concentración de fenoles, en el extracto metanolico de hojas secas Neem (*Azadirachta indica*), muestra diferencia significativa en el tratamiento extracto metanolico en muestra de hoja seca sin exposición de luz ultra violeta con un tiempo de ciento veinte minutos(em-s-s-c), con respecto a todos los otros tratamientos.



9.5 Análisis estadístico de concentración de fenoles en extracto metanolico seco concentrado con exposición a la luz ultra violeta en un tiempo de ciento veinte minutos.

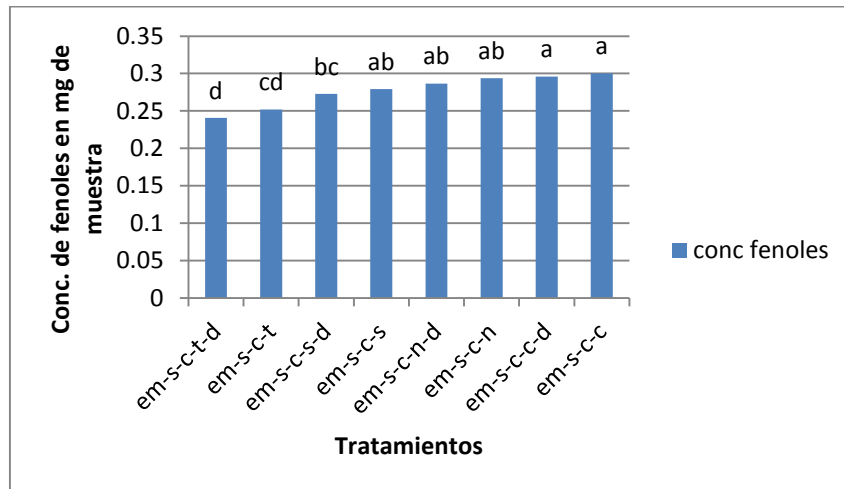


Figura 11. Representa el análisis estadístico de las concentraciones de fenoles en los tratamientos metanolicos concentrado y diluido con luz ultra violeta, utilizando el programas statgraphic con prueba de tukey 95% de probabilidad, letras iguales no hay diferencia significativa.

El análisis estadístico de la concentración de fenoles, en el extracto metanolico de hojas secas Neem (*Azadirachta indica*), muestra diferencia significativa en el tratamiento extracto metanolico en muestra de hojas secas con exposición de luz ultra violeta con un tiempo de ciento veinte minutos (em-s-c-c) con respecto los tratamientos excepto el extracto metanolico diluido en muestra de hoja seca con exposición a luz ultravioleta en un tiempo de ciento veinte minutos (em-s-c-c-d).

## 9.6 Curva de calibración para la determinación de flavonoides.

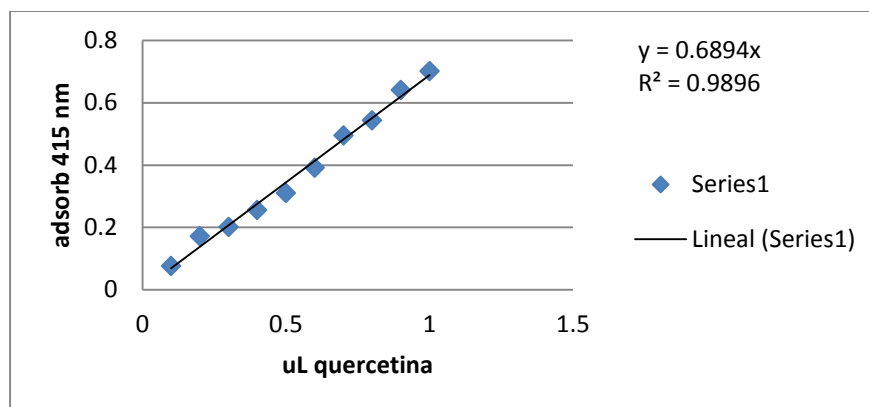


Figura12. Ilustración la Curva de calibración para cuantificación espectrofotométrica de Quercetina a 415 nm.

Mediante el análisis de regresión lineal de las concentraciones de los patrones de quercetina empleados para el trazado de la curva de la calibración, se observa linealidad cercana a 1 ( $R^2=0,9896$ ) lo que indica la precisión en la preparación y dilución de patrones utilizados, lo que a su vez indica confiabilidad. Los flavonoides fueron sometidos a 120 min de luz ultra violeta, así como concentrados y diluidos. Como se puede observar en la figura 13.

9.7 Análisis estadístico de concentración de flavonoides en extracto acuoso de hoja verde diluido a exposición de luz ultra violeta con un tiempo de ciento veinte minutos.

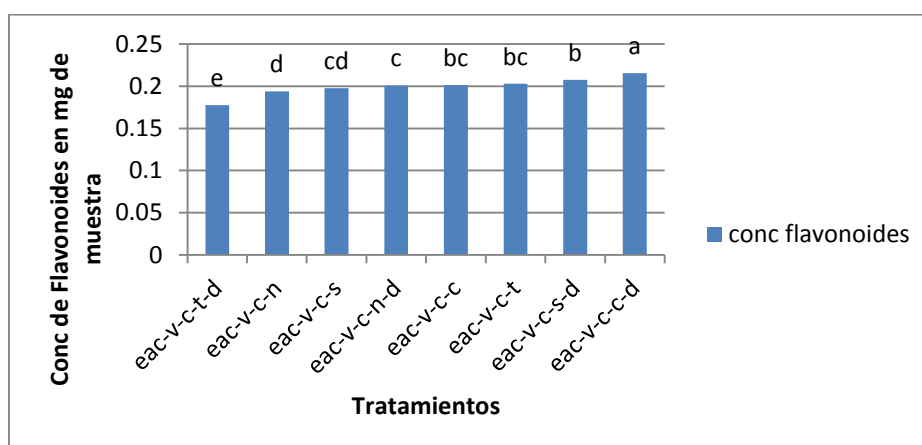


Figura 13. Representa el análisis estadístico de las concentraciones de flavonoides en los tratamiento acuosos verde con luz ultra violeta concentrados y diluido, utilizando el programas statgraphic con prueba de tukey 95% de probabilidad, letras iguales no hay diferencia significativa.

El análisis estadístico de la concentración de flavonoides, en el extracto acuosos de hojas frescas Neem (*Azadirachta indica*), muestra diferencia significativa en el tratamiento: extracto acuoso en muestra de hoja verde diluido con exposición de luz ultra violeta con un tiempo de ciento veinte (eac-v-c-c-d) con respecto a todos los otros tratamientos.

9.8 Análisis estadístico de concentración de flavonoides en extracto acuoso verde sin exposición de luz ultra violeta con un tiempo de treinta minutos. Fig. 14

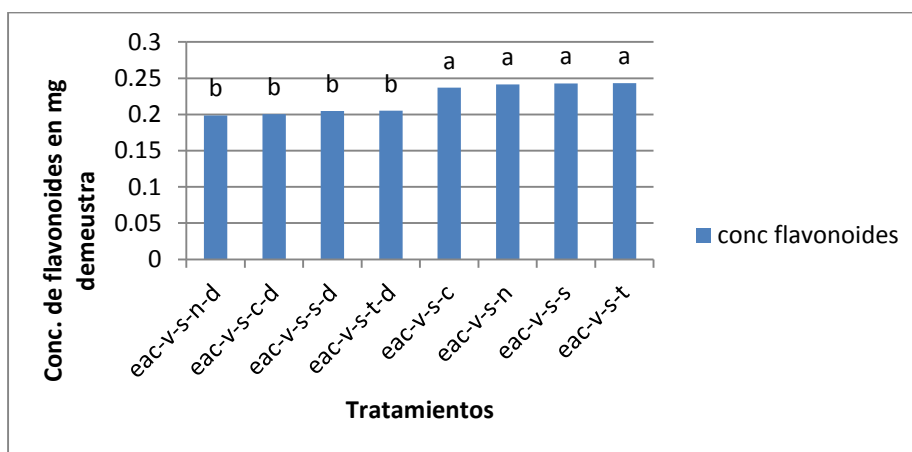


Figura 14. Representa el análisis estadístico de las concentraciones de flavonoides en los tratamiento acuosos verde sin luz ultra violeta concentrados y diluido, utilizando el programas statgraphic con prueba de tukey 95% de probabilidad, letras iguales no hay diferencia significativa

El análisis estadístico de la concentración de flavonoides, en el extracto acuosos de hojas frescas Neem (*Azadirachta indica*), muestra diferencia significativa en el tratamiento: extracto acuoso con muestra de hoja verde sin exposición de luz ultra violeta con un tiempo de treinta minutos (eac-v-s-t) con respecto a todos los otros cuatro tratamientos diluidos

### 9.9 Análisis estadístico de concentración de flavonoides en extracto metanolico seco con exposición de luz ultra violeta con un tiempo de treinta minutos

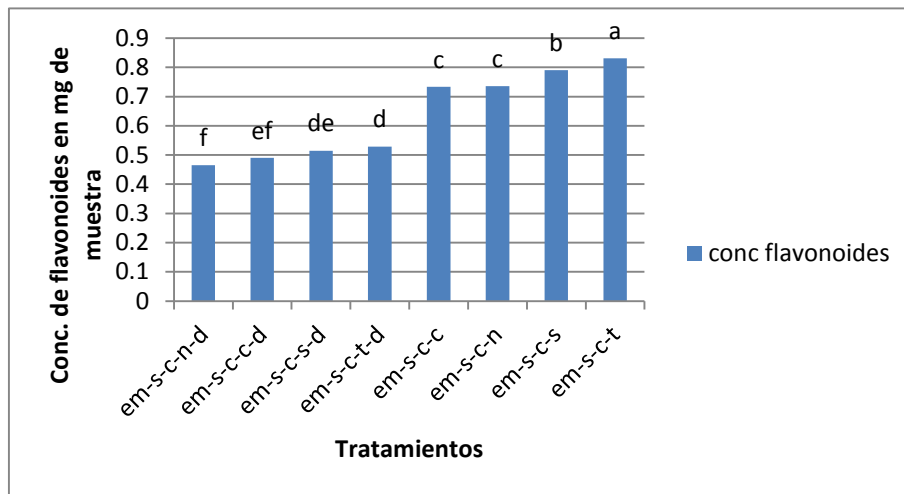


Figura 15. Representa el análisis estadístico de las concentraciones de flavonoides en los tratamientos metanolicos secas con luz ultra violeta concentrados y diluido, utilizando el programas statgraphic con prueba de tukey 95% de probabilidad, letras iguales no hay diferencia significativa

El análisis estadístico de la concentración de flavonoides, en el extracto metanolico en hojas seca de Neem (*Azadirachta indica*), muestra diferencia significativa en el tratamiento: extracto metanolico con muestra de hoja seca con exposición de luz ultra violeta con un tiempo de treinta minutos (em-s-c-t) con respecto a todos los otros tratamientos.

## 9.10 Análisis estadístico de concentración de flavonoides en extracto metanolico seco sin exposición de luz ultra violeta con un tiempo de treinta minutos

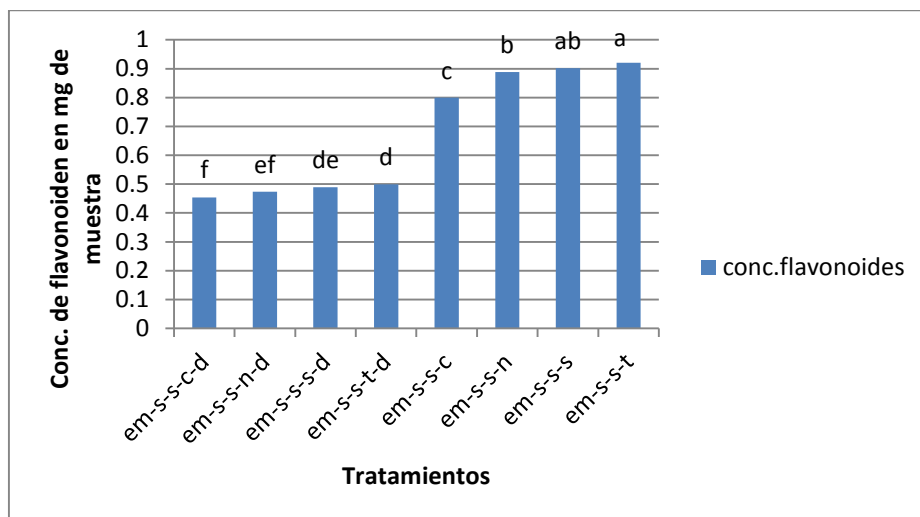


Figura 16. Representa el análisis estadístico de las concentraciones de flavonoides en los tratamientos metanolicos secas sin luz ultra violeta concentrados y diluido, utilizando el programas statgraphic con prueba de tukey 95% de probabilidad, letras iguales no hay diferencia significativa

El análisis estadístico de la concentración de flavonoides, en el extracto metanolico de hojas secas Neem (*Azadirachta indica*), muestra diferencia significativa en el tratamiento: extracto metanolico muestra de hoja seca sin exposición a la luz ultra violeta con un tiempo de treinta minutos (em-s-s-t) con respecto a los tratamientos, excepto el extracto metanolico muestra de hoja seca sin exposición de luz ultra violeta con un tiempo de sesenta minutos (em-s-s-s)

## CAPITULO X

### DISCUSIÓN

En este presente trabajo el contenido de fenoles en las hojas aplicado los tratamiento en los 120 min se observó que los niveles de fenoles incrementaron al con respecto al tiempo 0, 30, 60 y 90 minutos, pero no para flavonoides ya que estos disminuyeron.

Resultados similares de Ruíz L. et al, 2010 en hojas de repollo, tratadas con luz ultra violeta-c se observó un incremento significativo en fenoles.

Fan 2005 sugiere que la irradiación incrementa el contenido de fenoles y su capacidad antioxidante, por lo que la evolución fue muy similar para ambos tratamientos y que existe una diferencia significativa para los tratamientos metanólicos.

Bieza, Lois; 200, encontró que el incremento del contenido de fenoles se atribuiría a que como es ya bien conocido, compuestos fenilpropanoides que se sintetizan en respuesta a tratamientos con ultravioleta, debido a que mecanismos de protección de los tejidos vegetales se activarían en respuesta a la excesiva radiación.

Costa et al, 2006, indica por otra parte que en estudios previos encontraron que tratamientos con luz ultra violeta induce la producción de la enzima PAL, enzima clave en la regulación del metabolismo de los fenilpropanoides.

Por lo anterior podemos decir que concuerda con este trabajo realizado.

## **CONCLUSION XI**

### **CONCLUSIÓN**

Podemos concluir que los extractos acuosos y metanólicos hechos a base de las hojas de Neem (*Azadirachta Indica*) que fueron sometidos a radiación ultra violeta, la concentración de los fenoles aumentan conforme mayor es el tiempo de exposición.

En el presente estudio encontramos que la concentración de los flavonoides disminuye cuando los extractos de Neem (*Azadirachta Indica*) son sometidos a radiaciones ultra violeta.

## CAPITULO XII

### 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen D.J; McKee F.; Farage P.K.; Baker N.R. 1997. Analysis of limitations to CO<sub>2</sub> assimilation on exposure of leaves of two brassica napus cultivars to UV-B. *Plant cell environ* 20: 633-640

Balasundram N; K. Sundram; S. Samman 2006; compuestos fenólicos en las plantas y agroindustrial subproductos: actividad antioxidante, la ocurrencia, y los usos potenciales. *Food Chemistry*. pp 191-203.

Balibrea L. 2007. Tríadas Nuevas Lecturas en Ciencia y Tecnología. pp 77-79.

Bieza Klois R. 2001. An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol*. pp.126, 1105-1115.

Biswas K., Chattopadhyay I., Banerjee R.K., Bandyopadhyay, U. 2002 Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*) *Current Science* 82(11):1336-1345

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 186:343-355.

Brosché M.; Schuler M.A.; Kalbina I.; Connor I. and Strid A. 2002. Gene regulation by low level UV-B radiation: identification by DNA arrays analysis. *Photochem photobiol sci*. 1: 656-664.

Brosché M.; Fant C.; Bergkvist S.W.; Strid H.; Svensk A.; Olsson O.; Strid A. 1999. Molecular markers for UV-B stress in plants: alteration of the expression of four classes of genes in *Pisum sativum* and the formation of high molecular mass RNA adducts. *Biochim biophys acta* 1447 (2-3): 185-198.

Chattopadhyay R.R.; Chattopadhyay R.N.; Nandy A.K.; Podder G.; Maitra S.K. 1986. Antiserotonin activity of a fraction of fresh leaves of *Azadirachta indica* (Beng. Neem) *Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine* 34: 9-12.

Chatterjee, A. And Pakrashi, S. 1994. *The treatise on Indian medicinal plants* 3:76.

Chopra R. N.; Nayer S. L. And Chopra I. C. 1956 *Glossary of Indian medicinal plants*, CSIR, New Delhi. Von Caemmerer S., Farquhar G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.

Costa .L, Vicente A R, Civello P M, Chaves A R.Martinez G A. 2006. UV-C treatments delay postharvest senescence in broccoliflorets. *Postharvest Biology and Technology* 39. 204-210

Cv; Allen Jr, I.h.; Garrard, I.A. 1982. Effects of supplemental uv-b radiation on primary photosynthetic carboxylating enzymes and soluble proteins in leaves of c3 and c4 crop plants. *Physiol plant* 55: 11-16. 65.

*Dhar R.; Dawar H.; Garg S.; Basir S. F.; Talwar G. P. 1996 Effect of Volatiles from Neem and Other Natural Products on Gonotrophic Cycle and Oviposition of Anopheles stephensi and An. culicifacies (Diptera: Culicidae)33(2):195-201*

Fan X 2005. Antioxidant capacity of fresh-cut vegetables exposed to ionizing radiation. *J. Sci. Food Agric.*85: 995-1000

Girish, k., Shankara Bhat, s. 2008 neem- a green treasure electronic journal of biology, pp.102-111

He, J.; Huang, I.k.; Chow, W.S.; Whitecross, M.I; Anderson, J.M. 1993. Effects of supplementary ultraviolet-b radiation on rice and pea plants. *Aust j plant physiol.* pp. 129-142.

Hidema, J.; Kumagai, t. 2006. Sensitivity of rice to ultraviolet-b radiation. *Ann bot* 97 (6): 933-942.

Hrazdina, G.1992 "biosynthesis of flavonoids", in r. W. Hemingway, o. E. Laks (eds.) *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance*, new york, plenum press, pp. 61-72

Jordan B.R; He, J.; Chow, S.; Anderson, J.M. 1992. Changes in mrna levels and polypeptide subunits of ribulose 1,5-biphosphate carboxilase in response to supplementary ultraviolet-b radiation. *Plant cell environ* 15:91-989.

Lincoln Taiz y Eduardo Zeiger. 2006 "fisiología vegetal" universitat jaume, vol. 1, pp 546-549.

Liu, I.; Gitz iii, D.C.; Mcclure, J.W. 1995. Effects of uv-b on flavonoids, ferulic acid, growth, and photosynthesis in barley primary leaves. *Physiol plant* 93 (4): 725-733.

Markham, K.R. 1982. "Techniques of flavonoids identification". Academic press ed., New York. pp 1-113.



Martínez V. I; Periago M.J., Ros, G. 2000 significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. 50 (1):5-18

Robards K.; Prenzler, P.; Tucker G.; Swatsitang P.; Glover W.1999. "phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits". Food chemistry. pp. 401-436.

Rozema, J.; Björn, I.o.; Bornman, J.F.; Gaberscik, A.; Häder, D.P.; Trost, T.; Germ, M.; Klisch, M.; Gröniger, A.; Sinha, R.P.; Lebert, M.; Buffoni-Hall, R.; de Bakker, N.Vj.; Van de Staalj, J.; Meukamr B.B. 2002. The role of uv-b radiation in aquatic and terrestrial ecosystems-an experimental and functional analysis of the evolution of uv-absorbing compounds. J photochem photobiol.

Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R. 2001. "Byproducts of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments". Tends in Food Science & Technology. pp. 401-413

Singh R. Rastogi, S; y Dwivedi, U.N. 2010. Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. Compr. Rev. Food Sci,F., 9: 398-416.

Strid, A.; Chow, W.S.; Anderson, J.M. 1990. Effects of supplementary ultraviolet-b radiation on photosynthesis in *pisum sativum*. Biochimica et biophysica acta 1020: 260-268.

Buscador Google:

[http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-34292009000300009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-34292009000300009&script=sci_arttext)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754940>.

[http://books.google.com.mx/books?id=vG6AbvmwrlwC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=vG6AbvmwrlwC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

[www.arboldeneem.com/](http://www.arboldeneem.com/)