

**TRABAJO PROFESIONAL
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

ELIZABETH HERNÁNDEZ GUILLÉN

CON EL TEMA:

**“EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN A LA LUZ UV SOBRE
LAS CONCENTRACIONES DE FENOLES Y FLAVONOIDES DEL
EXTRACTO DE LA HOJA DE NEEM. (*Azadirachta Indica*; A. Juss)”**

OPCIÓN 1

MEDIANTE:

(TESIS PROFESIONAL)

DIRECTOR DE TESIS

JOAQUÍN ADOLFO MONTES MOLINA

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS

OCTUBRE 2017

ÍNDICE GENERAL

CAP.	CONTENIDO	Pá g.
I	INTRODUCCION	10
II	JUSTIFICACION	11
III	OBJETIVO	11
3.1	Objetivo general	11
3.2	Objetivo específico	11
IV	FUNDAMENTO TEORICO	12
4.1	Radiación solar	12
4.2	Efecto UV-B sobre enzimas del ciclo de Calvin	13
4.3	Efecto de la radiación UV-B sobre el metabolismo secundario	13
4.4	Compuestos fenólicos	13
4.5	Clasificación	14
4.5.1	Flavonoides	14
4.5.1.1	Estructura de un flavonoide	14
4.5.1.2	Fuentes naturales de los flavonoides	15
4.6	Funciones de las plantas	17
4.7	Biosíntesis del ácido Shikímico	18
4.8	Descripción de la vía	19
4.9	Enzima PAL	20
4.10	Neem	22
4.11	Toxicidad del Neem	24
V	METODOLOGIA	25
5.1	Obtención de los extractos metanólicos	25
5.2	Obtención de los extractos acuosos	25
5.3	Longitud de onda para los tratamientos	26
5.4	Determinación de fenoles en muestra	26
5.5	Determinación de flavonoides en muestra	26
VI	RESULTADOS Y DISCUSION	28
6.1	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:1.	
6.2	Análisis anova simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:2.	29

6.3	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:3.	30
6.4	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:4.	31
6.5	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:10.	32
6.6	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10.	33
6.7	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10.	34
6.8	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10.	35
6.9	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:1.	36
6.1	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:2.	37
6.11	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:3.	38
6.12	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:4.	39
6.13	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la	40

concentración 1:10.

- 6.14 Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10. 41
- 6.15 Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10. 42
- 6.16 Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10. 43
- 6.17 Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:1. 44
- 6.18 Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:2. 45
- 6.19 Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:3. 46
- 6.21 Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:4. 47
- 6.21 Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:10. 48
- 6.22 Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10. 49
- 6.23 Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10. 50

6.24	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10.	51
6.25	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanolicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:1.	52
6.26	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólico de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:2.	53
6.27	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanolicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:3.	54
6.28	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanolicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:4.	55
6.29	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanolicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:10.	56
6.3	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanolicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10.	57
6.31	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanolicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10.	58
6.32	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanolicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10.	59
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
VIII	CONCLUSIÓN	62
IX	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

INDICE DE FIGURAS

N° Fig.	Contenido	Pág.
1	Estructura de un fenol	14
2	Estructura de un flavonoide	14
3	Estructura de los principales tipos de flavonoides	15
4	Estructura molecular de los flavonoides	16
5	Esquema de la biosíntesis de polifenoles en las plantas	18
6	Formación del ácido shikímico a partir del PEP y E4P	18
7	Síntesis de la ruta del ácido shikímico	20
8	Ruta del ácido shikímico desaminación de fenilalanina y formación de ácidos cinámico, precursores de lignina, flavonas, isoflavonas y flavonoides.	22
9	Árbol de Neem, flores y semillas.	23
10	Curva de calibración de ácido gálico	27
11	Curva de calibración de quercetina	27
12	Análisis anova simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV, sin luz UV a una concentración de 1:1.	28
13	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV a una concentración 1:2.	29
14	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV a una concentración 1:3.	30
15	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV a una concentración 1:4.	31
16	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:10.	32
17	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10.	33

18	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10.	34
19	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10.	35
20	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:1.	36
21	. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:2.	37
22	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:3.	38
23	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:4.	39
24	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:10.	40
25	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10.	41
26	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10.	42
27	Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10.	43
28	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:1.	44

29	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:2.	45
30	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:3.	46
31	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:4.	47
32	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:10.	48
33	. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10.	49
34	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10.	50
35	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10.	51
36	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanolicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:1.	52
37	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólico de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:2.	53
38	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanolicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:3.	54
39	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanolicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:4.	55

40	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:10	56
41	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10	57
42	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10	58
43	Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10	59

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Las hojas de Neem (*Azadirachta Indica*; A. Juss 1830) desde la antigüedad han sido utilizadas como bioinsectidas, en la medicina para elaboración de remedios caseros contra diversos padecimientos (Chopra et al., 1956).

Por estudios realizados se sabe que en las hojas de Neem existen 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 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 y Samman, 2006).

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

Por lo tanto los compuestos fenólicos a los que nos vamos a referir en los próximos puntos se originan principalmente a través de dos rutas biosintética: la ruta del ácido Shikímico que conduce, mediante la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), a los ácidos cinámicos y todos sus derivados (fenoles sencillos, como de ácidos fenólicos y derivados del fenilpropano), algunos de los compuestos fenólicos que vamos a considerar como principios activos de plantas se originan a través de rutas mixtas que combinan la vía del shikimato y del acetato, como es el caso por ejemplo de los flavonoide (Domínguez 1985).

Para ello en este trabajo el objetivo fue conocer el efecto de la luz ultra violeta sobre la síntesis de fenoles y flavonoides en las hojas de Neem, por lo que se realizaron dos tratamientos diferentes, tales, como el extracto acuoso con hoja verde y el extracto usando como disolvente metanol con hojas secas, tomando una concentración de 1:10, 1:100, 1:1000 con y sin exposición de luz ultra violeta con tiempos de ciento veinte minutos.

Los tratamientos irradiados con luz ultra violeta en los tiempos estudiados presentaron un aumento en la concentración de compuestos fenólicos y en su actividad antioxidante comparado con las muestras que no fueron tratadas con luz ultravioleta.

CAPITULO II

JUSTIFICACIÓN

Las plantas generan metabolitos secundarios tales como los fenoles y flavonoides, la cual destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de moléculas orgánicas que parecen no tener una función directa. Algunas funciones como atrayentes de insectos y como un mecanismo de defensa contra los insectos o patógenos del medio ambiente. Sin embargo, no se sabe si la síntesis de dichos compuestos es afectada por la luz ultravioleta. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue demostrar el efecto de la exposición a la luz ultravioleta entre el rango de 200 a 290 nm en las hojas de Neem (*Azadirachta indica*) las cuales se están utilizando como bioinsecticida en diversos cultivos.

CAPITULO III

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Evaluar la concentración de fenoles y flavonoides, al exponer el extracto de hoja de Neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) a luz ultravioleta.

3.2 Objetivo específico

- Evaluar la concentración de fenoles y flavonoides, al exponer el extracto acuoso de Neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) a la luz ultravioleta a diferentes tiempos.
- Evaluar la concentración de fenoles y flavonoides, al exponer el extracto metanólico de Neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) a la luz ultravioleta a diferentes tiempos.

CAPITULO IV

FUNDAMENTO TEORICO

4.1 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 usada 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) (I Simposio Internacional de Invernaderos - 2007 - México).

Para que la radiación UV-B sea interceptada y produzca alteraciones en la fisiología de la planta debe penetrar en la hoja y ser absorbida por los cromóforos o moléculas susceptibles al efecto 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 UV-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 UV-B que las dicotiledóneas por presentar estas hojas anchas y de orientación más bien horizontal, y por lo tanto son más susceptibles al daño [He et al.,1993]. Por tal motivo, las plantas monocotiledóneas parecen ser generalmente más tolerantes a niveles elevados de radiación UV-B.

4.2 Efecto del estrés causado por la radiación solar

De acuerdo con Tadeo (2000), por una alta radiación solar las plantas sufren estrés cuando las clorofilas de las antenas de los fotosistemas, que se encuentran en las membranas tilacoides de los cloroplastos, absorben más energía lumínica de la que puede utilizarse en el proceso de la fotosíntesis. Este estrés por luz conduce inicialmente a la fotoinhibición de la fotosíntesis que previene las lesiones oxidativas al aparato fotosintético por la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS; reactive oxygen species) en el fotosistema I (PSI) y II (PSII) (Tadeo y Gómez Cadenas, 2008). Además, la alta radiación, las temperaturas elevadas y el estrés hídrico, aumentan la fotorrespiración de la planta lo que afecta su productividad debido al consumo considerable de los carbohidratos, fijados en la fotosíntesis (Gómez, 2012).

4.3 Efecto de la radiación de luz UV-B sobre el metabolismo secundario

Las plantas han desarrollado mecanismos de protección o adaptación contra altos niveles de radiación UV-B, como es el aumento de la producción de metabolitos secundarios tales como fenoles y flavonoides (Musil et al., 2002; Frohnmeyer y Staiger, 2003), los cuales se acumulan en las células de la epidermis de diversas especies vegetales (Hollosoy, 2002), 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).

4.4 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 y Samman 2006).

Todos los compuestos fenólicos poseen un anillo aromático (Figura 1) al que se unen diversos grupos sustituyentes, como hidroxilo, carboxilo y metoxilo (-O-CH₃) y a menudo otras estructuras cíclicas no aromáticas.

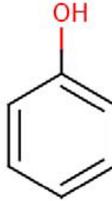


Figura 1. Fenol

4.5 Clasificación

Los compuestos fenólicos se clasifican en subcategorías dependiendo de su esqueleto estructural, variando su naturaleza desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos de naturaleza polimérica como las proantocianidinas. Su clasificación se centra principalmente en el número de átomos de carbono que se presenta su estructura (Spencer y Crozier 2008).

4.5.1 Flavonoides

Los flavonoides denotan un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos más conocidos y caracterizados por una estructura venzo y pirano, generalmente de color amarillo, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glucósidos de diversos azúcares (glucosa, galactosa, ramnosa o una pentosa (Cartaya et al., 2001).

4.5.1.1 Estructura

Los flavonoides son compuestos de 15 carbonos que se encuentran en todo el reino vegetal (Harbone et al., 1988), se han identificado más de 2,000 flavonoides procedentes de los vegetales. Son compuestos de bajo peso molecular que se caracterizan por poseer dos anillos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general (C₆-C₃-C₆) (Figura 2).

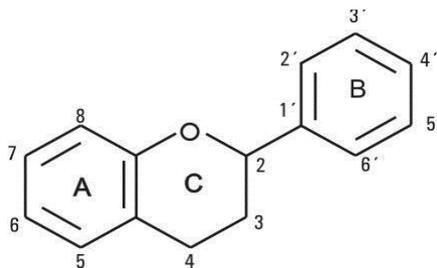


Figura 2. Estructura de un flavonoide

Los anillos son denominados A, B y C. 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' (Figura 2). 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.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina (Figura 3), 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. (Bors et al., 1990)

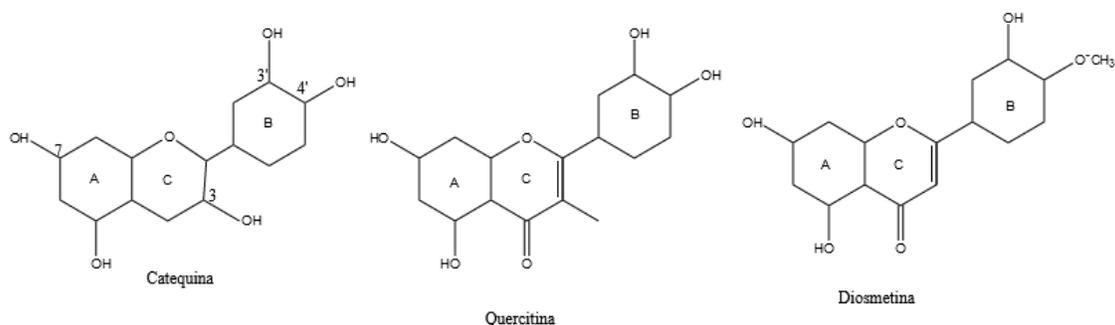


Figura 3. Estructura de los principales tipos de flavonoides

4.5.1.2. Fuentes naturales de los flavonoides:

- 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.
- **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 (Major Types, 2011).

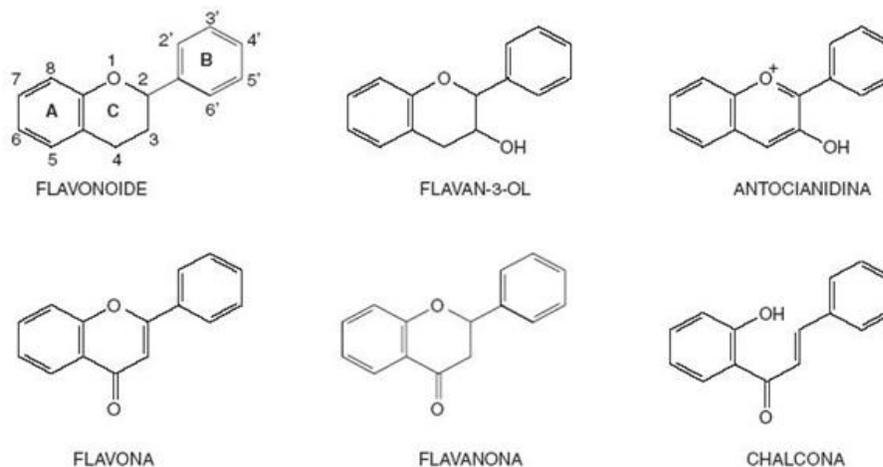


Figura 4. Estructura molecular de los flavonoides.

Los flavonoides se biosintetizan en todas las "plantas terrestres" o embriofitas, y también en algunas algas *Charophyta* (Cache, 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).

4.6 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).

Los compuestos fenólicos son biosintetizados en diferentes rutas metabólicas que Hrazdina en 1992, menciona a los compuestos aromáticos vegetales existentes: en la ruta del ácido shikímico que a partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shikímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina (Trejo & Rodríguez 2007)

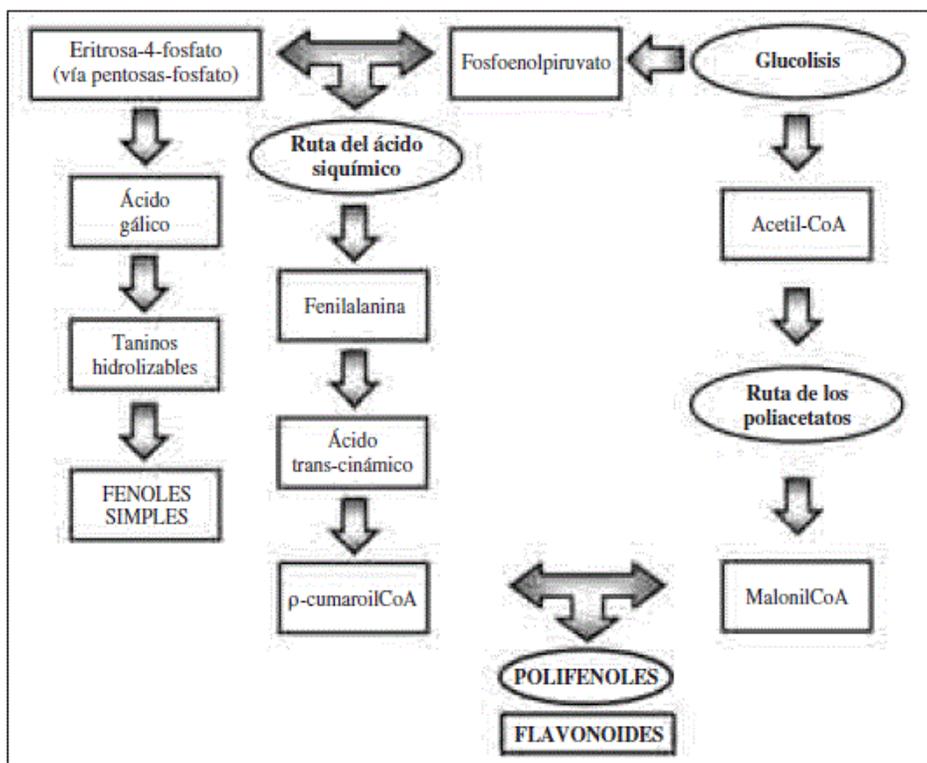


Figura 5. Esquema de la biosíntesis de polifenoles en plantas.

4.7 Biosíntesis del ácido shikímico

La formación del ácido shikímico ocurre a partir de precursores de 3 y 4 átomos de carbono como son el ácido fosfoenolpirúvico (PEP) y la eritrosa 4-fosfato (E4P) por una condensación de tipo aldólica, produciendo un compuesto C7 a través de una serie de etapas que se resumen en la Figura 6. (Wiley y Ltd., 2002)

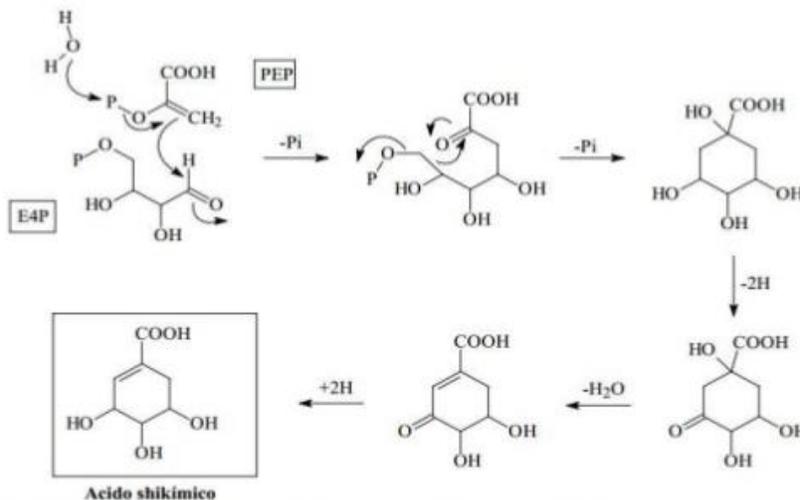


Figura 6. Formación del ácido shikímico a partir del PEP y E4P

4.8 Descripción de la vía del ácido Shikímico

Primera enzima: 3-deoxi-D-arabinoheptuloso-7-fosfato sintetasa (DAHPS) es la que controla el flujo de carbono en la vía. Cataliza la condensación de la E4P (proveniente de la vía de las pentosas) con PEP (proveniente del glicólisis) para generar 3-deoxi-D-arabinoheptuloso-7-fosfato (DAHP). Se trata de una metaloenzima dependiente de Mn^{+2} y Co^{+2} . En las plantas los aminoácidos aromáticos no son considerados primariamente como destinados a la biosíntesis de proteínas sino como intermediarios en la biosíntesis de MS, los cuales regularán la actividad de esta enzima, por lo que esta enzima no es controlada por retroinhibición de los aminoácidos aromáticos. Es una enzima histerética (es decir que sufre cambios muy lentos en sus propiedades cinéticas después de la adición o remoción de determinados ligandos). Es activada por Triptófano y Tirosina, e inhibida por arogenato (un intermediario pos-corismato de la biosíntesis de Fenilalanina y Tirosina).

Segunda enzima: 3-dehidroquinato sintasa. Cataliza la desfosforilación e isomerización del DAHP hasta 3-dehidroquinato. Es también una metaloenzima dependiente de Co^{+2} y utiliza NAD^+ como coenzima.

Tercera y cuarta enzima: 3-dehidroquinato deshidratasa y shiquimato deshidrogenasa. Catalizan la deshidratación del 3-dehidroquinato hasta dehidroshiquimato y la reducción de éste hasta shiquimato. Hay evidencias de que las dos actividades están presentes en un solo polipéptido (enzima bifuncional).

Quinta enzima: Shiquimato quinasa. Cataliza la fosforilación del shiquimato hasta shiquimato-3-fosfato con gasto de ATP. Presenta inhibición por los productos de la reacción (shiquimato-3-fosfato y ADP), así como modulación por luz en organelos aislados.

Sexta enzima: 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSP sintetasa). Es la que cataliza la transformación de shiquimato-3-fosfato en 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato (EPSP), que es el blanco de un herbicida como el glifosato (N-fosfometilglicina, análogo del PEP) y por lo tanto al bloquearla se bloquea la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, de proteínas y compuestos fenólicos, con lo que cesa el crecimiento y acontece la muerte del vegetal. Por supuesto, como esta enzima está ausente en mamíferos el glifosato tiene baja toxicidad para los animales. Esta enzima está localizada principalmente en cloroplastos y es sintetizada como un precursor en el citoplasma. La inhibición por glifosato es competitiva respecto al PEP y no competitiva con respecto al shiquimato-3-fosfato.

Existen especies donde esta enzima ha sufrido una mutación puntual conservativa de un residuo de glicina por uno de alanina, lo que la hace insensible al glifosato.

Séptima enzima: Corismato sintetasa. Cataliza la 1,4 trans eliminación de fosfato (del EPSP) para producir corismato. Esta reacción es inusual ya que requiere como FMNH2 típicamente asociado a reacciones redox. (Figura 6)

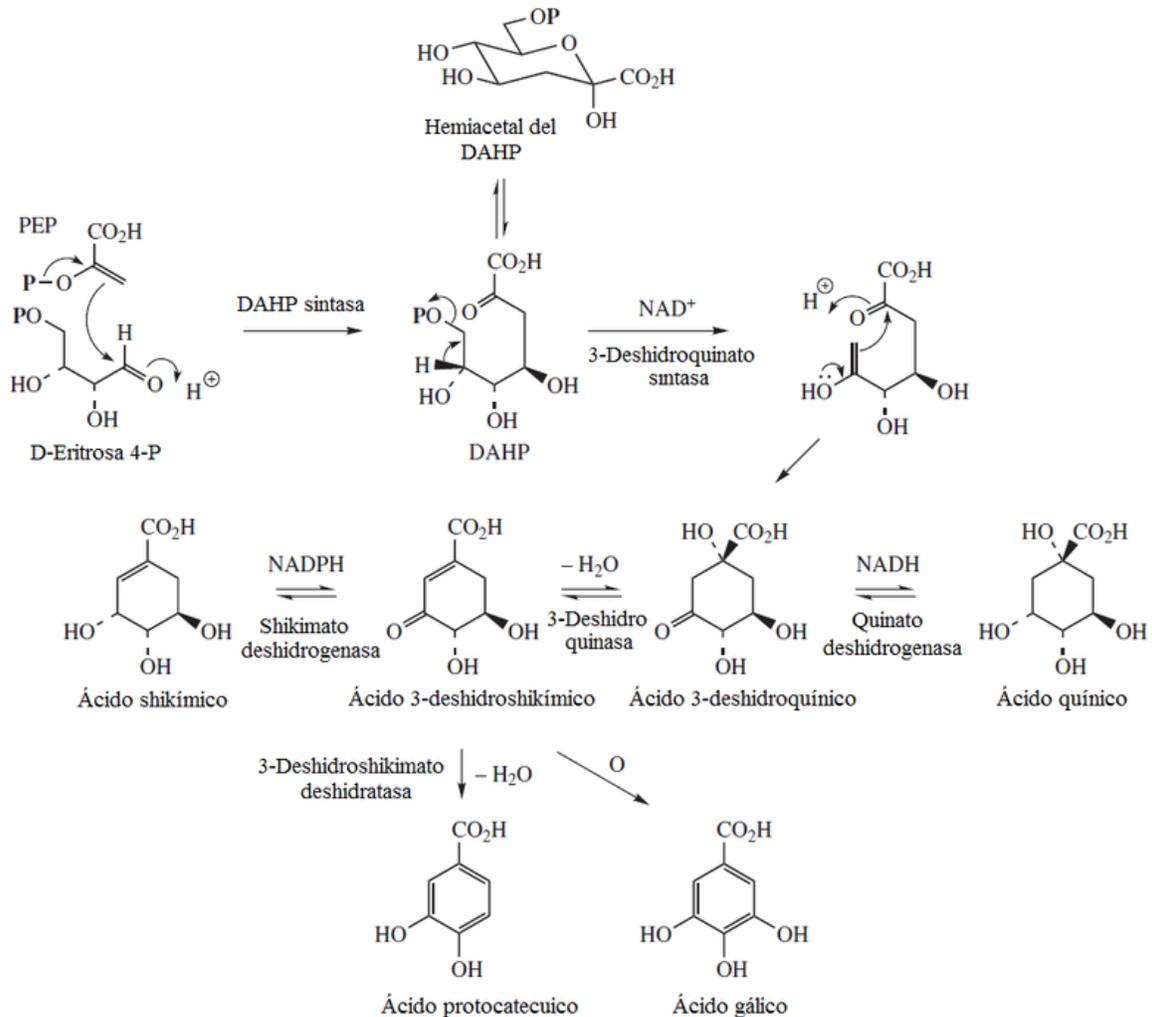


Figura7. Ruta metabólica para la biosíntesis del ácido shikímico.

4.9 Enzima PAL

Uno de estos productos de esta vía es la fenilalanina por la eliminación de una molécula de amonio para formar ácido cinámico Esta reacción está catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL). Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que

cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos. Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos *trans*-cinámico y *p*-cumárico se metabolizan para formar ácido caféico y ácido ferúlico (figura 7) cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: camarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides (Dixon y Steele, 1999).

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 primaveras que siguen a inviernos muy fríos, las flores desarrollan colores muy intensos.

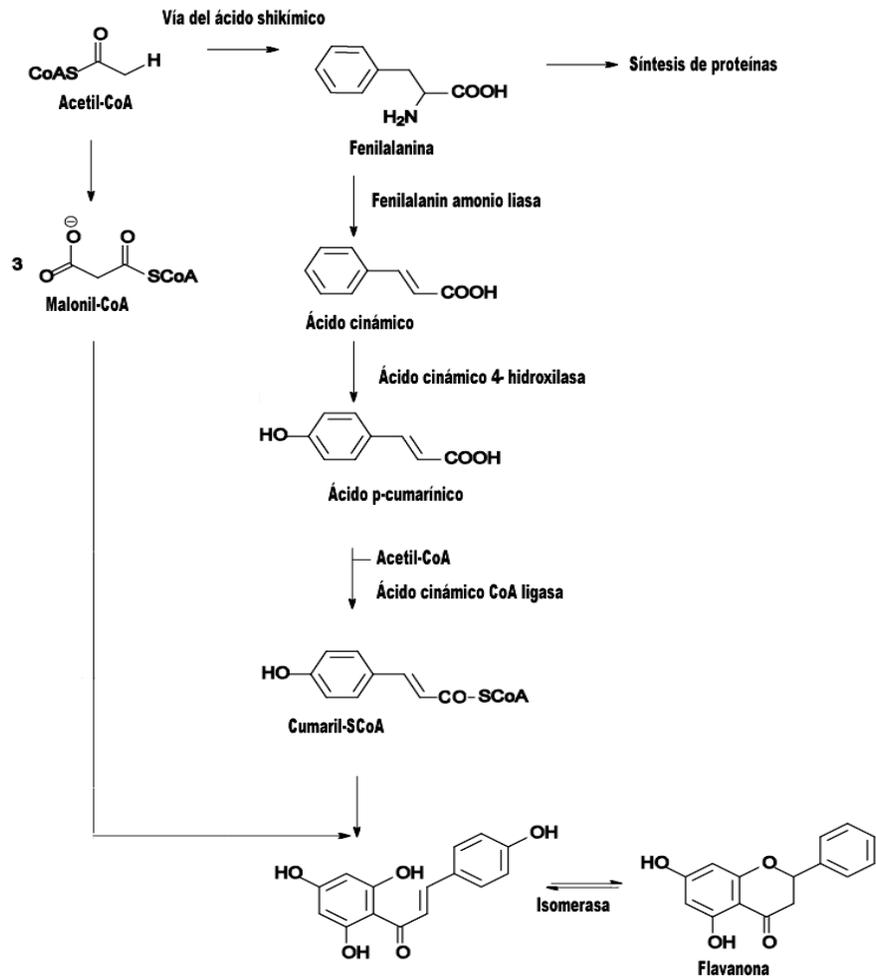


Figura 8. Ruta del ácido shikímico desanimación de fenilalanina y formación de ácidos cinámico y cumárico, precursores de lignina, flaonas, isoflavonas y flavonoides.

De toda esta diversidad de compuestos fenólicos vegetales, los flavonoides (C6-C3-C6) 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 glucósido o sin un residuo de azúcar en su molécula.

4.10 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 9), de la familia Meliaceae y de la subfamilia Meloideae (Girish y Shankara 2008).



Figura 9. 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 y 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 et al., 1956) (Chatterjee y Pakrashi, 1994), tanto las hojas, el fruto y la corteza (figura 9). 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 (Kirtikar y Basu, 1931). El aceite de Neem también presenta varios usos en infecciones de la piel (Chopra et al., 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, 1963). Entre otras propiedades conferidas al árbol de Neem, se encuentra su capacidad como antiséptico, cicatrizante y contra enfermedades de la piel (Kirtikar y 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 (Biswas et al., 2002, actividad hipolipidémica en ratas alimentadas con dieta aterogénica, antihiperlipidémica, así como actividad hipotensora (Chattopadhyay et al., 1986; Chattopadhyay et., al 1887a).

4.11 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 nematicida. 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 vitelogénesis (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.

CAPÍTULO V

METODOLOGIA

Para la cuantificación de fenoles y flavonoides se utilizaron hojas de Neem (*A. Indica*) recolectadas de 10 árboles que están ubicados en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez colectado en el periodo de floración y fructificación (Julio-agosto 2014). Se utilizaron hojas frescas para el tratamiento acuoso y hojas secas para tratamiento metanólico utilizando como solvente el metanol.

5.1 Obtención del extracto metanólico

Se escogieron 10 árboles ubicados en ITTG tomando de cada árbol 500 g de hojas, eliminando el polvo con un lavado con agua potable; dejándolo remojar en agua una solución al 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 fueron pulverizadas en una licuadora convencional (Osterizer®, México) para obtener 20 g de muestra, así mismo fue colocada la muestra en un matraz volumétrico de 250 mL donde fueron adicionados 450 mL de metanol. Mezclando por 15 min y se dejó reposar durante 24 h (Jianming et al., 1999). La mezcla se sonicó durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se filtró (Whatman No. 40), y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm a 20 °C durante 10 min. El sobrenadante se colocó en un rotavapor (Buchi R-205, Suiza) para remover el solvente y así obtener el extracto, por último, se re-suspendió en 100 mL de metanol para su almacenamiento a una temperatura de -20°C hasta su uso (Chang et al., 2002).

5.2 Obtención del extracto acuoso

Se escogieron 10 árboles ubicados N 16° 45' 25.1'' y HO 93° 10' 21.6'' atrás del edificio z en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez tomando de cada árbol 500 g 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 del hipoclorito. Se pesaron 50 g de hoja fresca, se colocó en un vaso de precipitado de 1000 mL y se le adicionaron 200 mL de agua destilada dejando reposar 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).

5.3 Longitud de onda para los tratamientos acuosos y metanolicos

Se utilizó cámara de flujo laminar conteniendo una lámpara de luz ultravioleta marca Phillips TUV30W G30T8, la cual los tratamientos acuosos y metanolicos se expusieron a una longitud de onda de 200 a 290 nm a tiempos de 30, 60, 90 y 120 minutos.

5.4 Determinación de fenoles

La determinación se realizó de acuerdo el método Folin-Ciocalteu (Slinkard y Singleton 1977). Se tomaron 30 μL de muestra (metanólico 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_2CO_3 al 10% y nuevamente se le agregó 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 (Figura 10). Los resultados se expresaron en mg equivalente de ácido gálico por g de muestra.

5.5 Determinación de flavonoides

La determinación se realizó de acuerdo al método de Zhishen con ciertas modificaciones (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_3 al 10% y se adicionaron 100 μL de Na_2CO_3 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 (Figura 11). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de (+) Catequina por g de muestra.

CAPITULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la Figura 10 se muestra la curva de calibración obtenida de ácido gálico mg AG/mL., muestran que los extractos en hojas de Neem (Azaridachta Indica; A Juss 1830) contienen una cantidad significativa de fenoles.

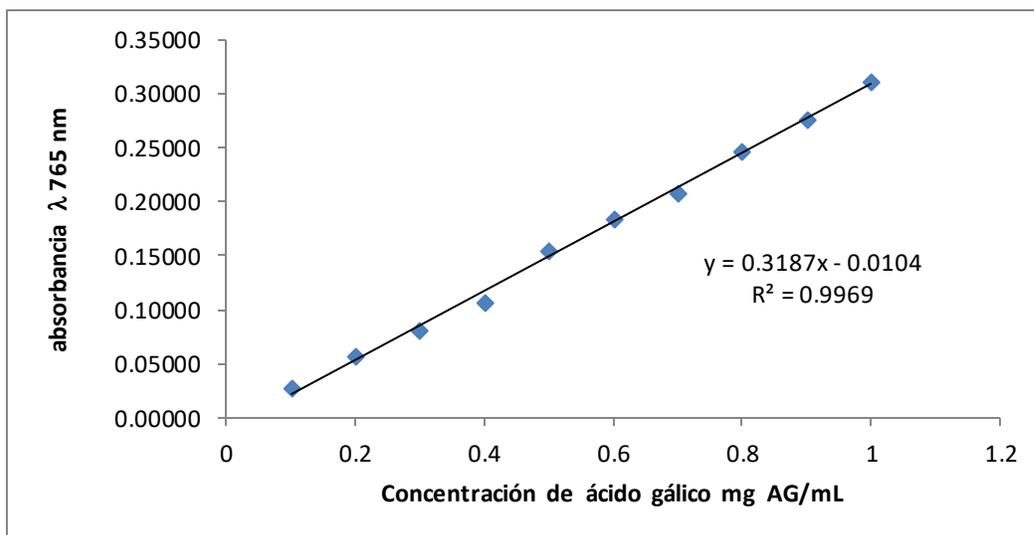


Figura 10. Curva de preparación de ácido gálico

En la figura 11 se muestra la curva de calibración obtenida de quercetina mg AG/mL para flavonoides a partir de una observancia de 415 nm, por lo que el extracto de hojas de Neem (Azaridachta Indica; A Juss 1830) contiene una cantidad significativa de flavonoides.

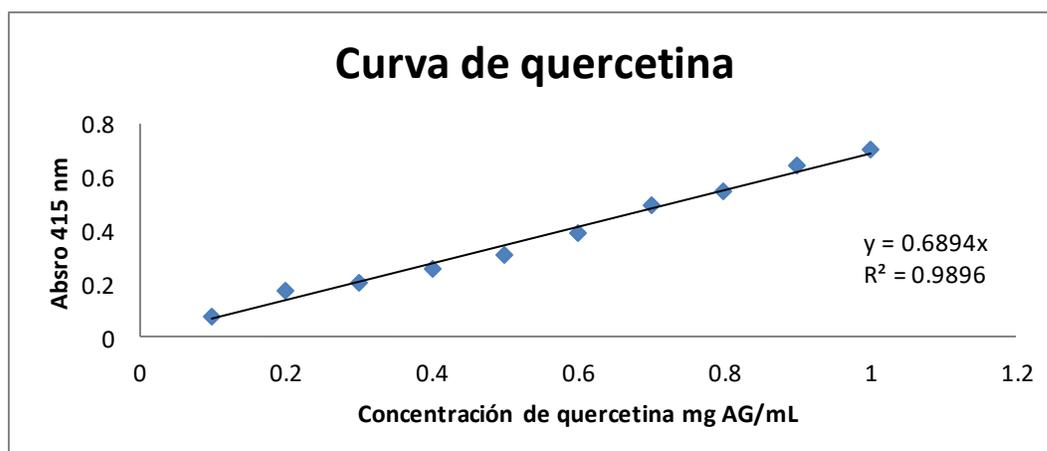


Figura 11. Preparación de curva de calibración con Quercetina

A continuación, se muestran los análisis estadísticos de las diferentes variables y tratamientos, que se realizaron a los datos obtenidos durante el desarrollo de la investigación, utilizando el programa Statgraphics con un error de >0.05 , letras iguales no hay diferencia significativa.

En la figura 12 se muestran los resultados estadísticos del análisis de ANOVA simple indicando la concentración de flavonoides (mg) en extractos acuosos (ac) obtenidos de hojas verdes (v) de neem (*Azadirachta indica*), con exposición a luz UV (c) y no expuestas (s) a diferentes tiempos (min) de exposición: cero (0), treinta (t), sesenta (s), noventa (n), ciento veinte (s) y la concentración del extracto 1:1.

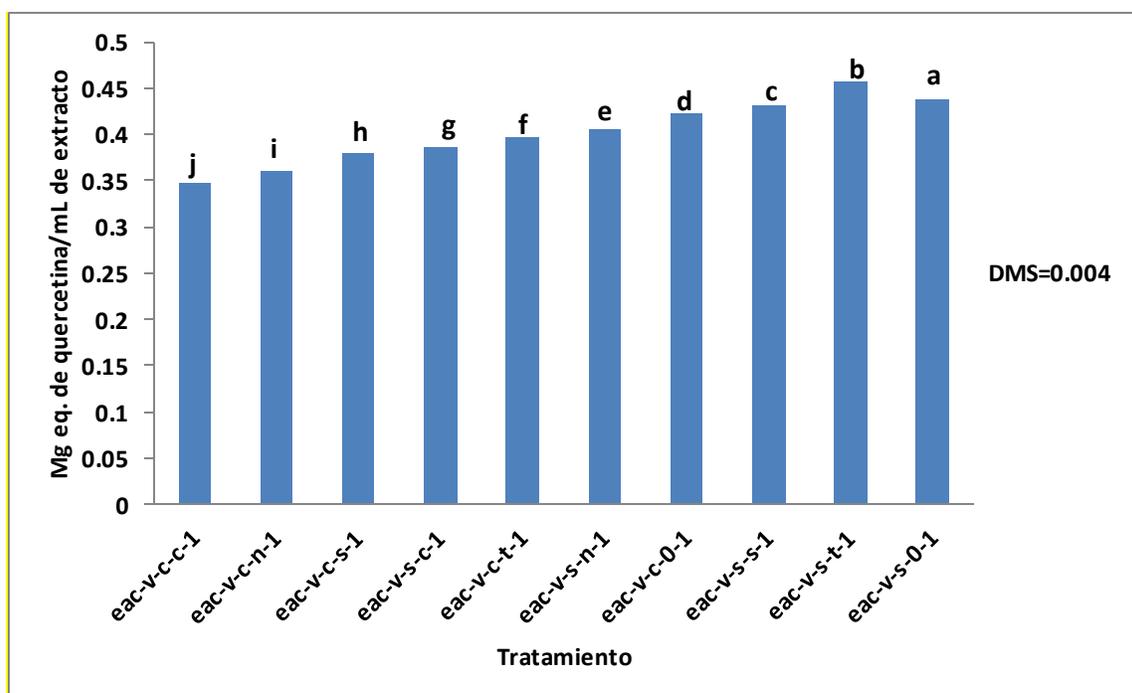


Figura 12. Análisis ANOVA simple para la concentración de flavonoides en el extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV, sin luz UV y a una concentración de 1:1.

Observamos en los resultados de la figura 12 que para la variable concentración de flavonoides el tratamiento del extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a la luz UV a un tiempo de 0 minutos (eac-v-s-0-1), mostró diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. A medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz UV disminuyó la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 2 a 24 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 13 Se muestran los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 1:2.

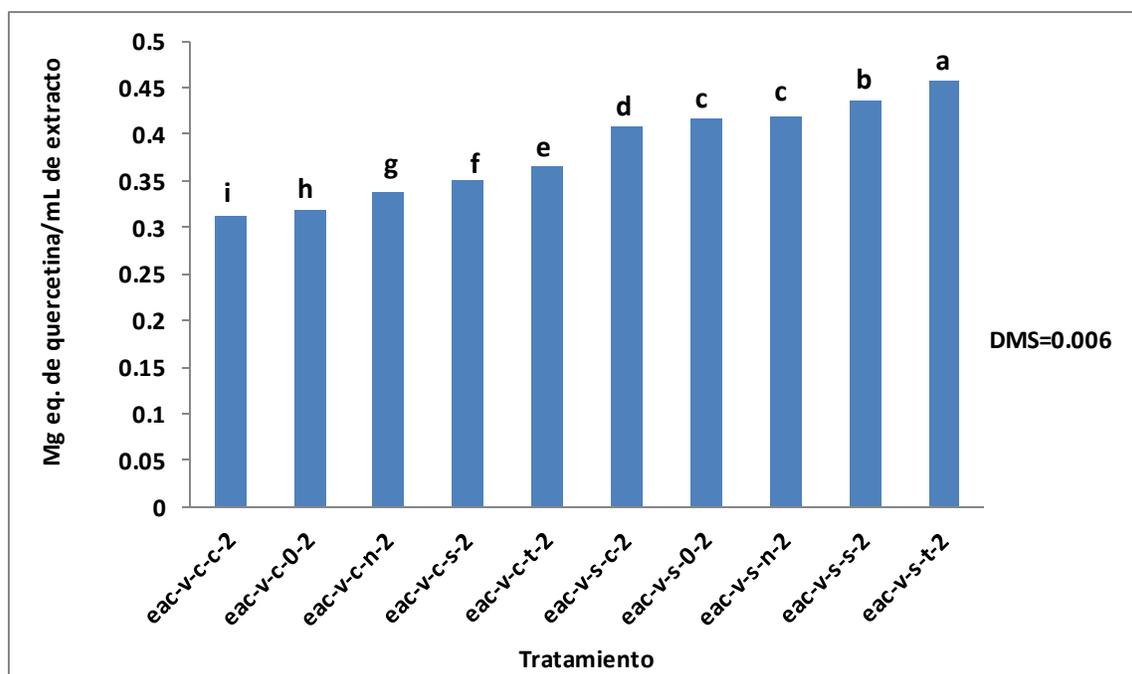


Figura 13. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV a una concentración 1:2

Observamos en los resultados de la figura 13 que el tratamiento del extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a la luz UV a un tiempo de 30 minutos (eac-v-s-t-2), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a luz UV al tiempo 30 fue del 4 a 31 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 14 Se muestran los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 1:3.

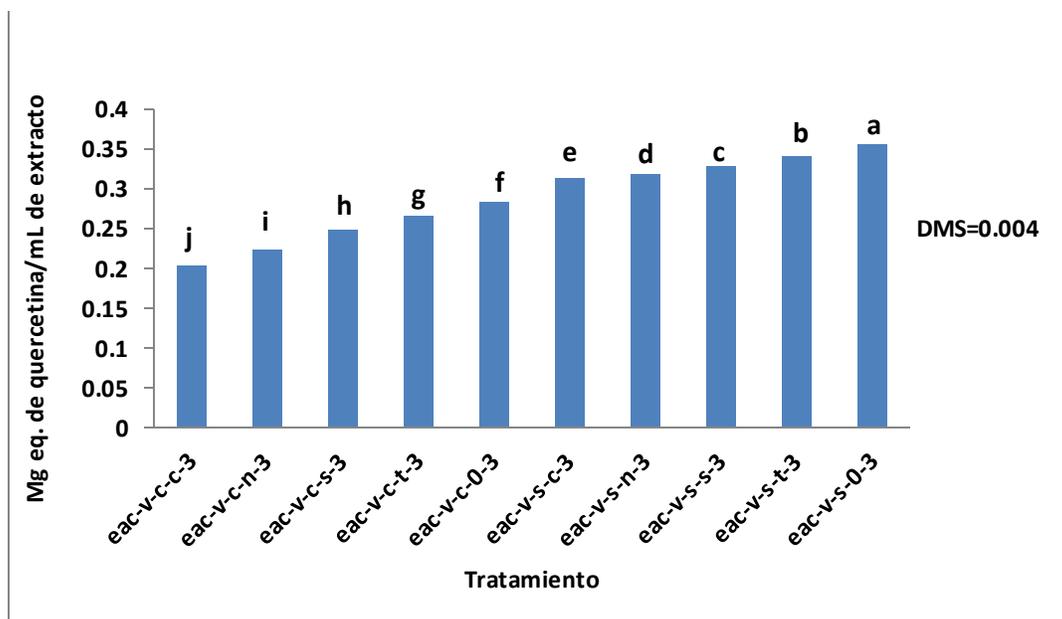


Figura 14. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV a una concentración 1:3

Observamos en los resultados de la figura 14 que el tratamiento del extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a la luz UV a un tiempo 0 minutos (eac-v-s-0-3), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. También que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 6 a 43 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 15 se muestran los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 1:4.

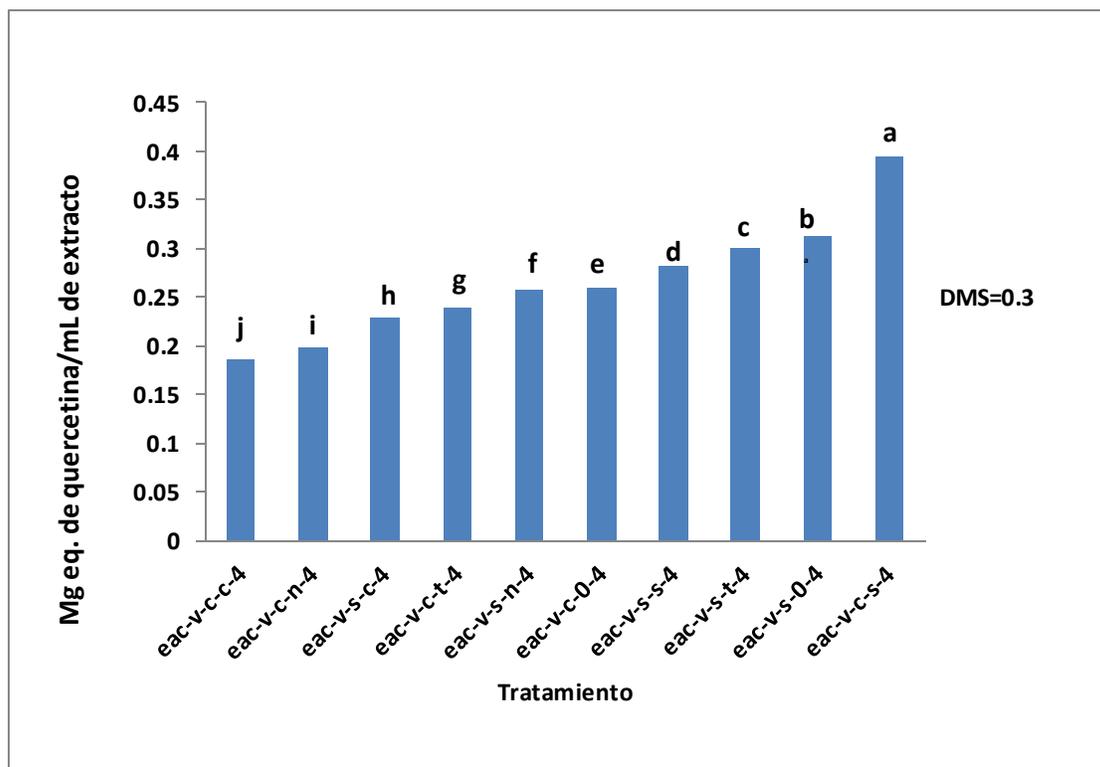


Figura 15. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV a una concentración 1:4.

Observamos en los resultados de la figura 15 que el tratamiento del extracto acuoso de hojas verdes con exposición a la luz UV a un tiempo de 60 minutos (eac-v-c-s-4), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto acuoso de hojas verdes con exposición a luz UV al tiempo 60 fue del 20% a 46 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 16 se muestra los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 1:10.

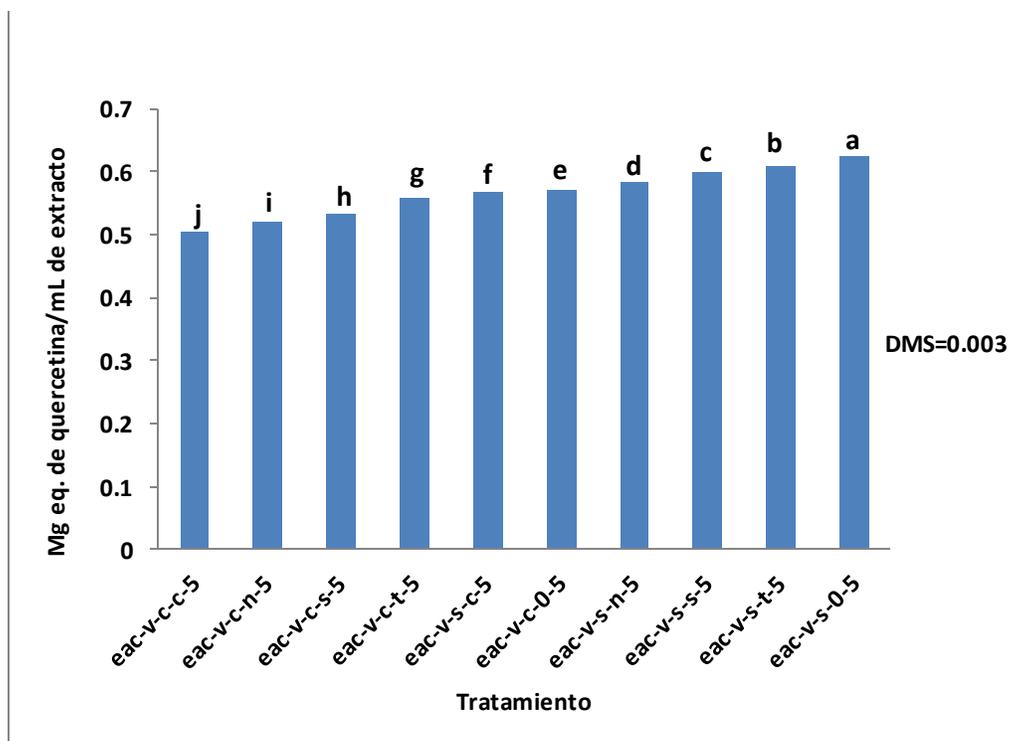


Figura 16. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:10.

Observamos en los resultados de la figura 16 que el tratamiento del extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a la luz UV a un tiempo 0 minutos (eac-v-s-0-5), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 3 a 20 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 17 se muestran los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 2:10.

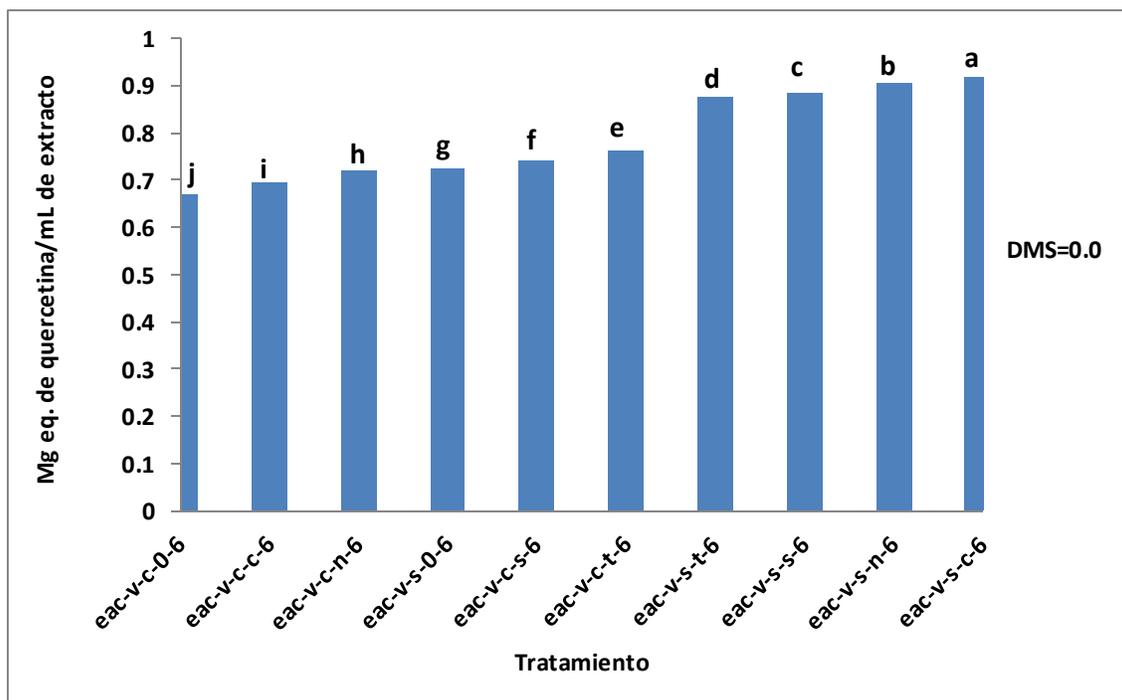


Figura 17. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10.

Observamos en los resultados de la figura 17 que el tratamiento del extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a la luz UV a un tiempo 0 minutos (eac-v-s-0-6) mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos que a la exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 1 a 27 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 18 se muestran los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 3:10.

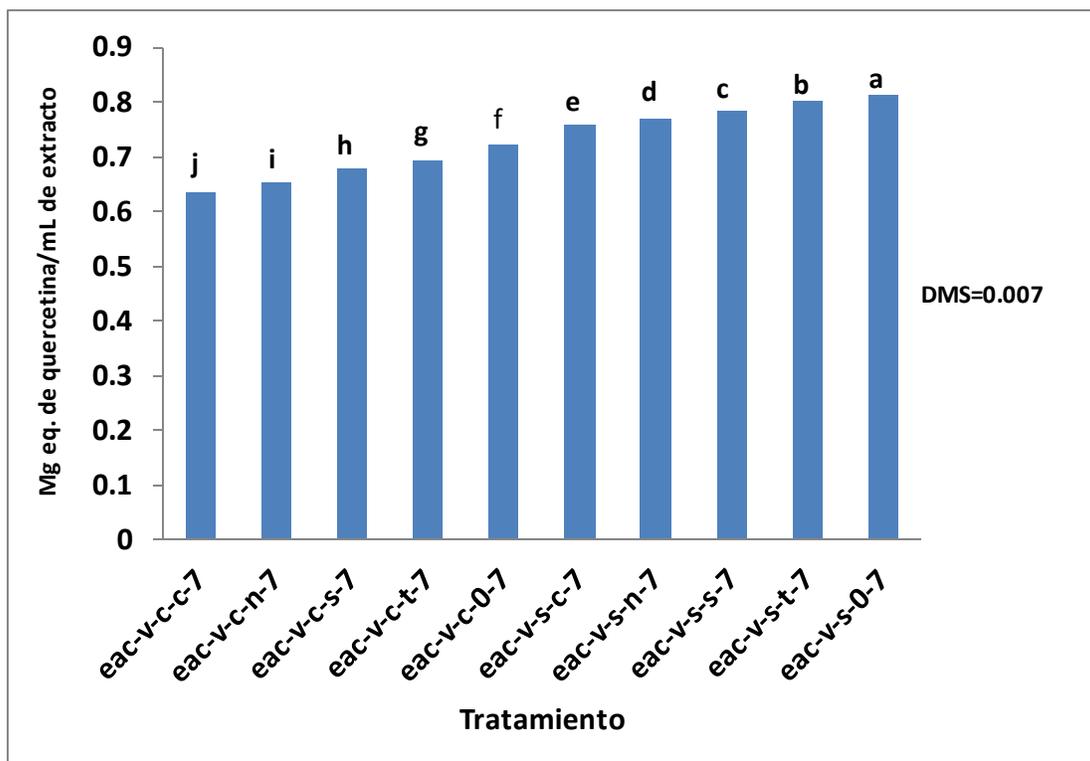


Figura 18. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10.

Observamos en los resultados de figura 18 que el tratamiento del extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a la luz UV a un tiempo 0 minutos (eac-v-s-0-7), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 1 a 23 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 19 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 4:10.

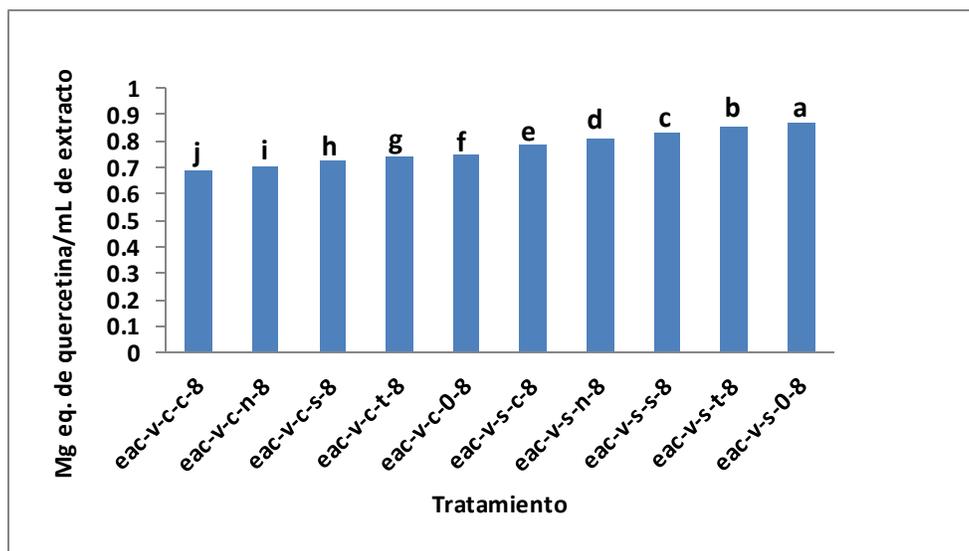


Figura 19. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10.

Observamos en los resultados de la figura 19 que el tratamiento del extracto acuoso de hojas verdes con exposición a la luz UV a un tiempo 0 minutos (eac-v-s-0-8), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto acuoso de hojas verdes sin exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 3 a 22 % comparado con los demás tratamientos.

En las figuras siguientes se muestran los análisis estadísticos de los datos obtenidos de la producción de flavonoides en extractos metanolicos radiados con luz UV, a diferentes tiempos (cero (0), treinta (t), sesenta (s), noventa (n) y ciento veinte (c) utilizando el programa estatgraphic, con la prueba de tukey con un 95% de probabilidad, letras iguales no hay diferencia significativa.

En la figura 20 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 1:1.

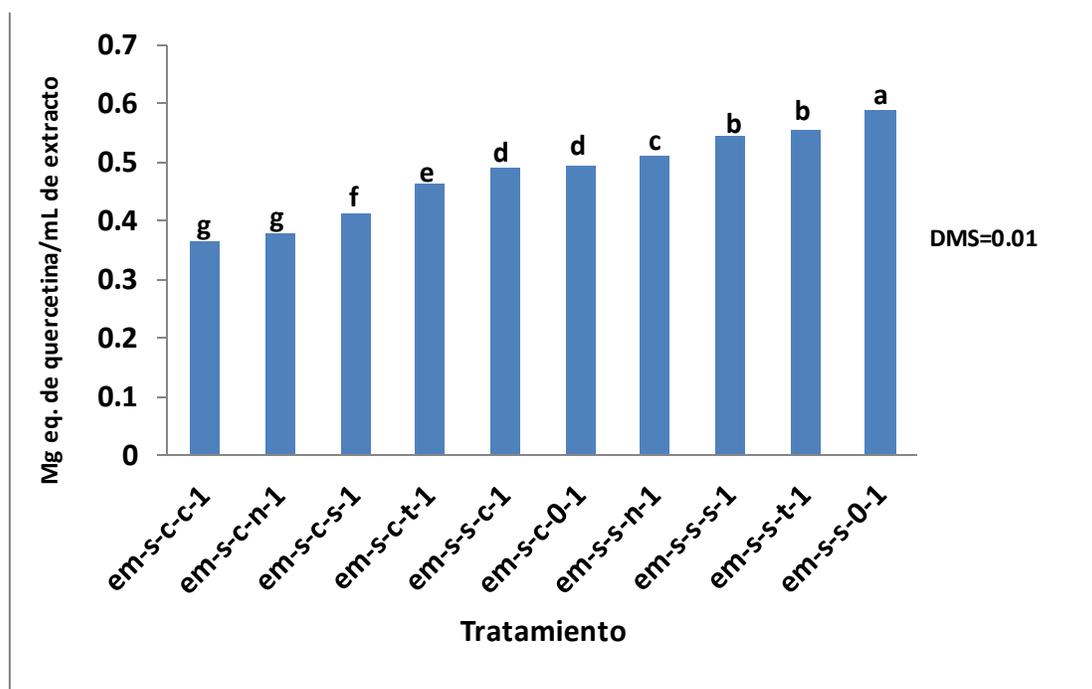


Figura 20. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto metanólico de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:1.

Observamos en los resultados de la figura 20 que el tratamiento del extracto metanólico de hojas secas sin exposición a la luz UV a un tiempo 0 (em-s-s-0-1), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto metanólico de hojas secas sin exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 7 a 39 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 21 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 1:2.

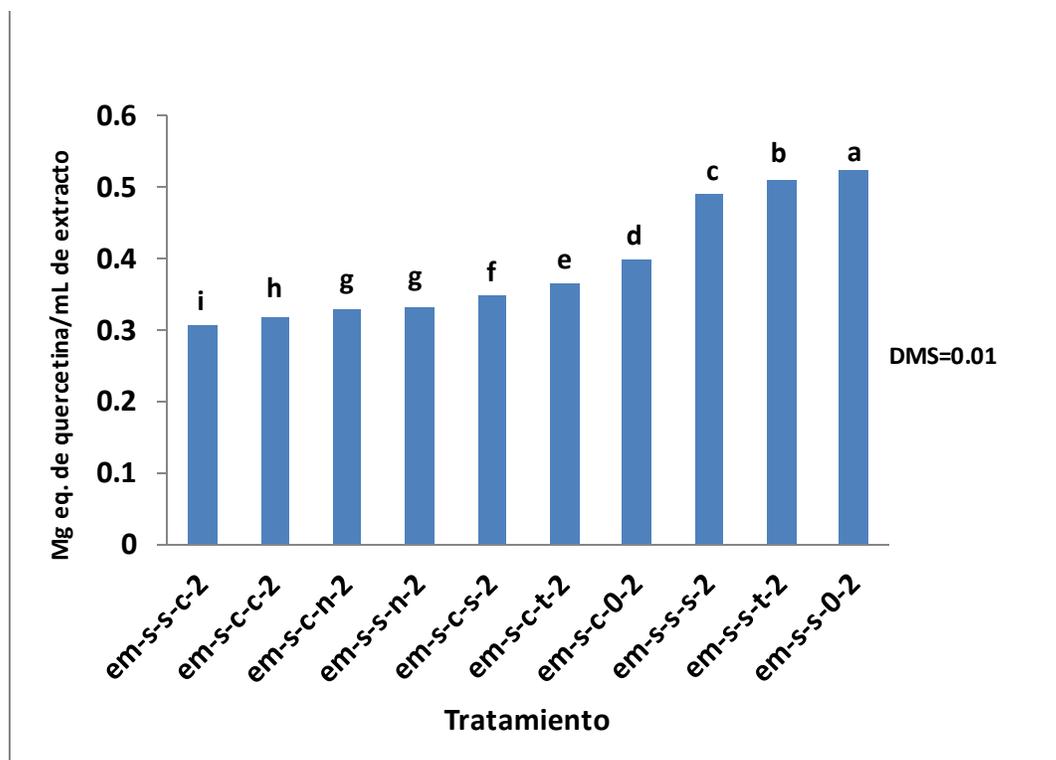


Figura 21. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto metanólico de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:2.

Observamos en los resultados de la figura 21 que el tratamiento del extracto metanólico de hojas secas sin exposición a la luz UV a un tiempo 0 minutos (em-s-s-0-2), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo sin exposición a la luz V disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto metanólico de secas sin exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 2 a 42 % comparado con los demás tratamientos.

Figura 22 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 1:3.

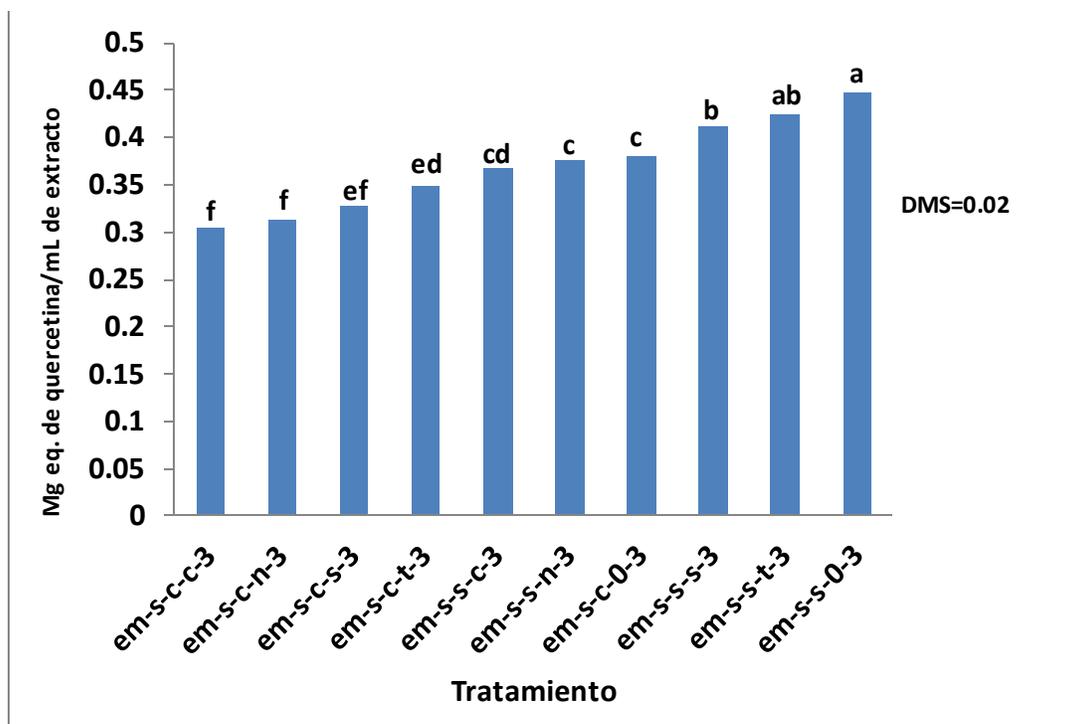


Figura 22. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto metanólico de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:3.

Observamos en los resultados de la figura 22 que el tratamiento del extracto metanólico de hojas secas sin exposición a la luz UV a un tiempo 0 (em-s-s-0-3) y 30 minutos (em-s-s-t-3), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto metanólico de secas sin exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 7 a 33 % más comparado con los demás tratamientos.

En la figura 23 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 1:4.

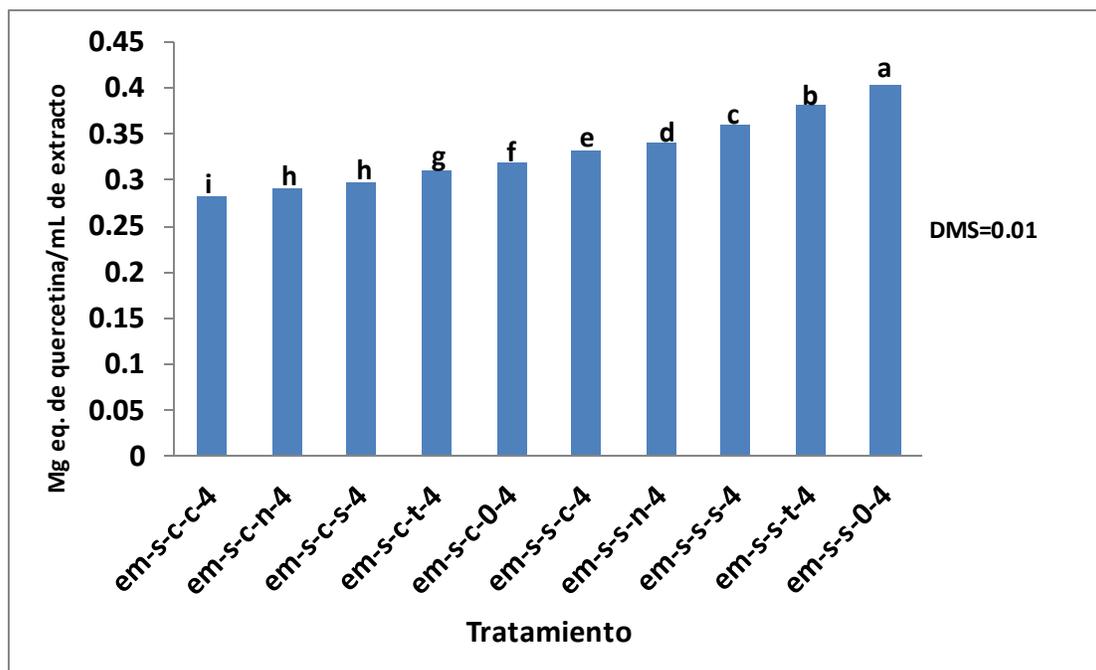


Figura 23. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto metanólico de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:4.

Observamos en los resultados de la figura 23 que el tratamiento del extracto metanólico de hojas secas sin exposición a la luz UV a un tiempo 0 minutos (em-s-0-4), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto metanólico de secas sin exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 5 a 30 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 24 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 1:10.

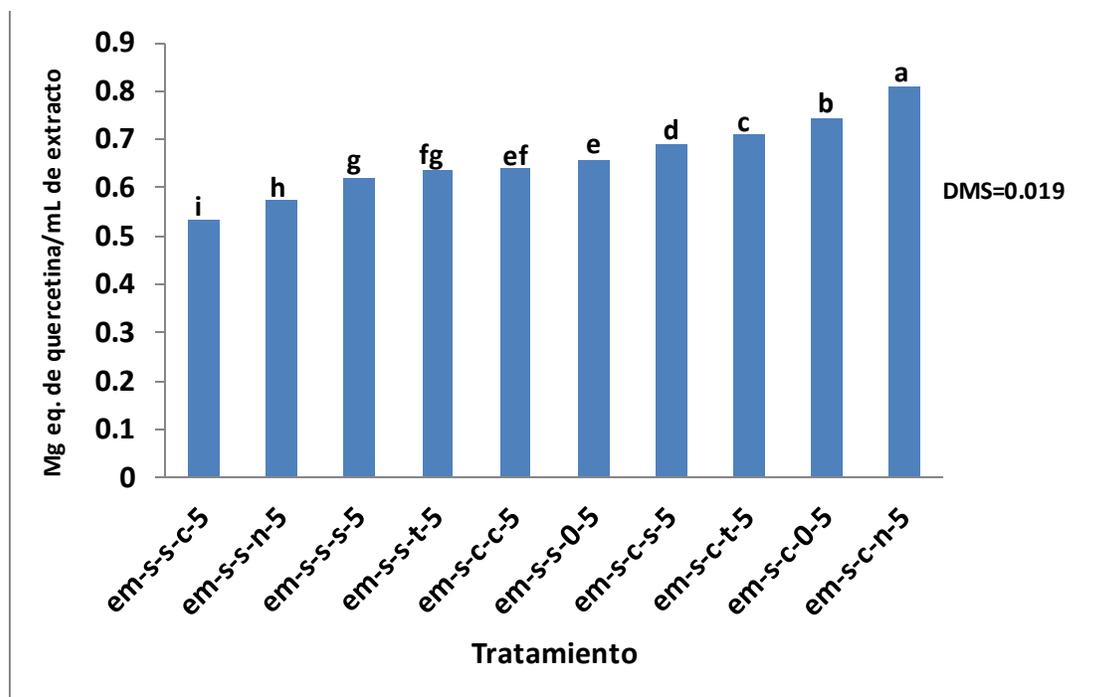


Figura 24. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto metanólico de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:10.

Observamos en los resultados de la figura 24 que el tratamiento del extracto metanólico de hojas secas con exposición a la luz UV a un tiempo 90 minutos (em-s-c-n-5), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo de sin exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto metanólico de secas con exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 7 a 34 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 25 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 2:10.

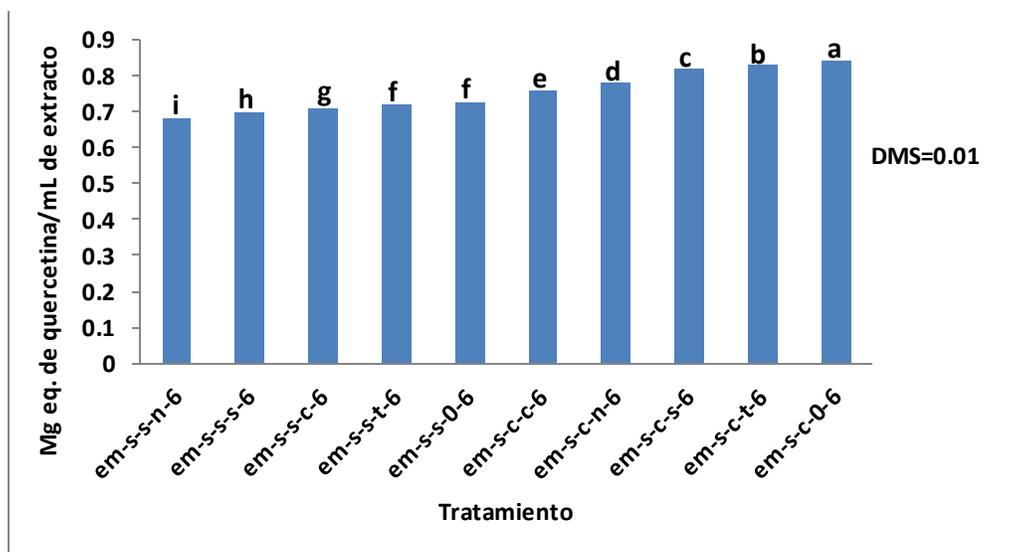


Figura 25. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto metanólico de hoja seca de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10.

Observamos en los resultados de la figura 25 que el tratamiento del extracto metanólico de hojas secas con exposición a la luz UV a un tiempo 0 minutos (em-s-c-0-6), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo sin exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto metanólico de hojas secas con exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 2 a 20 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 26 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 3:10.

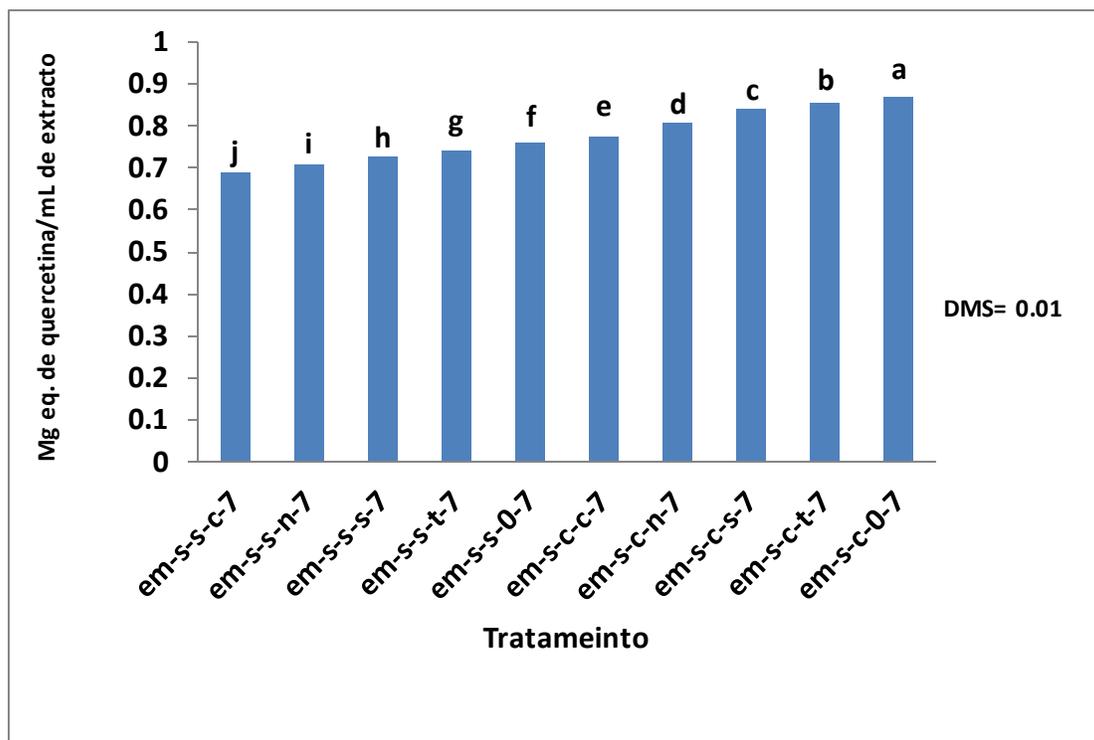


Figura 26. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto metanólico de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10.

Observamos en los resultados de la figura 26 que el tratamiento del extracto metanólico de hojas secas con exposición a la luz UV a un tiempo 0 minutos (em-s-c-0-7), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo sin exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto metanólico de secas con exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 2 a 22 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 27 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 4:10.

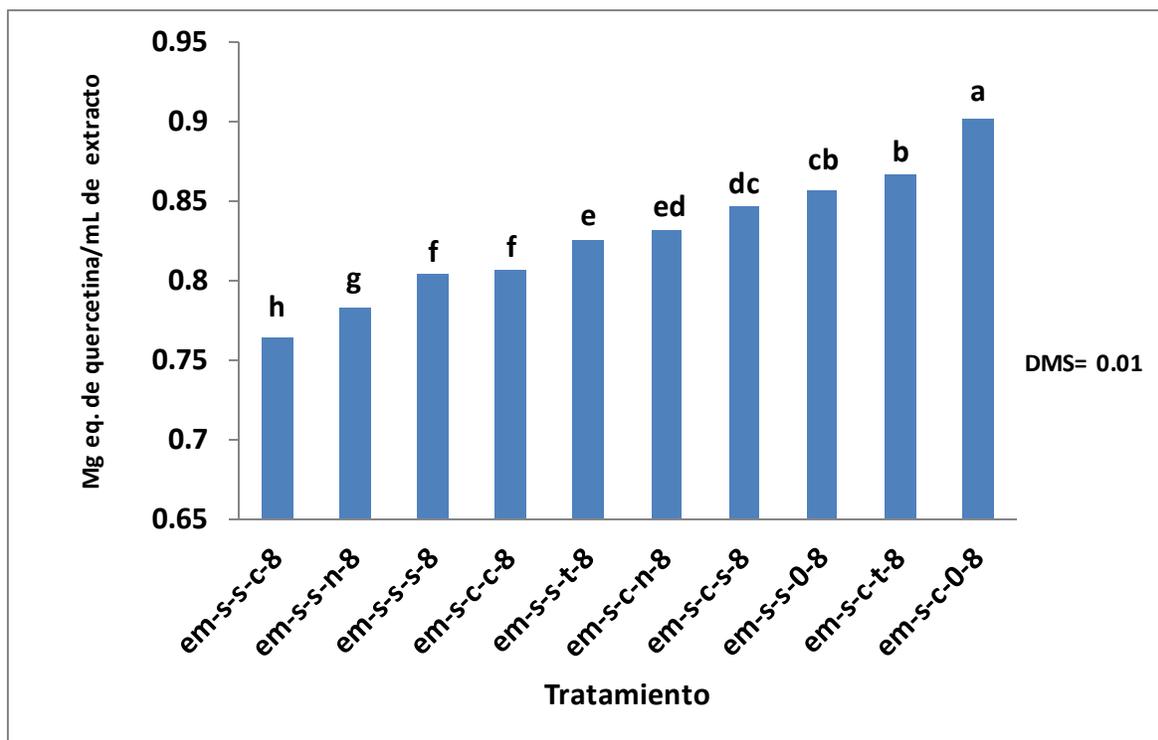


Figura 27. Análisis ANOVA simple para la concentración flavonoides en los tratamientos de extracto metanólico de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10.

Observamos en los resultados de la figura 27 que el tratamiento del extracto metanólico de hojas secas con exposición a la luz UV a un tiempo 0 minutos (em-s-c-0-8), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo sin exposición a la luz UV disminuye la concentración de flavonoides.

El valor de concentración de flavonoides del tratamiento de extracto metanólico de secas con exposición a luz UV al tiempo 0 fue del 3 a 15 % comparado con los demás tratamientos.

En las figuras siguientes se muestran los análisis estadísticos de los datos obtenidos de la producción de fenoles en extractos acuosos radiados con luz UV, a diferentes tiempos (cero (0), treinta (t), sesenta (s), noventa (n) y ciento veinte (c) utilizando el programa estatgraphic, con la prueba de tukey con un 95% de probabilidad, letras iguales no hay diferencia significativa.

En la figura 28 se muestran los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 1:1.

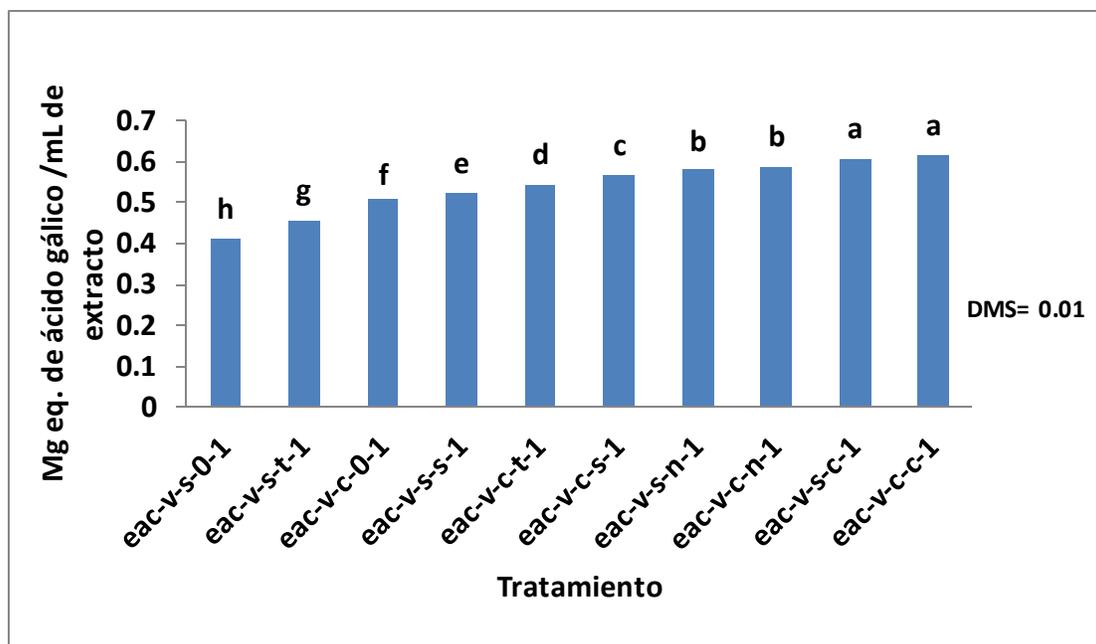


Figura 28. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:1.

Observamos en los resultados de la figura 28 que el tratamiento del extracto acuoso con exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (eac-v-c-c-1) y 120 minutos (eac-v-s-c-1) mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo con exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto acuoso con exposición a luz UV al tiempo 60 fue del 1% al 1 % comparado con los demás tratamientos.

En la figura 29 se muestran los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 1:2.

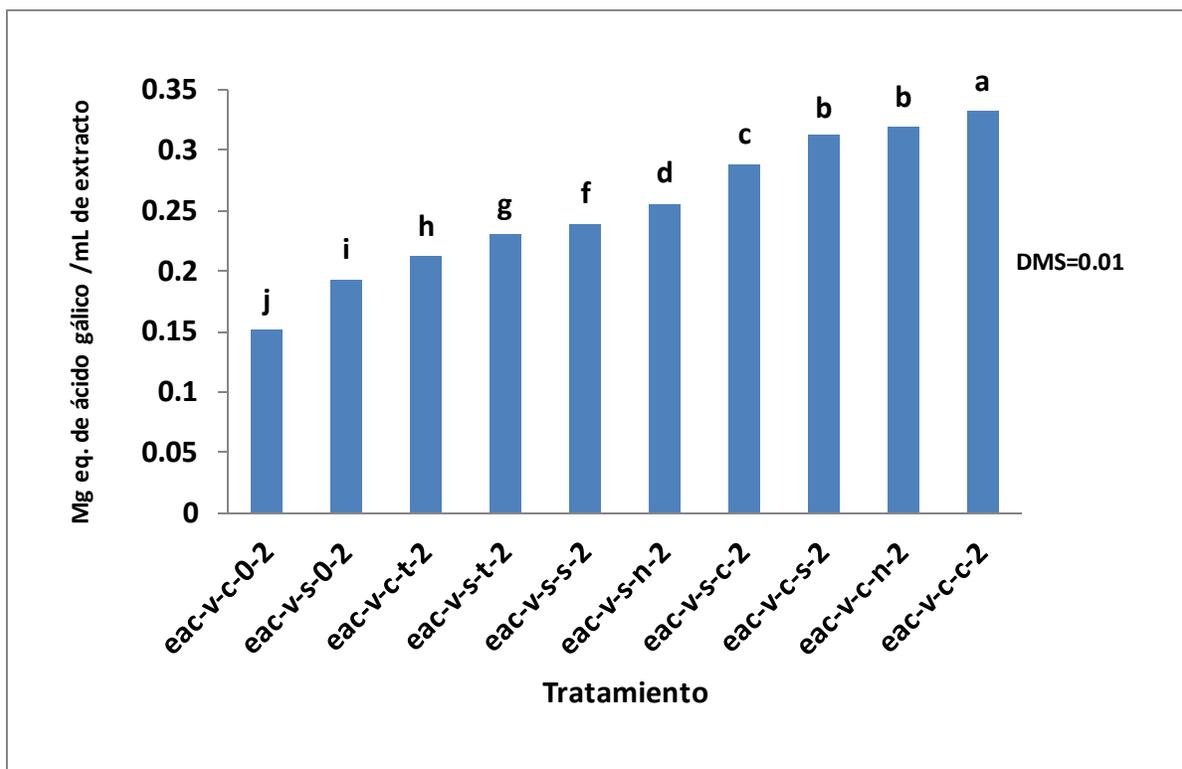


Figura 29. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:2.

Observamos en los resultados de la figura 29 que el tratamiento del extracto acuoso de hojas verdes con exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (eac-v-c-c-2), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo con exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto acuoso con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 4% al 54% comparado con los demás tratamientos.

En la figura 30 se muestran los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 1:3.

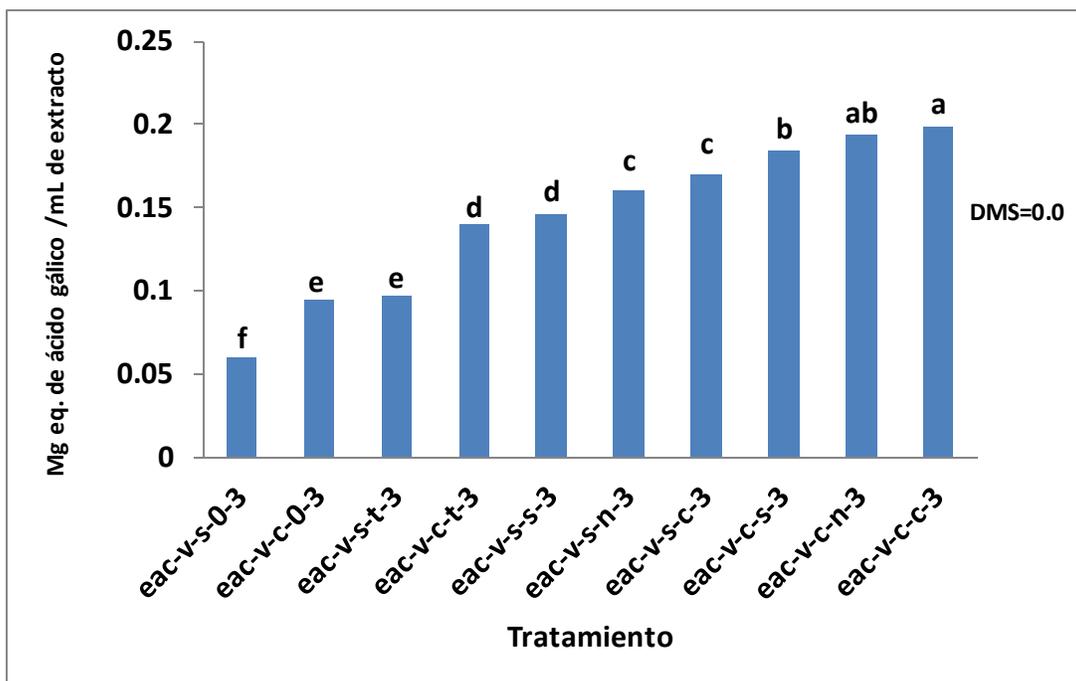


Figura 30. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:3.

Observamos en los resultados de la figura 30 que el tratamiento del extracto acuoso de hojas verdes con exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (eac-v-c-c-3) y 90 minutos (eac-v-c-n-3) mostró diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo sin exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto acuoso con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 2.5% al 73% comparado con los demás tratamientos.

En la figura 31 se muestran los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 1:4.

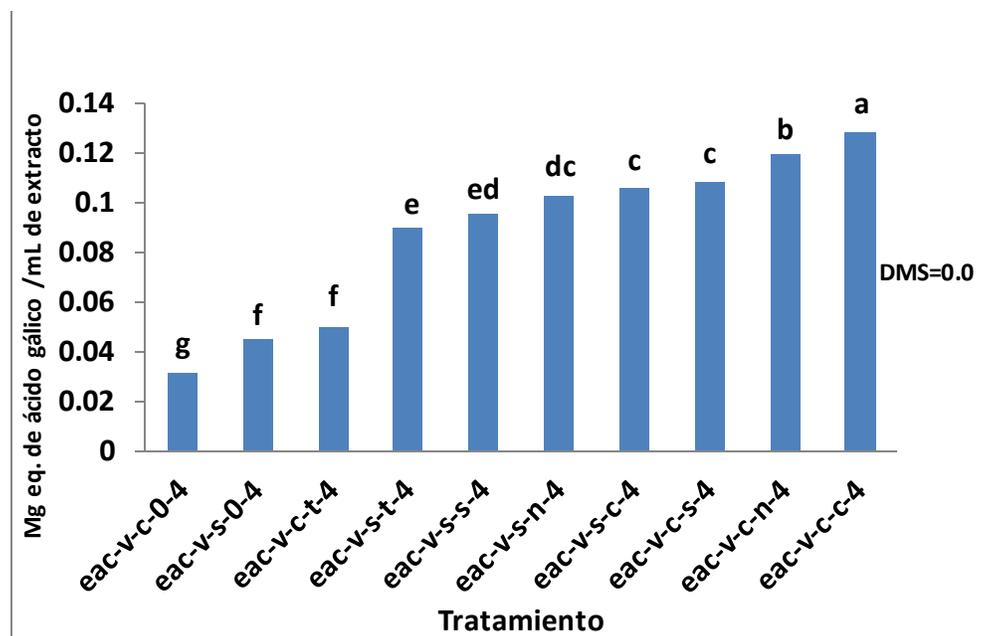


Figura 31. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:4.

Observamos en los resultados de la figura 31 que el tratamiento del extracto acuoso de hojas verde con exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (eac-v-c-c-4), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo con exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto acuoso con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 7% al 75% comparado con los demás tratamientos.

En la figura 32 se muestran los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 1:10.

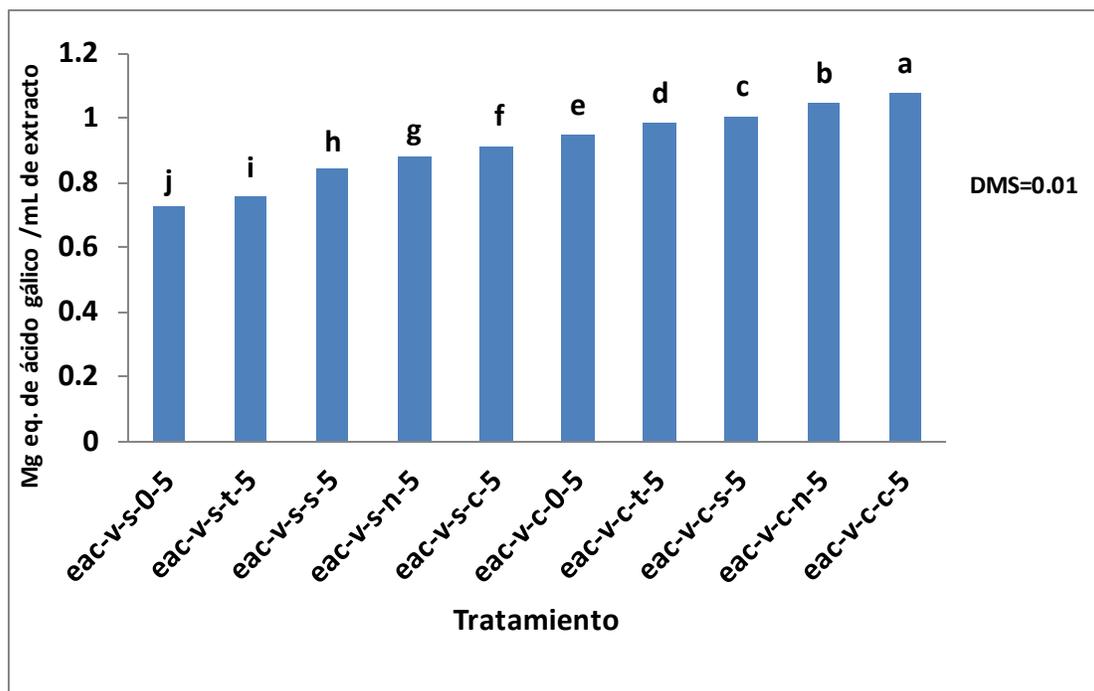


Figura 32. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:10.

Observamos en los resultados de la figura 32 que el tratamiento del extracto acuoso con exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (eac-v-c-c-5), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo con exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto acuoso con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 3% al 32% comparado con los demás tratamientos.

En la figura 33 se muestran los resultados de los extractos acuosos en hojas verdes a concentración 2:10.

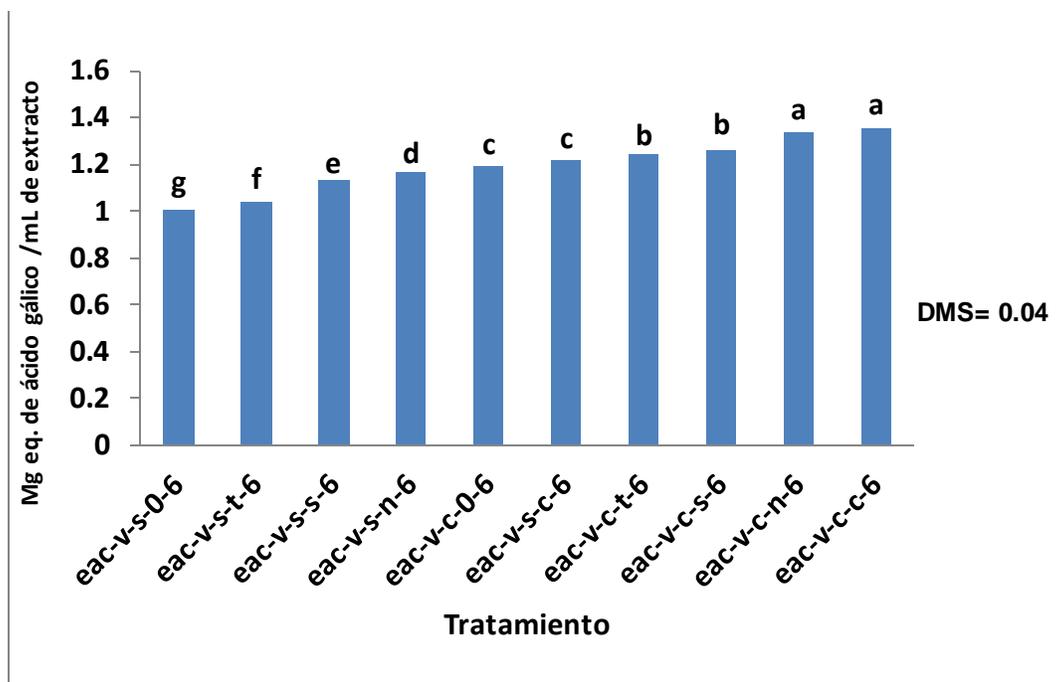


Figura 33. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10.

Observamos en los resultados de la figura 33 que el tratamiento del extracto acuoso de las hojas verde radiadas con luz ultravioleta durante un tiempo de 90 minutos (eac-v-c-c-6) y 120 minutos (eac-v-c-n-6), mostro diferencia significativa con respecto a los otros extractos radiados a menor tiempo.

Observamos también que a medida que extracto recibe menos tiempo exposición a la luz UV disminuye la concentración de fenoles, por lo que observamos que en las muestras sin exposición a la luz violeta presentaron las menores concentraciones de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto acuoso con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 8% al 26% comparado con los demás tratamientos.

En la figura 34 se muestran los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 3:10.

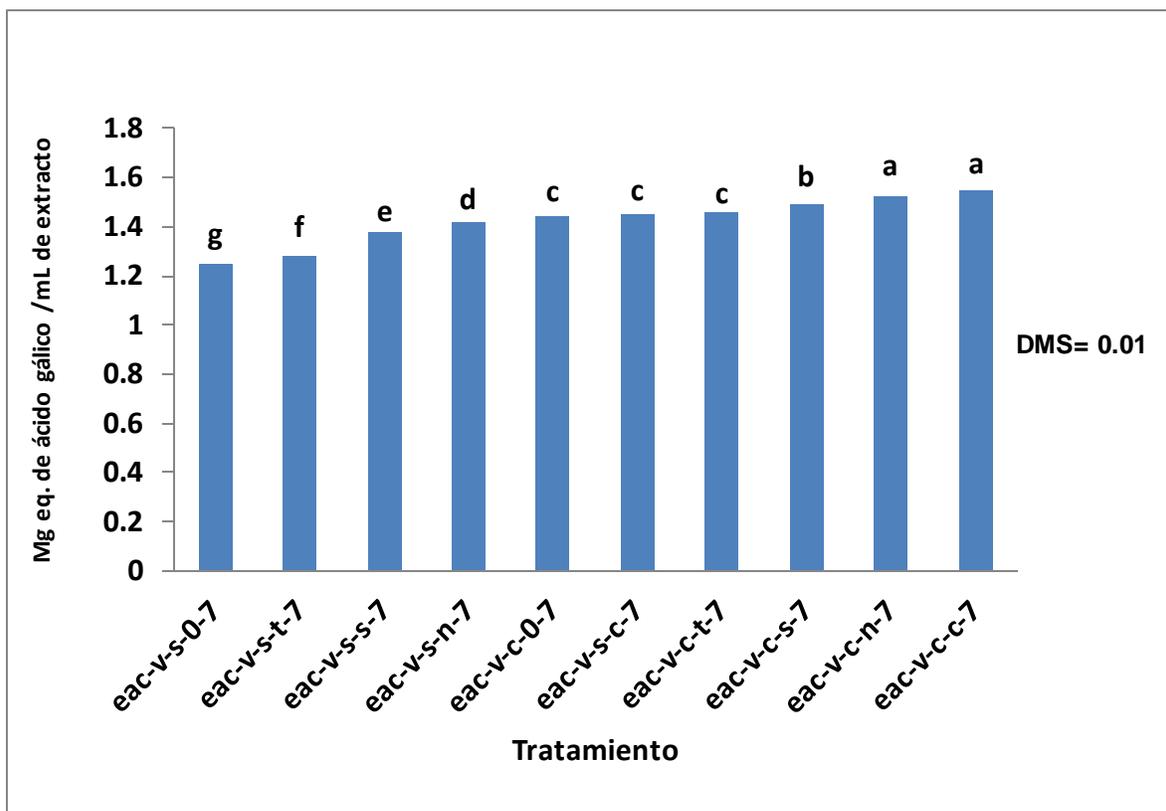


Figura 34. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10.

Observamos en los resultados de la figura 34 que el tratamiento del extracto acuoso con exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (eac-v-c-c-7) y 90 minutos (eac-v-c-n-7) mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo con exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto acuoso con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 1% al 19% comparado con los demás tratamientos.

En la figura 35 se muestran los resultados de los extractos acuosos de hojas verdes a concentración 4:10.

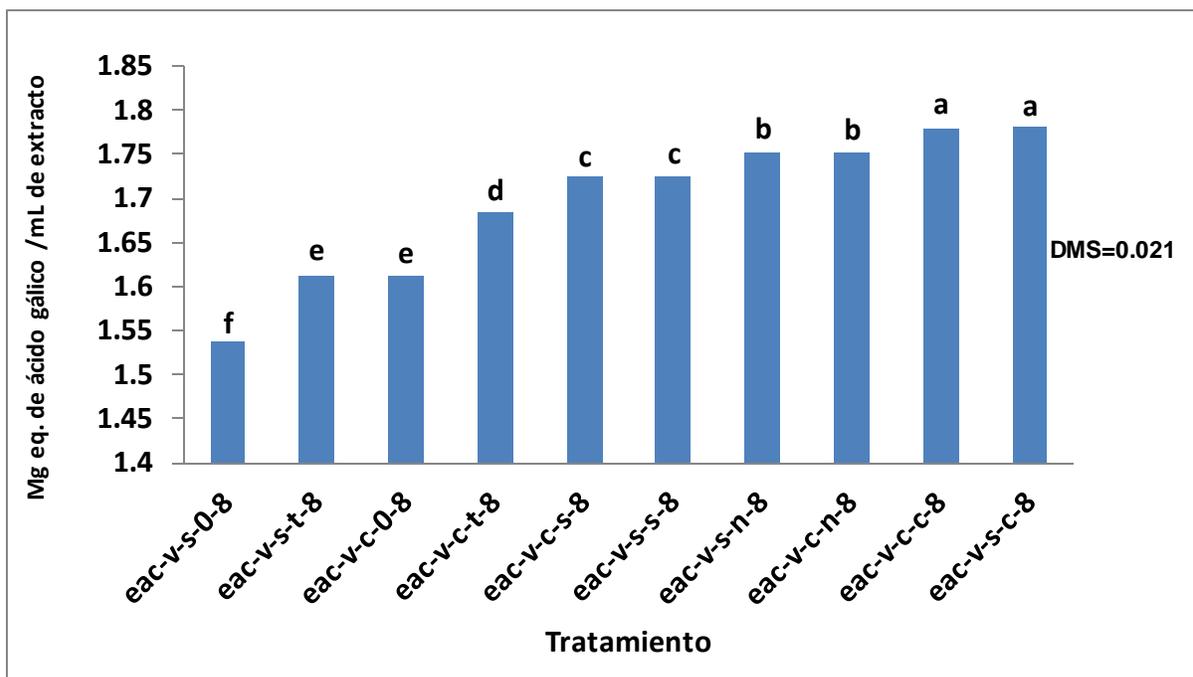


Figura 35. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto acuoso de hojas verdes de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10.

Observamos en los resultados de la figura 35 que el tratamiento del extracto acuoso sin exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (eac-v-s-c-8) y 120 minutos (eac-v-c-c), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos.

Observamos también que a menor exposición a la luz UV disminuye la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto acuoso con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 1% al 14% comparado con los demás tratamientos.

En las figuras siguientes se muestran los análisis estadísticos de los datos obtenidos de la producción de fenoles en extractos metanólicos radiados con luz UV, a diferentes tiempos (cero (0), treinta (t), sesenta (s), noventa (n) y ciento veinte (c) utilizando el programa estatgraphic, con la prueba de tukey con un 95% de probabilidad, letras iguales no hay diferencia significativa.

En la figura 36 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 1:1.

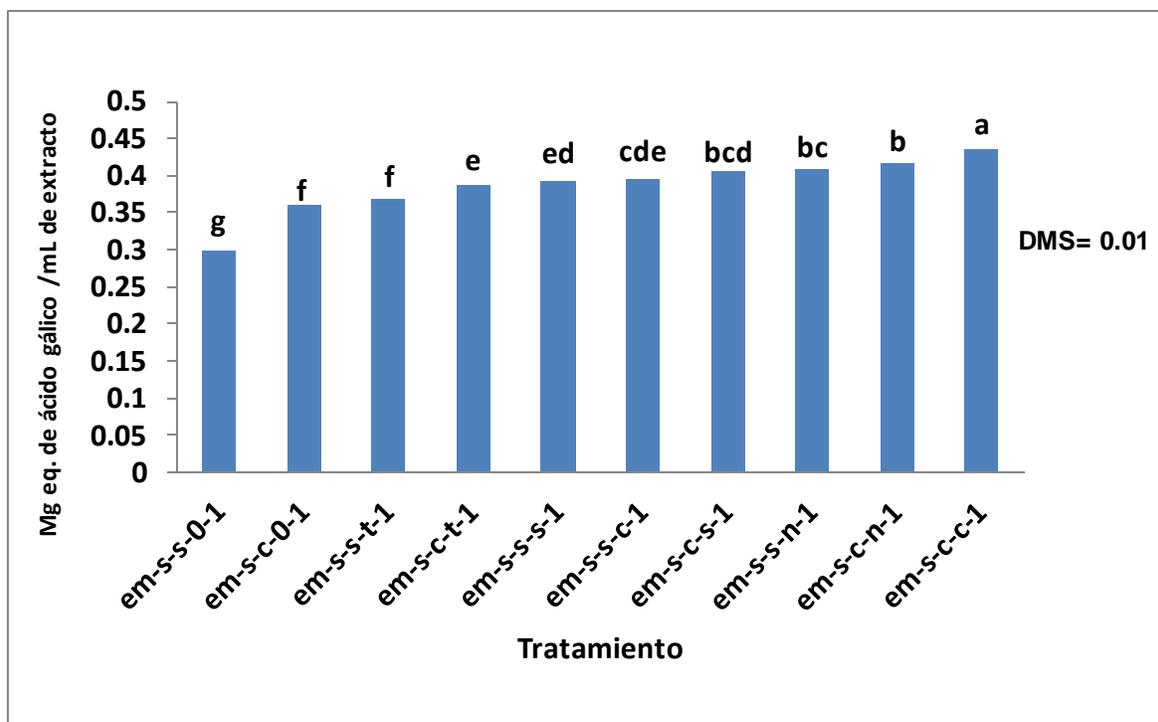


Figura 36. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:1.

Observamos en los resultados de la figura 36 que el tratamiento del extracto metanólico con exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (em-s-c-c-1), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo son exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto metanólico en hojas secas con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 5% al 32% con los demás tratamientos.

En la figura 37 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 1:2.

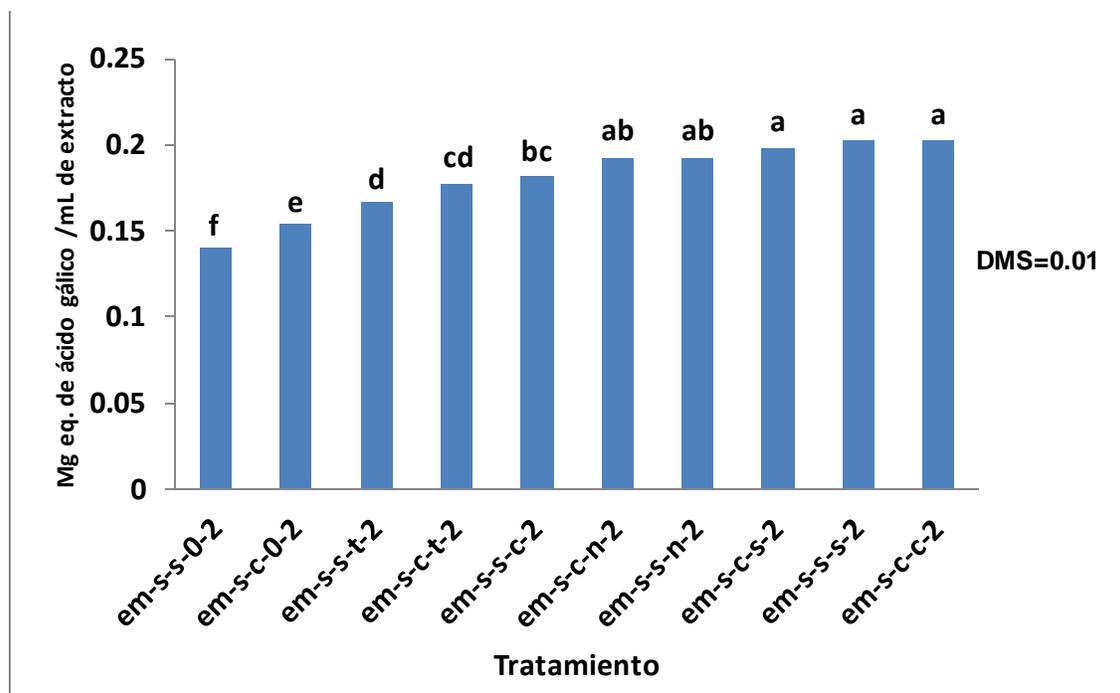


Figura 37. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólico de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:2.

Observamos en los resultados de la figura 37 que el tratamiento del extracto metanólico en hoja seca con exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (em-s-c-c-2), 60 minutos (em-s-s-s-2), 60 minutos (em-s-c-s-2), 90 minutos (em-s-sn-2) y 90 minutos em-s-s-n-2), mostró diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo con exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto metanólico en hojas secas con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 1% al 30% más producción de fenoles.

En la figura 38 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas a concentración 1:3.

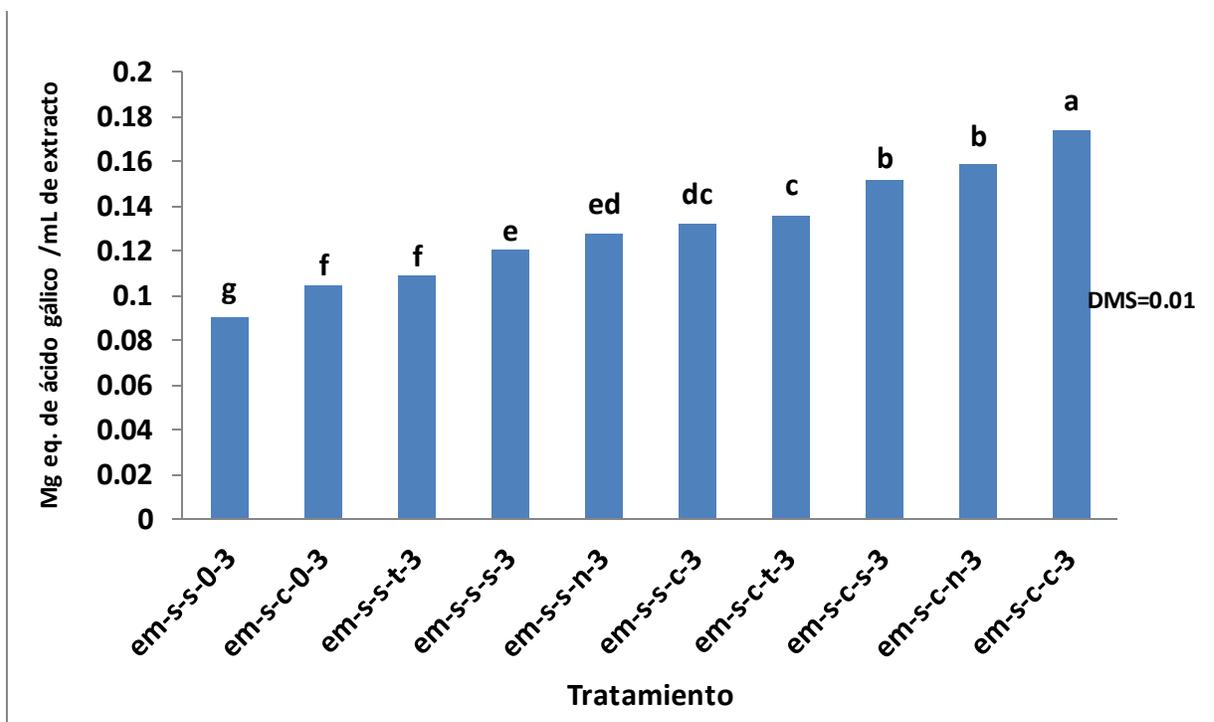
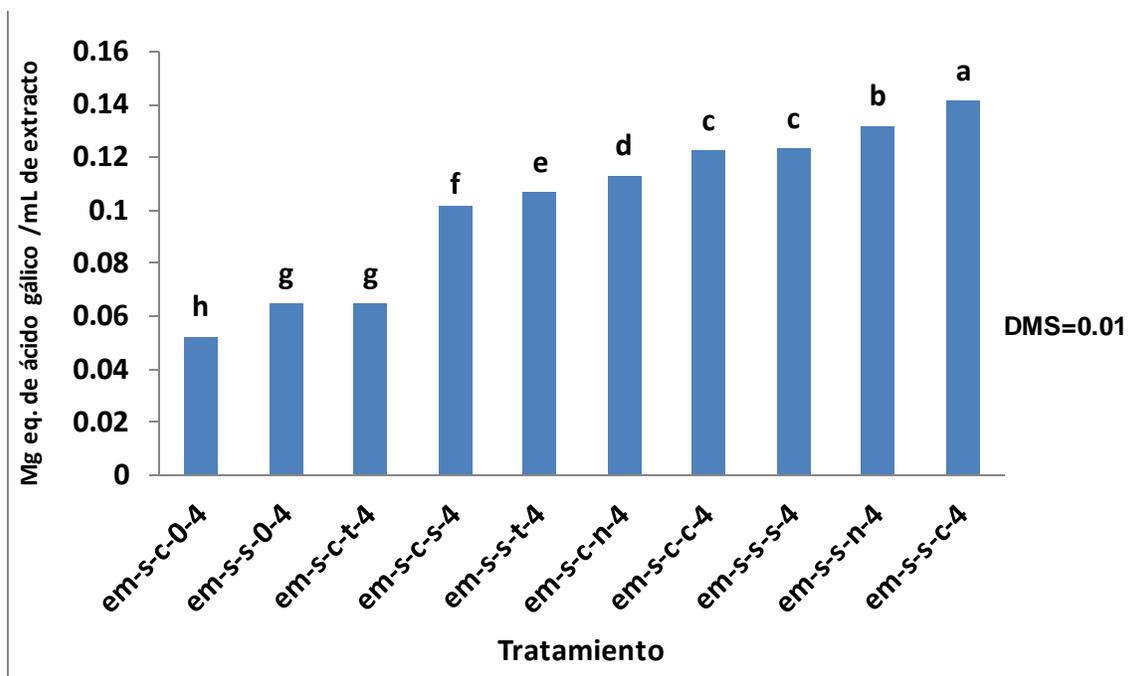


Figura 38. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:3.

Observamos en los resultados de la figura 38 que el tratamiento del extracto metanólico en hoja seca con exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (em-s-c-c-3), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo con exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto metanólico en hojas secas con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 11% al 52% comparado con los demás tratamientos.

En la figura 39 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 1:4.

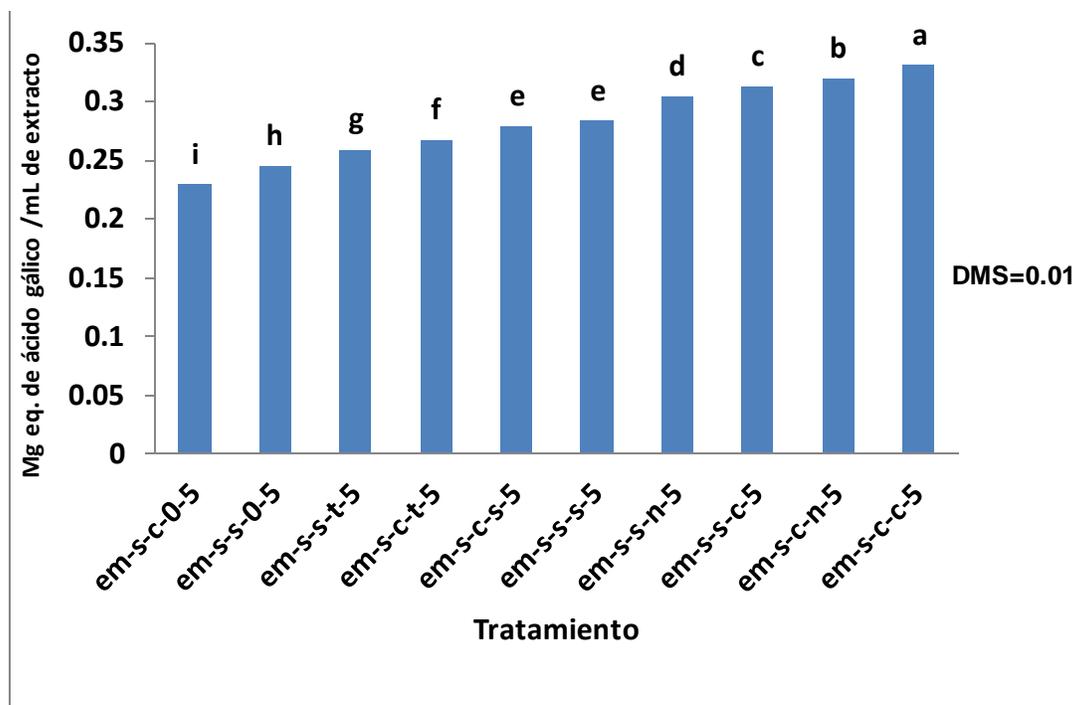


En la figura 39. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:4.

Observamos en los resultados de la figura 39 que el tratamiento del extracto metanólicos en hoja seca sin exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (em-s-s-c-4), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo con exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto metanólico en hojas secas con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 7% al 64% comparado con los demás tratamientos.

En la figura 40 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 1:10.

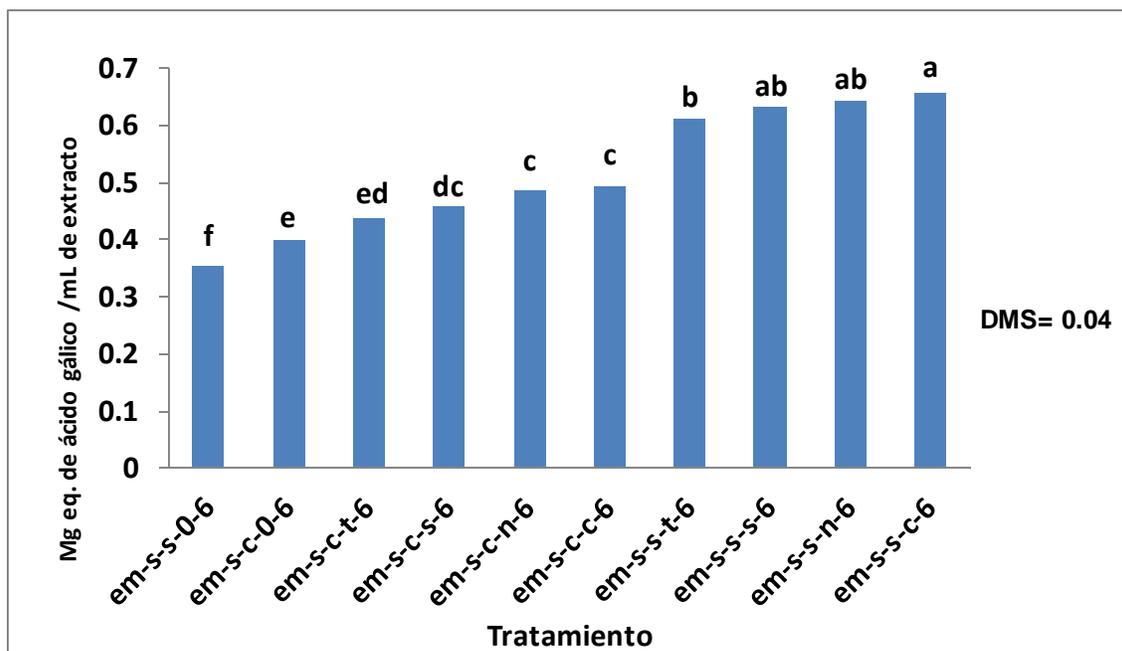


En la figura 40. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólico de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 1:10.

Observamos en los resultados de la figura 40 que el tratamiento del extracto metanólico en hoja seca sin exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (em-s-c-c-5), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo con exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto metanólico en hojas secas con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 3% al 33% comparado con los demás tratamientos.

En la figura 41 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 2:10.



En la figura 41. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 2:10.

Observamos en los resultados de la figura 41 que el tratamiento del extracto metanólico en hoja seca sin exposición a la luz UV a un tiempo 120 (em-s-s-c-6), 90 minutos (em-s-s-n-6), sesenta minutos (em-s-s-s-6), mostró diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo sin exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto metanólico en hojas secas con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 2% al 46% comparado con los demás tratamientos.

En la figura 42 se muestran los resultados de los extractos metanólico de hojas secas a concentración 3:10.

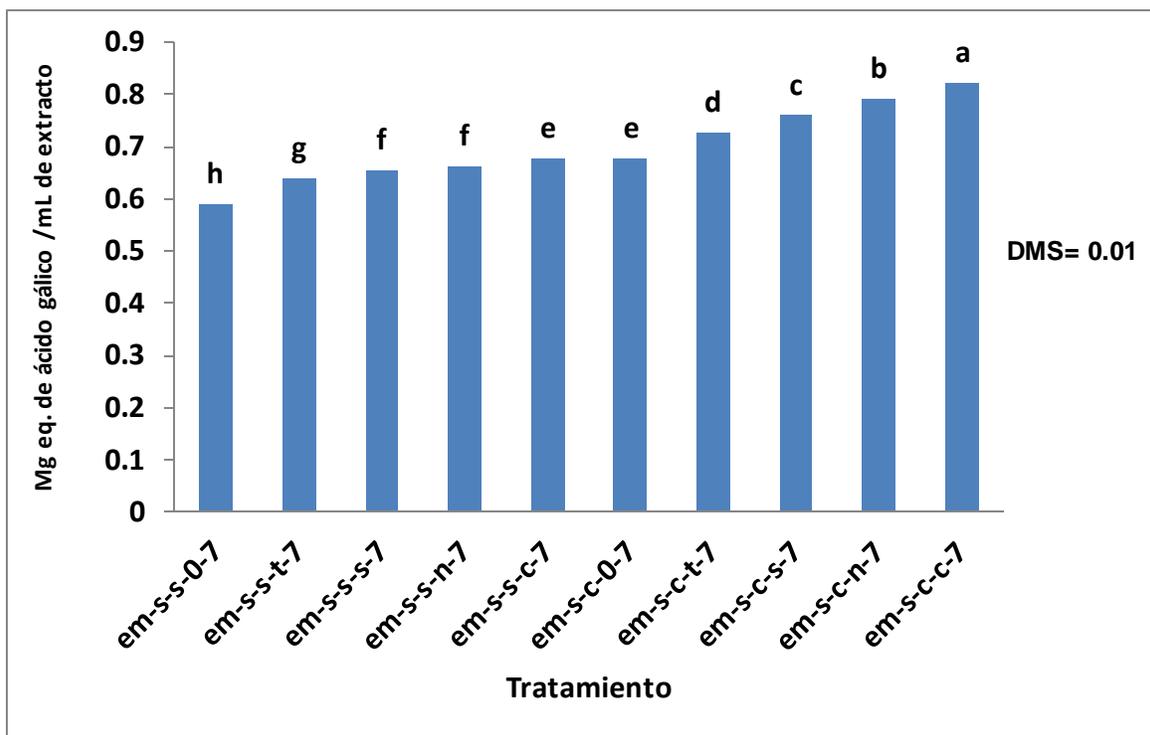


Figura 42. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 3:10.

Observamos en los resultados de la figura 42 que el tratamiento del extracto metanólico en hoja seca con exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (em-s-c-c-7), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo con exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto metanólico en hojas secas con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 4% al 28% comparado con los demás tratamientos.

En la figura 43 se muestran los resultados de los extractos metanólicos de hojas secas a concentración 4:10.

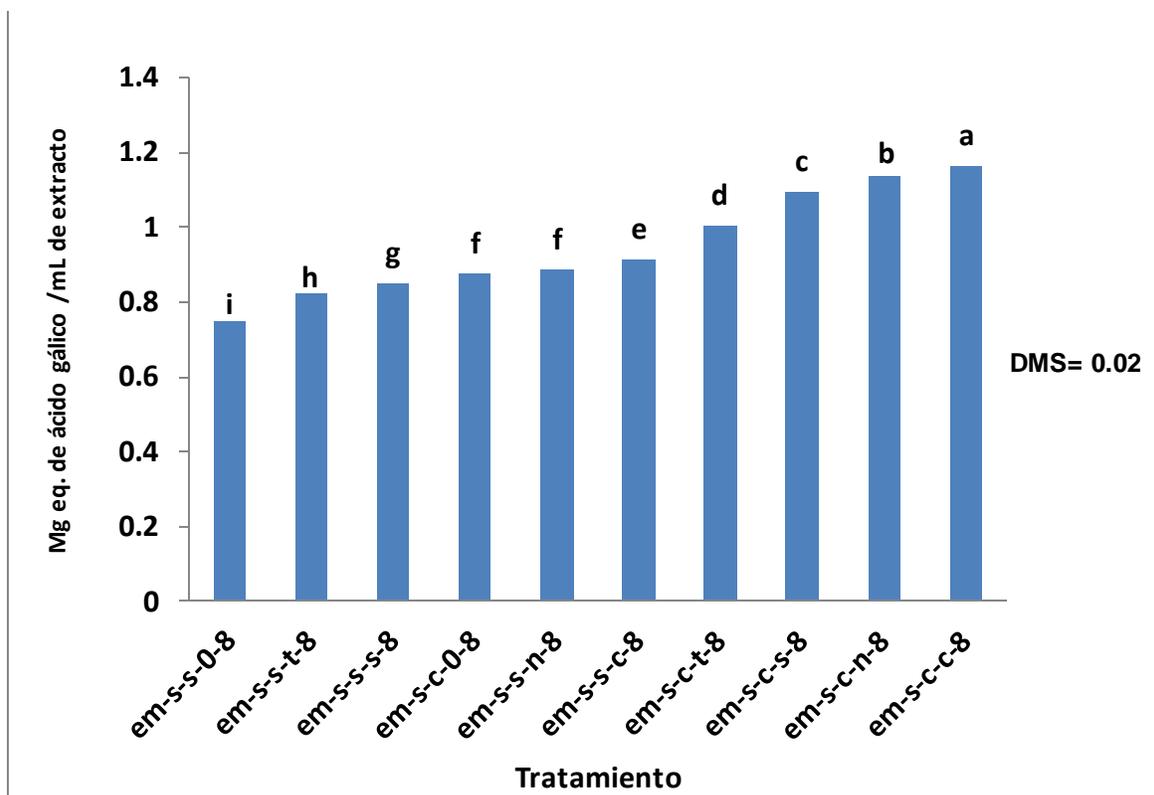


Figura 43. Análisis ANOVA simple para la concentración fenoles en los tratamientos de extracto metanólicos de hojas secas de neem, a diferentes tiempos de exposición de luz UV con la concentración 4:10.

Observamos en los resultados de la figura 43 que el tratamiento del extracto metanólico en hojas secas con exposición a la luz UV a un tiempo 120 minutos (em-s-c-c-8), mostro diferencia significativa con respecto a todos los otros tratamientos. Observamos también que a medida que aumenta el tiempo con exposición a la luz UV aumenta la concentración de fenoles.

El valor de concentración de fenoles del tratamiento de extracto metanólico en hojas secas con exposición a luz UV al tiempo 120 fue del 3% al 36 % comparado con los demás tratamientos.

CAPITULO VI

DISCUSIÓN

Por lo anteriormente expuesto, los resultados obtenidos en esta investigación pueden ser explicados, que los extractos metanólicos de hojas secas encontramos una mayor cantidad de compuestos fenólicos que los extractos acuosos de hojas frescas del mismo árbol neem. En las figuras 28 y la figura 43, se observó que a medida que los extractos son expuestos por mayor tiempo a luz ultravioleta aumentan la cantidad de fenoles.

Singh et al., 2010, Costa y cols., 2010 Investigaciones realizadas con la hoja de repollo expuestas a luz ultravioleta obtuvieron un aumento de fenoles. Es posible que esto se deba a la formación de compuestos derivados de fenoles como son los fenilpropanoides, que las plantas sintetizan en respuestas a la exposición de luz ultravioleta, debido a mecanismo de protección de tejidos a la radiación excesiva.

CALDWELL et al., 1983, encontraron en sus estudios, uno de los mecanismos de adaptación a radiación UV-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. Hofmann et al., 2000, la acumulación de flavonoides, frecuentemente observada en respuesta a radiación ultravioleta-B, también ha sido relacionada con su potencial acción antioxidante frente a radicales libres.

LI, et al., 1993, encontraron que la radiación ultravioleta está íntimamente relacionada con la eficiencia que presentan las enzimas que participan en la biosíntesis de los fenilpropanoides y entre ellos los flavonoides tales como la fenilamonio liasa (PAL), chalcona sintetasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI).

Ryan et al. 2002, en trabajos realizados en hojas de petunia se demuestra que la luz ultravioleta-B induce la síntesis de flavonoles debido a la sobre-regulación de distintos genes que participan en la síntesis de los fenilpropanoides.

Costa et al., 2006, por otro lado, en floretes de brócoli y hojas de frijol, se observó un incremento en el contenido de flavonoides totales después del tratamiento ultravioleta.

(Landry et al., 1995) (Ryan, K.G.; et, al 2001) en su estudio que al comparar la producción de flavonoides entre la variedad salvaje de petunia y el mutante *F3'H* deficiente en la enzima flavonoide 3'-hidroxilasa se observó bajo alta radiación UV-B un aumento de flavonoides en la línea tipo salvaje (con predominancia de dihidroquercetina) respecto del mutante *F3 'H* en donde el contenido de flavonoides disminuyó significativamente (con predominancia del kaempferol). La enzima flavonoide 3'-hidroxilasa es la encargada de convertir al flavonol monohidroxilado denominado dihidrokaempferol a un tipo de flavonol dihidroxilado conocido como dihidroquercetina. Con este estudio se establece que los flavonoides inducidos por radiación ultravioleta-B presentan altos niveles de hidroxilación y que la enzima flavonoide 3'-hidroxilasa sobrerregula todos los genes que participan en la biosíntesis de los flavonoides, como lo documentan otras investigaciones.

Rozema, J. et al., 2002 trabajos realizados en hojas de *Arabidopsis* L. tipo salvaje, mostraron que al exponer estas plantas a bajos niveles de radiación ultravioleta-B, el contenido de kaempferol es superior al de quercetina. Sin embargo, bajo condiciones de alta radiación UV-B el contenido de flavonoides se duplica con un mayor aumento de quercetina respecto de kaempferol. Estos resultados reafirman que los flavonoides protegen a las plantas de *Arabidopsis* del daño por radiación ultravioleta-B e indican que la enzima flavonoide 3'-hidroxilasa (*F3 'H*) juega un rol crucial en esta respuesta a la luz UV-B. Los autores también concluyen que la quercetina es un fotoprotector más eficiente que el kaempferol y de mayor capacidad antioxidante.

Sin embargo, en este presente trabajo en las figuras representadas del número 12 al 27 indican que conforme aumenta el tiempo a la exposición de la luz ultravioleta los flavonoides tienden a disminuir.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

Podemos concluir que los extractos acuosos de hojas frescas y extractos metanólicos de hojas secas hechos a base de las hojas de neem (*Azadirachta Indica*) que fueron expuestas a la radiación ultra violeta en diferentes intervalos de tiempos, presentan un aumento en las concentraciones de los fenoles conforme mayor es el tiempo de exposición.

En el presente estudio encontramos que la concentración de los flavonoides disminuye cuando los extractos de hoja frescas y secas de neem (*Azadirachta Indica*) son expuestas a radiaciones ultra violeta conforme aumenta el tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Barabás K.N., Szegletes Z, Pestenác A., Fülöp K., Erdei, L. **1998**. Effects of excess UV-B irradiation on the antioxidant defence mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *J Plant Physiol* 153: 146-153.

Biswas K., Chattopadhyay I., Banerjee R.K., Bandyopadhyay, U. **2002** Biological activities and medicinal properties o.f 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.

Cache Worksystem Pro 6.1, Fujitsu Ltd. **2002-2003**.

Cartaya, O., Reynaldo, Inés. **2001**. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, vol. 22, 5-14.

Caldwell, M.M., Robberecht, R., Flint, S.D. **1983**. Internal filters: Prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiol Plant* 58 (3): 445-450.

Chang C., Yang M., Wen H., Hern J. C., **2002** Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10:176–182.

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

Chattopadhyay R.R., Chattopadhyay R.N., Nandy A.K., Podder G., Maitra S.K. **1987a**. Antiinflammatory activity of a fraction of fresh leaves of *Azadirachta indica* (Beng. Neem) *Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine* 35:6-8.

Chattopadhyay R.R., Chattopadhyay R.N., Nandy A.K., Podder G. and Maitra S.K. **1987b**. Preliminary report on antihyperglycemic effect of a fraction of fresh leaves of *Azadirachta indica* (Beng. Neem). *Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine* 35, 29 – 35.

Chattopadhyay R. **1993** Effect of *Azadirachta indica* leaf extract on oestrous cycle of rats. *Environment and Ecology*, 11(4):958 – 960.

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. 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., y Martínez G. A. **2006**. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*. 39: 204-210.

Cruz F.M. **1998**. Dinámica de la azadiractina en árboles de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) de México y su efecto contra dos insectos de almacén. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Marín, N.L. 73 p.

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.

Dixon R.A., Steele C.L. **1999**. Flavonoids and isoflavonoids: a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 4(10):394-400.

Dunkel, F. V., A. Serugendo, W. M. Breene, and S. Sriharan. **2007**. Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38, 47.

Girish, k., Shankara B.S. **2008**. Neem a green treasure, *Electronic Journal of Biology*, pp.102-111.

Gómez de Enciso, C. **2012**. Ecofisiología en hortalizas. pp. 55-72. En: Pinzón, H. (ed.). *Manual para el cultivo de hortalizas*. Produmedios, Bogotá.

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.

Hofmann, r.w.; Swinny, E.E.; Bloor, SJ; Markham, K.R.; Ryan, K.G.; Campbell, B.D.; Jordán, B.R.; Fountain, D.W. **2000**. Responses of nine *Trifolium repens* L. populations to ultraviolet-B radiation: differential flavonol glycoside accumulation and biomass production. *Ann Bot* 86 (3): 527-537.

Hollosy, F., **2002**. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33: 179-197.

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.

INIFAP. **1999**. Informe Anual de Actividades del Area Forestal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Dirección General de Investigación Forestal. México, D.F. p46.

Jianming D., Varoujan A.Y., Raghavan V.G.S., Jocelyn R.P. **1999**. Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. *J Agric Food Chem.* 47: 3738-42.

Jorge Alejandro Domínguez 1985. *Métodos de investigación fitoquímica*. México: Editorial Limusa.

Kanungo, D. **1996**. In *Neem* (eds Randhawa and Parmar, B. S.), 2nd edn, 77–110.

Kirtikar, K. R. and Basu, B. D. **1931**. *Indian Medicinal Plants*, Lalitha Mohan Basu, Allahabad, 2nd edición, p. 536.

Landry, I.G.; Chapple, C.C.S.; Last, R.I. **1995.68**. *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* 109 (4): 1159-1166.

Lunau k. **1992**. A new recognition of flowers by bumblebees (*Bombus terrestris*, *B. locorum*; *Apidae*) - Optical signals from stamens as landing reaction releasers. *Ethology* 88: 203 -214.

Leos M.J., R.P. Salazar S. **2002** .The insecticide Neem tree *Azadirachta indica* A. Juss in México. Universidad Autónoma de Nuevo León. Agronomy Faculty. Tech. Brochure 3. Marín, N.L. México.

Li, J.; OU-LEE, T.M.; Raba, R.; Amundson, R.G. **1993**. Last RL. *Arabidopsis* flavonoid mutants are hyper-sensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5 (2): 171-179.

Major Types. **2011** Of Chemical Compounds In Plants & Animals: Part II Flavonoids.

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.

Mitra, C. R. **1963**. Neem Indian Central Oil seeds Committee, Patel M. S. Hyderabad, 69–94.

Moreno, M.I. **1996**. The Neem tree *Azadirachta indica* A. Juss in the Southern Sonora, México. Tech. Rpt. Yaqui Valley Experimental Field-INIFAP. Ciudad Obregón, Sonora, México.

Musil, C.F., Chimphango, S.B.M., y Dakora, F.D. **2002**. «Effects of elevated ultraviolet-b radiation of native and cultivated plants of southern africa». *Annals of botany*, 90, 127-137.

Osuna, L.E. **2000**. Producción de plantas y establecimiento y manejo de plantaciones de neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias-INIFAP. Centro de Investigación Regional del Noroeste-CIRNO. Campo Experimental Todos Santos-CETS. Folleto Técnico Núm. 5. México.

Quevedo, O., R. Crozzoli., G. Perichi. **2010**. Uso de extractos acuosos y etanólicos de plantas para el control de *Meloidogyne enterolobii* (Nematoda: Tylenchida). *Fitopatología Venezolana* 23(2):45- 53.

Ryan, K.G.; Swinny, E.E.; Markham K.R.; Winefield, C. **2002**. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* 59 (1): 23-32.

Ryan, K.G.; Swinny, E.E.; Winefield, C.; 85. Markham, K.R. **2001**. Flavonoids and UV photoprotection in *Arabidopsis* mutants. *Z Naturforsch* 56 (1): 745-754.

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., 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”. *Trends in Food Science & Technology*. pp. 401-413.

Slinkard, K.; Singleton, V. L. **1977**. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49-55.

I Simposio Internacional de Invernaderos - **2007 – México.**

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

Spencer, Abd el Mohsen, Minihane and Mathers. **2008.** Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, 99, 12 -22.

Spencer and Crozier et al **2008.** *Analysis of Antioxidant-rich.* Oxford: wiley-blackwell.

Tadeo, F.R. y A. Gómez-Cadenas. **2008.** *Fisiología de las plantas y el estrés.* pp. 577-597.

Thakur, R. S., Singh, S. B. and Goswami, A. **1981.***Curr. Res. Med.Aromat. Plants*, 3:135–140.

Trejo, T. G. y M. Rodríguez **2007.** La agregación celular de la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia* 32:669-674.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W.**1999.** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555–559.