



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICO Y
MOLECULAR (ANBIOMOL)
“PROF. GUILLERMO LÓPEZ CORCUERA”



ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE
Azadirachta sp.

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Rodríguez R. Scarleht V.

C.I. 24.775.640

Tutor:

Prof. Miguel Sulbarán Mora

Mérida, Febrero 2020.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de grado primeramente a Dios ya que gracias a él he podido llegar hasta aquí, doy gracias también a mi Madre por su apoyo y amor incondicional, y a todas aquellas personas que han estado presente en este gran recorrido y que de alguna manera han formado parte de él.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios, por haberme dado la vida, fuerzas y sabiduría para poder culminar esta etapa tan importante. Gracias Dios Mío por iluminar y guiar siempre mi camino, dándome fuerzas para seguir adelante en los momentos difíciles.

A mi **madre querida**, por siempre estar presente de manera incondicional, gracias a ti hoy estoy aquí, y este logro es de las dos. Te amo demasiado.

Agradezco también a **toda mi familia** por estar presente de alguna u otra manera, gracias por el apoyo brindado.

De manera especial agradezco a mi tutor **Prof. Miguel Sulbarán** por haberme guiado y apoyado en la realización de este trabajo de investigación, gracias infinitas.

A la **Universidad de los Andes** por haberme brindado la oportunidad de formarme como profesional.

De forma general agradezco también a mis amistades que estuvieron presentes en este largo camino y que siempre me tendieron una mano amiga cuando más lo necesité.

Infinitas gracias a todos

Scarleht Rodríguez.

ÍNDICE DE CONTENIDO	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICAS	IX
RESUMEN	X
INTRODUCCIÓN	XI
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
Planteamiento del problema	13
Justificación de la investigación	17
Objetivos de la investigación	19
<i>Objetivo general</i>	19
<i>Objetivos específicos</i>	19
Alcances y limitaciones de la investigación	20
<i>Alcances de la investigación</i>	20
<i>Limitaciones de la investigación</i>	20
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	21
Trabajos previos	21
Antecedentes históricos	23
Bases teóricas	24
<i>Bioactividad de las plantas</i>	24
<i>Metabolitos secundarios de las plantas</i>	25

<i>Mecanismo de defensa de las plantas</i>	30
<i>Actividad antioxidante de las planta</i>	30
<i>Teoría de los radicales libres</i>	31
<i>Toxicidad celular de los radicales libres</i>	32
<i>Mecanismos de defensa antioxidante</i>	32
<i>Generalidades de Azadirachta indica</i>	38
<i>Extracción de compuestos activos del Neem</i>	40
<i>Determinación de la capacidad antioxidante del Neem</i>	41
Definición operacional de términos	44
<i>Extractos vegetales</i>	44
<i>Especies reactivas del oxígeno</i>	44
Operacionalizacion de las variables	45
Hipótesis de la investigación	47
<i>Hipótesis de la investigación</i>	47
<i>Hipótesis nula</i>	47
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	48
Tipo de investigación	48
Diseño de investigación	48
Población y muestra	49
<i>Unidad de investigación</i>	49
<i>Selección del tamaño de la muestra</i>	49
Sistema de variables	50

Procedimiento de la investigación	50
<i>Materiales, equipos y reactivos</i>	50
<i>Preparación de la muestra</i>	52
<i>Determinación de la actividad antioxidante</i>	52
<i>Determinación de fenoles totales</i>	55
<i>Determinación de flavonoides totales</i>	55
Diseño de análisis	56
CAPÍTULO IV: MARCO DE LA INVESTIGACION	57
Resultados y discusiones	57
<i>Determinación de la concentración de fenoles y flavonoides de los extractos etanólicos y acuosos de Azadirachta indica</i>	57
<i>Actividad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de Azadirachta indica</i>	62
Conclusiones	69
Recomendaciones	71
BIBLIOHEMEROGRAFIAS	72

ÍNDICE DE TABLAS	Pág.
TABLA 1. Operacionalización de la variable independiente: extractos de semillas de <i>Azadirachta</i> sp	45
TABLA 2. Operacionalización de la variable dependiente: actividad antioxidante	46
TABLA 3. Concentración media de fenoles y flavonoides de las muestras analizadas	58
TABLA 4. Actividad antioxidante de los extractos analizados por el método del radical ABTS, método AOA y porcentajes de inhibición	63

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
FIGURA 1. Elementos básicos del metabolismo primario en relación con el metabolismo secundario de las plantas.	25
FIGURA 2. Estructura química del fenol	28
FIGURA 3. Estructura química de la Azadiractina	40
FIGURA 4. Mecanismo de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomo de hidrogeno	42

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Pág.

GRÁFICA 1. Efecto de la duración de la interacción de antioxidantes específicos en la supresión de la absorbancia del catión radical ABTS a 734nm

64

www.bdigital.ula.ve

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICO Y MOLECULAR
(ANBIOMOL)
“PROF. GUILLERMO LÓPEZ CORCUERA”

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE
Azadirachta sp

Autor: Rodríguez R. Scarleht V

Tutor: Prof. Miguel Sulbarán Mora

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

La planta medicinal *Azadirachta sp* comúnmente conocida como Neem, ha sido empleada desde la antigüedad para el tratamiento de múltiples afecciones, debido a que posee una actividad biológica de amplio espectro es por esto que en este estudio, se buscó evaluar la actividad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos de semillas de *Azadirachta sp* mediante el uso de métodos como el del radical ABTS y AOA, así como la presencia de fenoles y flavonoides; en donde se encontraron valores para fenoles de 0,530 y 0,271mgE de ácido gálico/ g de muestra para el extracto acuoso y etanólico respectivamente en cuanto a flavonoides los valores encontrados fueron de 0,509 y 0,472 mgE de Quercetina/ g de muestra tanto para el extracto acuoso como el extracto etanólico. Por otro lado para la actividad antioxidante se encontraron valores por el método de ABTS de 0,0093 y 0,0062 mgE de trolox/ g de muestra para el extracto acuoso y etanólico para un volumen de 100µl, encontrando muy buena actividad antioxidante en el extracto acuoso con un porcentaje de inhibición de 97,89%. Para el método AOA los valores fueron de 1,139 y -0,014 mM de ácido úrico, encontrando mejor actividad en el extracto etanólico.

Palabras clave: actividad antioxidante, *Azadirachta sp*, Neem.

INTRODUCCIÓN

La medicina natural es un campo terapéutico que parte de la integración del hombre a la naturaleza, constituyendo así una vía para contrarrestar los efectos adversos de los productos farmacéuticos obtenidos mediante la síntesis química. Desde tiempos remotos, las especies vegetales han sido empleadas con fines terapéuticos en el tratamiento de diferentes enfermedades, debido a la capacidad de ciertas plantas de producir y bioprocasar un sinnúmero de metabolitos y elementos inorgánicos, de allí la importancia de explorar esta fuente para encontrar nuevas sustancias con actividad biológica. Algunos de los componentes activos de diversas plantas pueden actuar como agentes antioxidantes y agentes antimicrobianos, contrarrestando o evitando el daño celular causado por la oxidación de los radicales libres o por microorganismos patógenos respectivamente (Escalona, 2011; Nandita *et al.*, 2014).

Aunque el perfil de toxicidad de la mayoría de las plantas medicinales no ha sido evaluado a fondo, generalmente se acepta que los medicamentos derivados de productos vegetales son más seguros que sus contrapartes sintéticas. Con relación a esto, la *Azadirachta indica* comúnmente conocida como Neem es una de las plantas medicinales más versátiles que posee una actividad biológica de amplio espectro, frente a la cual es necesario identificar sus biocompuestos, para evaluar sus efectos antioxidantes y antimicrobianos, y contribuir así al desarrollo de futuras investigaciones en el campo fitofarmacéutico (Al Akeel, 2017). En este sentido, el presente proyecto de investigación tuvo como principal objetivo confirmar la actividad antioxidante relacionada con los extractos de semillas de *Azadirachta sp.*

obtenidos a partir de solventes acuosos y orgánicos en el laboratorio de Biología molecular de la facultad de Farmacia y Bioanálisis desde octubre de 2017 hasta febrero de 2020. Dichos extractos fueron sometidos a métodos para evidenciar la capacidad antioxidante como el del radical ABTS, y método AOA.

Así mismo, el presente proyecto de investigación se sistematizó bajo las normas APA (Asociación Americana de Psicología) en Capítulo I: El Problema, Capítulo II: Marco Teórico, Capítulo III: Marco Metodológico, Capítulo IV: Marco de la investigación y Referencias Bibliohemerográficas

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Desde tiempos remotos, las especies vegetales han sido empleadas con fines terapéuticos en el tratamiento de diferentes enfermedades con magníficos resultados, basado fundamentalmente en las experiencias empíricas de generaciones precedentes. Este amplio uso se mantiene en nuestros días; sin embargo, el desarrollo alcanzado por la ciencia actual exige una investigación científica que garantice el uso racional de las plantas medicinales. (Escalona, 2011).

La medicina natural es un campo terapéutico que parte de la integración del hombre a la naturaleza, constituyendo así una vía para contrarrestar los efectos adversos de los productos farmacéuticos obtenidos mediante la síntesis química. Su aplicabilidad en la terapéutica actual, le permite ser considerada como una de las más importantes modalidades de la medicina complementaria. Numerosas enfermedades son tratadas con productos fitofarmacéuticos o derivados de los mismos, fundamentalmente aquellas resultantes del desequilibrio redox del organismo (Fuentes y Granda, 1989).

Más del 80% de los antimicrobianos empleado hoy en día provienen de fuentes naturales, mientras que casi la totalidad de las especies antioxidantes tiene un origen vegetal; ello es causado por la necesidad intrínseca de las plantas de disponer de un mecanismo de protección, en un ambiente caracterizado por una naturaleza oxidante (atmosfera oxigenada),

una diversidad microbiana patógena, para garantizar su adaptación al medio. En consecuencia, las especies vegetales son capaces de producir y bioprocasar un sinnúmero de metabolitos y elementos inorgánicos, que han sido extraídos y empleados empíricamente durante siglos por la población mundial en el tratamiento de estas patologías (Escalona, 2011).

En este sentido, independientemente de los grandes avances observados en la medicina actual en las últimas décadas, las plantas todavía hacen una contribución significativa a la atención de la salud, dado que los componentes activos de diversas plantas pueden actuar como agentes antimicrobianos, siendo sustancias que ejercen acción contra microorganismos parasitarios como bacterias, virus u hongos, matándolos o inhibiendo su crecimiento. Según el agente microbiano que pueden atacar estos compuestos, se habla de actividad antibiótica, antifúngica o antiviral (Naima *et al.*, 2012).

A pesar de ello, debido a una mala higiene y al uso indiscriminado de antibióticos, en los últimos años se ha presentado un notable y rápido aumento en la resistencia a los agentes antimicrobianos como los antibióticos en una amplia variedad de organismos; por lo que estos microorganismos multiresistentes plantean una grave amenaza para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. De esta manera, los antimicrobianos derivados de plantas han recibido considerable atención en los últimos años (Benoit *et al.*, 2003).

Por su parte, gran variedad de plantas además de presentar componentes antimicrobianos, también presentan componentes antioxidantes, que a menudo son agentes reductores tales como tioles o polifenoles. Estos antioxidantes actúan como moléculas capaces de retardar o prevenir la

oxidación de otras moléculas, evitando así la producción de radicales libres que son compuestos altamente dañinos para las células. En tal sentido, los antioxidantes naturales, ya sea en forma de extractos crudos o en sus componentes químicos, son muy eficaces para prevenir los procesos destructivos causados por el estrés oxidativo (Nandita *et al.*, 2014; Zengin *et al.*, 2011).

Aunque el perfil de toxicidad de la mayoría de las plantas medicinales no ha sido evaluado a fondo, generalmente se acepta que los medicamentos derivados de productos vegetales son más seguros que sus contrapartes sintéticas (Vongtau *et al.*, 2005). Con relación a esto, la *Azadirachta indica* comúnmente conocida como Neem es una de las plantas medicinales más versátiles que posee una actividad biológica de amplio espectro. Este árbol perteneciente a la familia *Meliaceae*, es originario de la India y se puede encontrar en zonas tropicales y subtropicales. En la India es considerada popularmente como una panacea desde hace más de 5.000 años, y muchas de sus propiedades han sido corroboradas por la ciencia actual, al punto que la importancia del árbol de Neem ha sido reconocida por la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos (Pankaj *et al.*, 2011).

A partir de esta planta, se obtiene beneficios de todas sus partes, principalmente tiene muchas aplicaciones en la medicina ayurvédica, en el tratamiento de heridas, lesiones, problemas en la piel, entre otras. De igual forma, ha sido utilizada como remedio casero contra diversas dolencias humanas e incluso como biopesticidas para fines agrícolas (Keshava, 1994), el aceite de las semillas de la planta se utiliza comúnmente como antiséptico; la corteza y las hojas son altamente efectivas para prevenir enfermedades dentarias, al igual que se han utilizado terapéuticamente para el tratamiento

de trastornos respiratorios, inflamatorios, de estreñimiento, de infección de la piel, trastornos artríticos, fiebre y diabetes (Van Der Nat *et al.*, 1991).

Además de los efectos antes mencionados, existen diversos informes sobre las actividades farmacéuticas y biológicas del Neem basadas en la investigación científica, como las propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas y antioxidantes (Biswas *et al.*, 2002).

En este orden de ideas, diversos extractos de la *Azadirachta indica* también han presentado una actividad antioxidante significativa, que demuestran que tanto las hojas como la corteza del tallo de dicha planta son una fuente rica en compuestos fenólicos, con propiedades antioxidantes de gran importancia para el desarrollo de nuevos fitofármacos que ayuden al tratamiento de daños celulares causados por los radicales libres (Fong *et al.*, 2014).

Por otra parte, algunas investigaciones recientes sobre la actividad antibacteriana de la *Azadirachta indica*, muestra que los extractos de la corteza de dicha planta presentan una mejor sensibilidad antibacteriana que el antibiótico estándar Eritromicina (Al Akeel *et al.*, 2017). De igual forma, se ha demostrado que los extractos metanólicos de hojas de la *A. indica* es un agente antibacteriano eficaz contra varios microbios patógenos grampositivos y gramnegativos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli*, que crean serios riesgos para la salud humana (Deka *et al.*, 2013).

Así mismo, el árbol de Neem ha sido recientemente plantado en el Caribe y en varios países del continente americano incluyendo México, pero debido

a la variada distribución geográfica de la planta, se puede observar una gran diversidad de características morfológicas y bioquímicas (Ermel, 1995), por lo que también se ha reportado que las propiedades biológicas del Neem están altamente influenciadas por ubicaciones geográficas particulares y otros factores abióticos (Kaura, 1998; Kaushik, 2007).

Por lo tanto, teniendo en cuenta la variedad de informes que analizan los compuestos bioactivos, las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de la *Azadirachta indica* a partir de las hojas y la corteza del tallo, en países como India y Cuba, y teniendo en cuenta que no existe aún una documentación científica adecuada de las propiedades mencionadas de la planta basada en la zona climática del Estado Mérida - Venezuela, se presentó la necesidad de evaluar la capacidad antioxidante de varios extractos de semillas de *Azadirachta sp* (Neem) cultivada en una zona templada de dicha región, surgiendo la siguiente interrogante: ¿Cuál es la actividad antioxidante relacionada con los extractos de semillas de *Azadirachta sp*, estudiados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, desde octubre de 2017 hasta febrero de 2020?

Justificación de la Investigación

En las últimas décadas las enfermedades crónicas y neurodegenerativas han ido aumentando, cuya presencia está asociada con la producción de radicales libres, frente a los cuales actualmente se emplean sustancias antioxidantes de origen sintético y natural, que buscan contrarrestar el efecto nocivo que causan los radicales libres. Sin embargo, el uso de antioxidantes sintéticos ha sido restringido debido a su efecto carcinogénico, abriendo paso al estudio y uso de antioxidantes provenientes de fuentes vegetales o

naturales, dada la capacidad intrínseca de diversas plantas para producir agentes reductores (Escalona, 2011; Li *et al.*, 2007).

De igual forma, gran parte de la población hace uso de plantas medicinales para aliviar diversos padecimientos, principalmente de origen infeccioso; debido en parte, al elevado costo de los fármacos, al poco acceso a los sistemas de salud, a los problemas de la fármaco resistencia y los severos efectos secundarios que ocasionan los medicamentos sintetizados químicamente. En este sentido, es posible considerar las plantas medicinales como una fuente potencial de compuestos antimicrobianos de gran utilidad, debido a la capacidad que tienen para sintetizar diversos metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, terpenos, cumarinas, lignanos, entre otros. De allí la importancia de explorar esta fuente para encontrar nuevas sustancias con actividad biológica (Sagar *et al.*, 2010).

En este orden de ideas, los componentes activos de diversas plantas como la *Azadirachta indica* han sido utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades desde hace años, generando un creciente interés por la actividad biológica de dicha planta, frente a la cual es necesario identificar este tipo de biocompuestos, para evaluar sus efectos antioxidantes y antimicrobianos, contribuyendo así al desarrollo de futuras investigaciones en el campo fitofarmacéutico y de la medicina natural (Sellapan *et al.*, 2002).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante por eliminación de radicales libres en los extractos de semillas de *Azadirachta sp.*, estudiados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis desde octubre de 2017 hasta febrero de 2020.

Objetivos Específicos

- Cuantificar la presencia de fenoles y flavonoides en extractos de semillas de *Azadirachta sp.*
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos de semillas de *Azadirachta sp.*, mediante los métodos del radical ABTS y método AOA.
- Caracterizar la actividad antioxidante de los extractos de semillas de *Azadirachta sp.*

Alcances y Limitaciones de la investigación

Alcances de la Investigación

Según Hernández, Fernández y Baptista (2010) el alcance de una investigación indica el resultado que se espera obtener del estudio. Por lo que la presente investigación tuvo un alcance evaluativo, ya que se estudió la actividad antioxidante de los extractos de semillas de la *Azadirachta sp* en el proceso de neutralización de radicales libres mediante el uso del método del radical ABTS y método AOA.

Limitaciones de la Investigación

Durante el desarrollo de la investigación se pudieron presentar distintas limitaciones relacionadas con aspectos teóricos, técnicos y de recursos económicos (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). En tal sentido, las limitaciones teóricas de la presente investigación estuvieron representadas por una deficiencia de trabajos previos, que sustenten o proporcionen una base para el desarrollo de la investigación del evento de estudio. De igual forma, las dificultades técnicas y económicas pudieron encontrarse a la hora de adquirir el material y reactivos necesarios para el desarrollo del proceso investigativo, bien sea por un difícil proceso de adquisición, o por déficit de recursos económicos para conseguirlos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Al Akeel, Mateen, Janardhan y Gupta (2017), publicaron un trabajo en la revista Saudi Journal of Biological Sciences titulado “Analysis of anti-bacterial and anti-oxidative activity of *Azadirachta indica* bark using various solvents extracts”, el cual tuvo como objetivo evaluar la propiedad antibacteriana y antioxidante de la corteza del tallo de la *A. indica* utilizando diversos extractos de disolventes como metanol, etanol, acetona y solución acuosa. Una vez obtenido los extractos, fueron expuestos a cultivos bacterianos (*Salmonella*), observándose inhibición de crecimiento o sensibilidad bacteriana. Los resultados fueron comparados con antibióticos estándar como Gentamicina®, Ciprofloxacina®, Eritromicina® y Cloranfenicol®, donde los extractos de *A. indica* en etanol y metanol mostraron una mejor zona de inhibición en comparación a los otros disolventes y al antibiótico Eritromicina. Por su parte, el potencial antioxidante fue evaluado mediante la medición del contenido fenólico (fenoles y flavonoides) en diferentes extractos de la corteza del tallo de la *A. indica*, cuyo valor más significativo se encontró con los disolventes metanol y etanol, los cuales presentaron una mayor capacidad de eliminación de radicales por el método de DPPH.

De igual forma, Fong, Berenguer, De la Vega, Wawoe y Puente (2014), publicaron un artículo en la Revista Cubana de Plantas Medicinales cuyo título y objetivo fue evaluar el potencial antioxidante de un extracto acuoso de hojas del NIM (*Azadirachta indica* A. Juss), mediante la realización

de un análisis fitoquímico preliminar donde se identificó cualitativamente los metabolitos secundarios de mayor relevancia en la planta, como el contenido de fenoles y flavonoides totales mediante el uso de métodos colorimétricos. De igual forma se determinó la Capacidad Antioxidante Total (CAT) de la planta mediante el método del fosfomolibdeno. De esta manera, se evidenció que la presencia de metabolitos secundarios como los fenoles y flavonoides contenidos en los extractos de hojas del Neem, dan soporte a la actividad antioxidante manifestada por la planta al neutralizar los radicales libres, y sirven de base para la elaboración de productos fitofarmacéuticos con dicha propiedad terapéutica.

Por su parte, Deka, Das, Lahan y Yadav (2013), realizaron un estudio titulado “In-vitro free radical scavenging, antioxidant and antibacterial activity of *Azadirachta indica* A. Juss of Assam” publicado en la revista *Advances in Life Sciences*, cuyo principal objetivo fue analizar los componentes bioactivos, la propiedad antibacteriana y antioxidante de la *A. indica*. Esta investigación se basó en el uso de las hojas del Neem recolectadas en diferentes lugares de la localización de Assam (India), las cuales fueron procesadas hasta obtener extractos metanólicos crudos, que posteriormente fueron analizados mediante pruebas de susceptibilidad microbiana (concentración mínima inhibitoria) utilizando patógenos estándar grampositivos y gramnegativos. Dichos extractos también fueron utilizados para evaluar la actividad antioxidante mediante el método del radical hidroxilo, el método de determinación de DPPH y por la determinación de fenoles y flavonoides totales. El estudio mostró que los extractos metanólicos de hojas de la *A. indica*, son un agente antibacteriano muy efectivo frente a microbios patógenos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* y *Escherichia*

coli, los cuales son causantes de diversas enfermedades humanas. De igual forma, dichos extractos mostraron un notable efecto antioxidante.

Antecedentes Históricos

El conocimiento indígena sobre las plantas se ha transmitido de generación en generación en varias partes del mundo, especialmente en el subcontinente indio, y ha contribuido significativamente al desarrollo de diferentes sistemas tradicionales de medicamentos. En este sentido, el árbol de Neem es considerado un árbol omnipotente y un regalo sagrado de la naturaleza, que ha sido cultivado principalmente en la India, y es conocido hoy en día por el nombre de *Azadirachta indica*. Las diferentes partes del árbol de Neem han sido utilizadas ampliamente por la humanidad para tratar diversas dolencias, desde tiempos prehistóricos (Davis, 2012).

Su nombre latinizado (*Azadirachta indica*), se deriva del persa Azad que significa "libre"; dirakht significa "árbol"; i-Hind significa "de origen indio". Por lo tanto, literalmente significa "el árbol libre de la India", el cual es una planta que ha sido declarada el "Árbol del siglo XXI" por las Naciones Unidas, y en 1992 la Academia Nacional de Ciencias de EE. UU publicó un informe sobre la gran diversidad de problemas que se pueden tratar con esta planta, titulado "Neem: A tree to solve global problems" (Kumar *et al.*, 2012).

En las últimas dos décadas, las investigaciones sobre el Neem se han intensificado y se han redescubierto muchas de las propiedades agrícolas y médicas de dicha planta. Igualmente, a principios de este siglo, se logró introducir este árbol indio en zonas de África Occidental, donde fue útil en el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas la malaria. De esta manera, el Neem se ha convertido en un pilar importante del sistema de

medicina tradicional en todo el mundo a lo largo de miles de años, y continúa aun brindando a la humanidad efectivos remedios caseros (Davis, 2012).

Bases Teóricas

Bioactividad de Plantas

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que sintetizan principios activos, los cuales ejercen acción farmacológica o beneficiosa sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial generalmente es servir como medicamento, para disminuir y neutralizar el desequilibrio orgánico o enfermedad (Muñoz, 2002).

En las plantas, al igual que en otros organismos vivos, sucede un conjunto de reacciones químicas que constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía se transforma en moléculas comunes necesarias para el funcionamiento del organismo. Estas moléculas que también se denominan metabolitos primarios pueden ser aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, las cuales están presentes en todas las plantas y desempeñan las mismas funciones (Fretes, 2010) (Figura 1).

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía, a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no tienen una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios o productos naturales (Fretes, 2010).

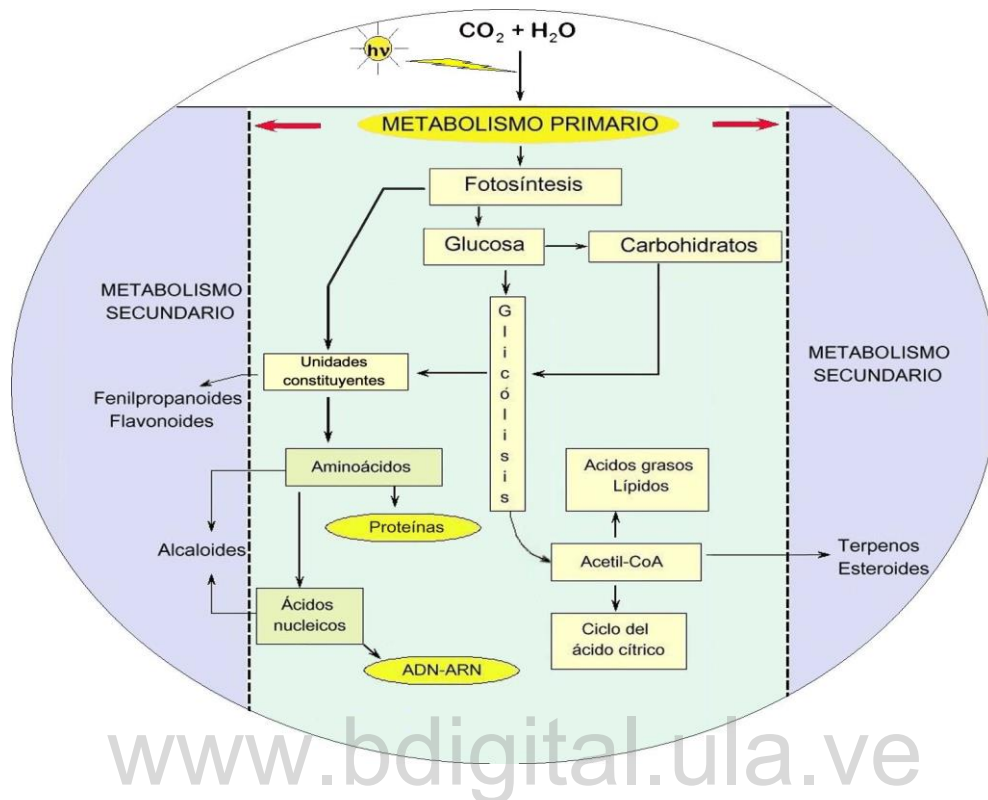


Figura 1. Elementos básicos del metabolismo primario en relación con el metabolismo secundario de plantas.

Metabolismo Secundario de las Plantas

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), el ataque por microorganismos (virus, bacterias y hongos), la competencia por el espacio de suelo, la luz y

los nutrientes entre las diferentes especies de plantas, u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Los metabolitos secundarios difieren de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Estos se sintetizan en pequeñas cantidades y de forma no generalizada, por lo que a menudo su producción está restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies, es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico.

Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes y más (Ávalos y Pérez, 2009).

Características de los Metabolitos Secundarios

En la actualidad se conocen aproximadamente 20.000 estructuras de metabolitos secundarios (MS), que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los MS que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los MS no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides. La variedad estructural dentro de un mismo grupo de MS está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Wink, 1999). Esta variabilidad ocasiona

perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de la planta, la cual es parte de la estrategia de adaptación de las plantas (Castellanos y Espinoza, 1997).

Los precursores de la biosíntesis de MS se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato. Existen también MS que se sintetizan en todos los órganos y tejidos de la planta, pero que se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis, a través de su redistribución por el xilema y/o el floema, o por el espacio apoplástico (Edwards y Gatehouse, 1999).

En general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; los esteroides, sesquiterpenos y dolicoles se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que la biosíntesis de algunas aminas y alcaloides tiene lugar en la mitocondria. Los compuestos solubles en agua se almacenan en vacuolas, en tanto que los solubles en lípidos son secuestrados a estructuras especializadas tales como ductos de resinas, laticíferos, pelos glandulares, tricomas o en la cutícula (Wink, 1999).

De igual forma, los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales: Terpenos, Compuestos fenólicos, Glicósidos y Alcaloides.

Terpenos. Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. El grupo de los terpenos incluye hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los

esteroles (glicósidos cardiacos), latex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas).

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc. Muchas plantas (limón, menta, eucalipto o tomillo) producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides denominadas aceites esenciales, responsables de los olores y sabores característicos de estas plantas, algunos de los cuales actúan como repelentes de insectos o insecticidas (Bruneton, 2001).

Compuestos fenólicos. En el contexto del metabolismo, los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. (Figura 2). Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides. Muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro (Bruneton, 2001).

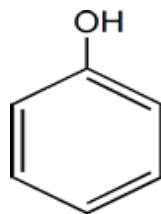


Figura 2. Estructura química del Fenol

Glicósidos. Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, son los glucosinolatos, que se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos (Bruneton, 2001).

Alcaloides. Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas.

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas, donde la mayoría de ellas son consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivo o analgésico. Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina.

Los alcaloides se clasifican en función de los anillos presentes en la molécula en: quinolina (quinina), isoquinolina (papaverina, morfina y codeína), indol (vindolina, vinblastina), tropano (atropina, cocaína), quinolizidina (lupanina, citisina), piperidina (nicotina, coniína), purina

(cafeína), pirrolizideno (senecionina). El opio es quizá uno de los primeros alcaloides conocidos (Bruneton, 2001).

Mecanismos de Defensa de las Plantas

Ante el ataque de ciertos microorganismos o debido a condiciones no aptas para su normal desarrollo, las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra estas condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano.

La composición y la estructura de la pared celular vegetal también cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para insectos. Estas respuestas de defensa a su vez, se combinan con el desarrollo de estructuras contra sus depredadores, tales como las espinas, las espigas, los tricomas y los pelos glandulares. Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de los metabolitos secundarios (MS) con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad antioxidante (Croteau *et al.*, 2000).

Actividad Antioxidante de Plantas

Los antioxidantes tienen un papel importante para proteger el cuerpo humano contra el daño de los radicales libres, por lo que actualmente existe un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes de origen natural, especialmente provenientes de plantas medicinales y/o alimenticias (Leos *et al.*, 2016).

En este sentido, los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas como las células humanas, inhabilitando la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. En este proceso los antioxidantes evitan que los radicales libres oxiden las células, al transferir un electrón de su estructura atómica al radical libre, de manera que los antioxidantes evitan que ocurran otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos.

Se pueden distinguir dos categorías de antioxidantes: sintéticos y naturales. Los sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los naturales pueden ser compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides (Pastene, 2009).

Teoría de los Radicales Libres

En los últimos años se ha despertado un gran interés por los radicales libres y su relación con el envejecimiento celular. La teoría de los radicales libres, propuesta por Harman en 1957, es la que explica actualmente el envejecimiento celular, aunque en él se encuentran implicados numerosos factores fisiológicos, genéticos y sociales.

Los radicales libres son especies químicas, atómicas o moleculares, con un electrón desapareado en su orbital más externo. Este tipo de configuración electrónica hace que sean muy inestables y altamente reactivos, pudiendo alterar estructuras biológicas fundamentales como lípidos de membrana, ácidos nucleicos y proteínas. Todo ello se traduce en un aumento del estrés oxidativo, que está directamente relacionado con el

envejecimiento celular y algunos procesos fisiopatológicos como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cataratas y determinadas formas de cáncer (Finkel *et al.*, 2000).

Toxicidad Celular de los Radicales Libres

Las alteraciones funcionales, mediadas por los radicales libres (RL), son una consecuencia directa de sus interacciones con macromoléculas esenciales. Pueden reaccionar indiscriminadamente con moléculas como proteínas, lípidos y ADN, convirtiéndolas en moléculas “blanco” y generando un gran número de lesiones oxidativas (Weyemi *et al.*, 2012).

En el organismo humano, los radicales libres están controlados por un amplio sistema fisiológico de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (enzimas antioxidantes, glutatión, albúmina, transferrina, ácido úrico, bilirrubina), pero el estilo de vida actual está inclinándose hacia un aumento del estrés oxidativo. Por ello es recomendable el aporte de antioxidantes exógenos bien a través de la dieta, mediante suplementos de vitaminas y minerales, o mediante el consumo de plantas medicinales con variedad de metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides, antocianos, esteroides y carotenoides) que confieran este espectro de actividad (López *et al.*, 2007).

Mecanismo de Defensa Antioxidante

Los radicales libres (RL) al ser especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan en muchas células bajo condiciones fisiológicas, y el organismo utiliza mecanismos potentes de defensa para evitar la acumulación de estos RL, tanto a nivel fisiológico como bioquímico. Entre ellos se destacan, a nivel

fisiológico, el sistema microvascular, cuya función es mantener los niveles de O_2 en los tejidos; a nivel bioquímico, la defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática, así como ser un sistema reparador de moléculas (Gil del Valle *et al.*, 2011).

Los antioxidantes pueden actuar previniendo la formación de especies reactivas al oxígeno (ROS), interceptando el ataque de ROS, secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas, facilitando la reparación del daño causado por ROS, manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes, amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS. Con el fin de revisar dichos mecanismos, es preciso previamente realizar una clasificación de aquellos antioxidantes que normalmente están presentes en el organismo humano.

www.bdigital.ula.ve

Si bien existen diversas formas para clasificar a los antioxidantes, desde una perspectiva de su origen y presencia en el organismo, es posible distinguir entre aquellos antioxidantes que son normalmente bio-sintetizados por el organismo, y aquellos que ingresan a éste a través de la dieta. Entre los primeros se encuentran:

- I) Antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasas, tioredoxina-reductasas y sulfoxi-metionina-reductasas.
- II) Antioxidantes no-enzimáticos, como glutatión, ácido úrico, ácido dihidro-lipóico, metalotioneína, ubiquinol (o Co-enzima Q) y melatonina. Si bien i) y ii) son primariamente bio-sintetizados por el organismo humano, la dieta puede también contener dichos antioxidantes. Sin embargo, debe aclararse que el aporte que

podría suponer para el organismo la ingesta de (alimentos con) dichos antioxidantes no es muy significativa pues estos experimentan una degradación/biotransformación significativa a lo largo del tracto gastro-intestinal.

Respecto a los antioxidantes que ingresan al organismo solo a través de la dieta, estos se clasifican, esencialmente, en:

- I) vitaminas-antioxidantes , como ácido ascórbico, alfa-tocoferol y beta-caroteno (o pro-vitamina A)
- II) carotenoides (como luteína, zeaxantina y licopeno)
- III) polifenoles, en sus categorías de flavonoides y no-flavonoides.
- IV) compuestos que no caen en las tres categorías anteriores, como son algunos glucosinolatos (ej. isotiocianatos) y ciertos compuestos organo-azufrados (ej. dialil-disulfido).

De acuerdo a esta clasificación su mecanismo de defensa se describe a continuación:

Interacción directa con especies reactivas: El mecanismo más conocido, aunque no necesariamente el más relevante a la acción, se refiere a la capacidad que tienen muchos antioxidantes para actuar como “estabilizadores o apagadores de diversas especies reactivas”. Esto último supone la conocida actividad “scavenger” de radicales libres que tienen muchas moléculas antioxidantes. En el caso de los radicales libres, tal acción implica su estabilización a través de la cesión de un electrón a dichas especies reactivas. Tal mecanismo, definido como “SET” (single electron transfer), permite que el radical libre pierda su condición por “pareamiento” de su electrón desapareado. Una consecuencia para el antioxidante es que,

como resultado de ceder un electrón, éste se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma que es de baja o nula reactividad hacia su entorno. Junto al mecanismo SET, muchos antioxidantes pueden estabilizar radicales libres a través de un mecanismo que implica la transferencia directa de un átomo de hidrógeno (esto es un electrón con su protón). Tal mecanismo es definido como “HAT” (hydrogen atom transfer). En este último caso, el radical libre también queda estabilizado electrónicamente.

Los antioxidantes cuya acción es promovida a través de mecanismos SET y/o HAT son mayoritariamente los antioxidantes no-enzimáticos, sean estos normalmente bio-sintetizados por el organismo humano, o bien que ingresen al organismo a través de la dieta. La mayor parte de los antioxidantes que actúan a través de estos mecanismos presentan en su estructura química, como grupos funcionales, hidroxilo fenólicos (ejemplo, todos los polifenoles y los tocoferoles). No obstante, otros antioxidantes, no fenólicos, como el glutatión, la melatonina, y los ácidos ascórbico, dihidro-lipóico y úrico, son también ejemplos de moléculas cuya acción es promovida por mecanismos SET y/o HAT.

Junto a los mecanismos SET y HAT, ciertos antioxidantes puede actuar también estabilizando especies reactivas a través de un mecanismo que implica “la adición directa del radical a su estructura”. Ejemplo de este tipo de acción antioxidante es la promovida por carotenos como beta-caroteno. Como resultado de tal reacción, el radical libre (ej. peroxilo) pierde su condición, y el caroteno es modificado covalentemente, convirtiéndose en un radical libre que a través de reacciones sucesivas es oxidado y convertido en derivados epóxido y carbonilos de notablemente menor reactividad.

Como es de esperar, la interacción directa entre un antioxidante y una especie reactiva prevendrá ya sea el inicio y/o la propagación de procesos oxidativos que afectan a los sustratos biológicos.

Prevención de la formación enzimática de especies reactivas: Algunos antioxidantes pueden actuar previniendo la formación de ROS y RNS. Lo hacen inhibiendo, ya sea la expresión, la síntesis o la actividad de enzimas pro-oxidantes involucradas en la generación de especies reactivas, como la NADPH-oxidasa (NOX), la xantina-oxidasa (XO), la mieloperoxidasa (MPO) y la óxido nítrico sintasa (NOS). Este tipo de acción antioxidante no demanda que un antioxidante exhiba en su estructura características que típicamente se asocian a los mecanismos de acción ET o HAT. Ejemplos de inhibidores de la actividad de estas enzimas son, para compuestos provenientes de la dieta, ciertos polifenoles capaces de inhibir la NOX, la MPO y la XO, y algunos agentes empleados en la terapia de la gota, como alopurinol, y febuxostat que inhiben la xantina oxidasa.

Prevención de la formación de especies reactivas dependiente de metales: Un segundo mecanismo que también implica la inhibición de la formación de especies reactivas se relaciona con contraponer la capacidad que tienen ciertos metales de transición, como hierro y cobre (ambos en su estado reducido), para catalizar (actividad redox) la formación de radicales superóxido a partir de la reducción de oxígeno y de radicales hidroxilo, a partir de peróxido de hidrógeno (Reacción de Fenton). Aquellas moléculas que tienen la habilidad de unir tales metales, formando complejos o quelatos, logran inhibir la actividad redox de éstos, previniendo la formación de las especies reactivas anteriormente mencionadas. Se incluyen en este grupo de antioxidantes: 1) ciertos péptidos y proteínas normalmente bio-sintetizadas por el organismo y cuya función fisiológica les implica transportar, almacenar

y/o excretar hierro (como ferritina) o cobre (como metalotioneína y ceruloplasmina), II) ciertos polifenoles que acceden al organismo a través de la dieta y cuya característica distintiva es presentar en su estructura flavonoídea un grupo catecol en el anillo B, y III) algunos agentes que son empleados en la terapia de remoción de metales como desferroxamina que atrapa hierro, y penicilamina o tetratiomolibdato que atrapan cobre.

Activación o inducción de la actividad de enzimas antioxidantes:

Como parte de la defensa antioxidante, el organismo humano bio-sintetiza ciertas enzimas cuya función es remover especies reactivas, principalmente ROS. Entre estas destacan las siguientes superóxido dismutasa (SOD, en sus isoformas Cu/Zn y Mn-dependientes) que reduce radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, catalasa (CAT, hierro-dependiente) que reduce peróxido de hidrógeno a agua, glutatión peroxidasa (GSpx; Se-dependiente) que reduce lipo-hidroperóxidos a sus alcoholes correspondientes, glutatión-S-transferasa (GST) en su tipo peroxidasa que actúa reduciendo peróxidos orgánicos, glutatión reductasa que reduce glutatión oxidado (GSSG) a reducido (GSH), y sulfoxi-metionina-reductasa que regenera metionina a partir de su metabolito sulfoxi-oxidado.

La acción antioxidante de todas estas enzimas se traduce en una disminución del estado redox celular. Entre las enzimas mencionadas, dos casos ameritan un comentario adicional. El primero, la SOD se distingue pues si bien su acción remueve un radical libre (superóxido), como producto de su acción se forma una especie que también es reactiva, peróxido de hidrógeno. Esto último pone de manifiesto la importancia que tiene otras enzimas capaces de remover peróxido de hidrógeno, como son la CAT y la GSpx. La segunda enzima que amerita comentario es la glutatión reductasa pues su acción antioxidante es doble ya que ésta cataliza no solo la

remoción de un ROS sino que además, como resultado de ello, da lugar a la formación de GSH, un importante antioxidante celular.

Existe evidencia de que ciertos compuestos presentes en la dieta humana podrían inducir la expresión de genes que codifican para la síntesis de algunas de las enzimas antioxidantes. Ejemplos de dichos compuestos son algunos polifenoles presentes en frutas y hortalizas, diversos isotiocianatos (como sulforafano) presentes en crucíferas (brócoli, coliflor) y algunos curcuminoides (como curcumina) de la cúrcuma. Estos compuestos son, más a menudo, conocidos como inductores de enzimas bio-transformantes del tipo fase II, es decir aquellas enzimas que conjugan xenobióticos electrófilos.

Generalidades de la *Azadirachta indica*

El árbol del Neem, cuyo nombre científico es *Azadirachta indica* es una planta medicinal muy versátil perteneciente a la familia *Meliaceae* y se encuentra extensamente distribuido en Asia, África y otras partes tropicales del mundo. Esta planta tiene un uso ancestral y se ha utilizado en la medicina tradicional pues la misma posee un amplio espectro de propiedades, sin embargo las investigaciones de sus propiedades terapéuticas se están realizando desde hace años. (Atawodi *et al.*, 2009).

Características Taxonómicas del Neem

- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophyta*
- Orden: *Sapindales*
- Familia: *Meliaceae*
- Género: *Azadirachta*
- Especie: *Azadirachta indica* A.Juss.

Propiedades del Neem

Se han empleado extensivamente varias partes del Neem como son las hojas, flores, corteza, semillas, frutos, aceite y raíz, para tratar varias enfermedades (Chattopadhyay, 2003). Muchos investigadores reportan la obtención de diferentes extractos y la purificación de distintas fracciones de estos, los cuales poseen significativas propiedades antioxidantes, hepatoprotectoras y quimiopreventivas contra el cáncer (Manikandan, 2008). Igualmente existe evidencia científica preliminar que demuestra que determinadas fracciones de diferentes extractos de esta planta poseen propiedades antidiabéticas, antiinflamatoria, y antiulcerosa (Chattopadhyay, 2005). Otros sugieren que extractos de la planta *A. indica* poseen significativas propiedades antibacterianas, antivirales, antiparasitarias y antifúngicas (Mossini *et al*, 2004).

Componentes activos del Neem

La *Azadirachta indica* ha sido ampliamente utilizada debido a sus propiedades medicinales dadas por un gran número de componentes biológicamente activos. Aunque se ha aislado una gran cantidad de estos compuestos a partir de varias partes del Neem, solo algunos de ellos han sido estudiados para la actividad biológica (Biswas *et al.*, 2002).

El principal metabolito activo del Neem es el nortriterpenoide conocido como Azadiractina (Figura 3), el cual al estar presente en extractos de esta planta muestra una variedad de propiedades biológicas como actividad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, antipirética, etc. (Parotta, 2001).

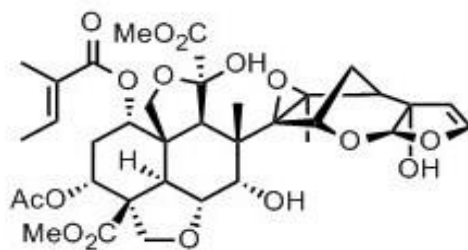


Figura 3. Estructura química de la Azadiractina

Específicamente las semillas de Neem contienen una serie de limonoides estructuralmente relacionados con la azadiractina, lo que podría significar que también sean biológicamente activos principalmente en el control de microorganismos. Algunos limonoides, como la nimbina, nimbolina y melantriol, han sido aislados, y junto con la azadiractina son considerados compuestos de gran actividad biocida contra insectos y microorganismos (Coventry y Allan, 2001).

Extracción de Compuestos Activos del Neem

En la búsqueda de sustancias para la comprobación de actividad biológica (capacidad antioxidante) de la planta *Azadirachta* sp, la extracción del material vegetal frecuentemente se realiza con disolventes de diferentes polaridades de acuerdo con el carácter hidrofílico o lipofílico de los compuestos que se desean evaluar. El disolvente más comúnmente utilizado en la obtención de extractos lipofílicos es el hexano. También se han utilizado el eter dietílico y cloruro de metileno entre otros. Para la extracción de compuestos con carácter hidrofílico se han utilizado metanol, etanol, mezclas de etanol/agua, acetona/agua y metanol/agua, todos ellos ensayados en diferentes proporciones. El alcohol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los metabolitos secundarios (Medina, 2010).

Las extracciones pueden hacerse por “extracción continua en soxhlet”, en la cual el material seco se sitúa en una cámara central y el solvente se hace evaporar en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal. Por “reflujo”, donde el material vegetal y el solvente se colocan en un balón el cual tiene acoplado un refrigerante, se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal. Y por “maceración en frío”, donde el material se mezcla con el solvente triturado continuamente en frío (Arévalo, 1996).

Determinación de la Capacidad Antioxidante del Neem

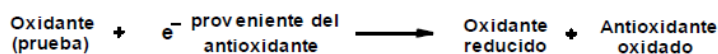
A partir de las hojas del Neem se han reportado informes que demuestran su actividad antioxidante, la cual se atribuye comúnmente a la presencia de polifenoles en la planta, los cuales son metabolitos secundarios con reactividad de un grupo fenol (Kähkönen *et al.*, 2001; Robbins, 2003).

Los métodos de determinación de la capacidad antioxidante se basan en distintos sistemas generadores de radicales libres. Dichos radicales reaccionan con la muestra y en virtud de la capacidad antioxidante de ésta, se inhibiría la generación de los primeros. Así, lo que se determina realmente es el efecto antioxidante ya que la actividad antioxidante no se puede medir de forma directa. Según Clarkson (1995), en la medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante.

Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar la capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno

(HAT) y ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET) (Huang et al., 2005) (Figura 4).

Ensayos ET



Ensayos HAT

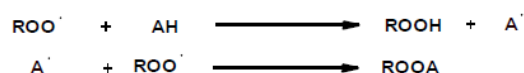


Figura 4. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno (Huang *et al.*, 2005).

Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (Huang *et al.*, 2005).

En la actualidad, debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un método que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, por tanto, es recomendable trabajar con varios métodos para facilitar la comparación e interpretación de los resultados. Las características ideales que debe reunir un método de determinación de capacidad antioxidante son: sencillez, mecanismo químico definido y punto final fijo,

reproducibilidad, adaptabilidad a sustancias antioxidantes hidrofílicas y lipofílicas y elevado rendimiento de análisis (Medina, 2010).

De acuerdo a lo antes descrito, los principales métodos que se utilizaron para determinar la capacidad antioxidante de los extractos del Neem, mediante la medición de la inhibición de los efectos de los radicales libres, fueron el método del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ y método de la actividad antioxidante (AOA) que se describen a continuación.

Método del catión radical $ABTS^{\bullet+}$

La generación del radical $ABTS^{\bullet+}$ (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-Sulfónico) constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. Este ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re *et al.*, 1999).

La técnica mejorada para la generación del catión radical $ABTS^{\bullet+}$, implica la producción directa del cromóforo $ABTS^{\bullet+}$ verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$). Este compuesto presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones (Tovar, 2013).

Método de la Actividad Antioxidante (AOA)

La actividad antioxidante (AOA) se mide mediante la metodología descrita por de Koracevic *et al.* (2001), donde se usa una solución estándar del complejo del Fe-EDTA que reacciona con el H₂O₂ por medio de una reacción del tipo Fenton, formando radicales hidroxilo (OH^{*}). Estos ROS degradan el benzoato, dando por resultado la producción de TBARS (especies reactivas del ácido tiobarbiturico), medibles espectrofotométricamente a 532 nm. Y la inhibición del desarrollo del color en se define como AOA, con respecto al patrón de ácido úrico 1 mM.

Definición operacional de términos

Extractos Vegetales

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Ruiz & Susunaga, 2000).

Especies Reactivas del Oxígeno

Son moléculas como iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto nitrogenados como orgánicos, muy reactivos debido a que en el último orbital tienen un electrón no apareado, lo cual les confiere inestabilidad física y pueden reaccionar fácilmente con otras moléculas de la célula. Una acumulación de especies reactivas de oxígeno en las células puede dañar el

ADN, el ARN y las proteínas, y puede causar la muerte celular (Gil del Valle, 2011).

Operacionalización de Variables

La operacionalización de variables consiste en determinar el método a través del cual las variables serán medidas o analizadas. Comprende la definición conceptual y operacional de las variables pasando de un nivel abstracto a un nivel concreto y específico a efectos de poder observarla y manipularla, con el propósito de contrastar la hipótesis (Arias, 2006).

Por su parte la definición conceptual constituye una abstracción articulada en palabras para facilitar su comprensión y su adecuación a los requerimientos prácticos de la investigación. Mientras que la definición operacional está constituida por una serie de procedimientos o indicadores que describe cómo será medida la variable en estudio (Balestrini, 2006).

Tabla 1. Operacionalización de la variable independiente: Extractos de semillas de *Azadirachta sp*

VARIABLE	TIPO	DEFINICION CONCEPTUAL
Extractos de semillas de <i>Azadirachta sp</i>	Variable independiente	Los extractos equivalen a preparar un jugo agregando la planta de interés y el disolvente ideal (Olaya y Méndez, 2003).
DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES
Se usarán 2 métodos: <ul style="list-style-type: none"> - Determinación de la concentración de grupos fenólicos. - Determinación del contenidos fenólico de flavonoides. 	Presencia o ausencia de componentes bioactivos del Neem.	Reacciones colorimétricas: <ul style="list-style-type: none"> - Lecturas de absorbancia a 750 nm y 510 nm respectivamente.

Fuente: Rodríguez y Sulbarán (2018)

Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad Antioxidante

VARIABLE	TIPO	DEFINICION CONCEPTUAL
Actividad antioxidante in vitro	Variable dependiente, cualitativa y discreta	La actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia o compuesto para inhabilitar la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres (Youngson, 1994).
DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR
Los datos de la actividad antioxidante se derivan de 2 metodos: <ul style="list-style-type: none"> - Método del catión radical ABTS+: ensayo de decoloración en solución etanólica. - Método de la actividad antioxidante (AOA) 	Presencia o ausencia de actividad antioxidante	Reacciones colorimétricas: <ul style="list-style-type: none"> - Lecturas de absorbancias a 532 nm, 532 nm y 734 nm respectivamente.

Fuente: Rodríguez y Sulbarán (2018)

Hipótesis

Hipótesis de Investigación (H_i)

Los extractos de semillas de *Azadirachta sp* estudiados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis desde octubre de 2017 hasta febrero de 2020, presentan actividad antioxidante por eliminación de radicales libres.

Hipótesis Nula (H_o)

Los extractos de semillas de *Azadirachta sp* estudiados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis desde octubre de 2017 hasta febrero de 2020, no presentan actividad antioxidante por eliminación de radicales libres.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Los tipos de investigación se definen por el objetivo del estudio. Cada tipo de investigación tiene características y procesos propios, donde se señala el grado de profundidad y el tipo de resultado. Los tipos investigación representados en la espiral holística son: investigación exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa (Hurtado, 2010).

En este sentido, la presente investigación fue de tipo Confirmatoria, ya que indaga acerca de las posibles relaciones entre eventos, a partir del control de una serie de variables extrañas, y su propósito es verificar las hipótesis derivadas de las teorías (Hurtado, 2010).

Diseño de Investigación

El diseño de investigación es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado. En atención al diseño, la investigación se clasifica en: documental, de campo y experimental (Arias, 2006). Adicionalmente, el diseño de investigación tiene relación con la amplitud, el donde y el cuándo de la información que se recolectará (Hurtado, 2010).

Al respecto, esta investigación tuvo un diseño mixto (de campo y de laboratorio) ya que los datos se tomaron directamente de la realidad donde ocurren los hechos, sin manipular o controlar las variables, y posteriormente fueron procesados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. De acuerdo a la amplitud y el tiempo de la investigación, fue polivariable, longitudinal y contemporánea, ya que se estudiaron dos variables diferentes, los datos se recolectaron a lo largo de un período de tiempo y en el presente (Hernández *et al.*, 2010).

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La población es definida como el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones (Hernández *et al.*, 2005). Para el presente estudio, el grupo poblacional estuvo representado por los frutos de los árboles de *Azadirachta sp* seleccionados para la valoración de actividad antioxidante.

Selección del Tamaño de la Muestra

La muestra es un subgrupo de la población (Hernández, *et al.*, 2005). Al respecto, se seleccionaron al azar y a conveniencia los frutos maduros del árbol de *Azadirachta sp*, en la finca “El Garzón”, sector Caño las Monas, parroquia Urdaneta, municipio Páez, estado Apure.

Sistema de Variables

En el desarrollo del trabajo investigativo, el científico indaga sobre ciertas propiedades que se modifican a las que se les denomina variables; en este sentido, una variable es una característica o cualidad, magnitud o cantidad que puede sufrir cambios y que es objeto de análisis, medición, manipulación o control en una investigación. Según su función las variables se clasifican en: independientes, dependientes e intervinientes. (Arias, 2006).

De acuerdo a lo descrito, la variable independiente de la investigación fue representada por los extractos de semillas de *Azadirachta sp*, ya que es quien genera y explica los cambios en la variable dependiente. Por su parte, la variable dependiente de la investigación estuvo representada por la actividad antioxidante que pueden presentar los extractos de semillas de *Azadirachta sp* (Arias, 2006).

Procedimientos de la Investigación

Materiales, Equipos y Reactivos

Material vegetal

Estuvo constituido por los frutos de *Azadirachta sp* tomados a conveniencia en la finca “El Garzón”, sector Caño las Monas, parroquia Urdaneta, municipio Páez, estado Apure.

Material de laboratorio

- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Vasos de precipitación
- Trípode
- Papel filtro
- Varilla de agitación
- Pipetas
- Pinza para tubos de ensayo
- Guantes de látex
- Matraces de Erlenmeyer
- Probetas
- Embudo
- Papel absorbente
- Algodón
- Tijera
- Refrigerante
- Espátula
- Puntas estériles para micropipetas
- Micropipetas

Equipos

- Balanza analítica
- Desecador
- Estufa
- Rotavapor
- pH – metro
- Refrigeradora
- Autoclave
- Baño maría
- Vórtex
- Espectrofotómetro

Reactivos

- Etanol
- Agua destilada
- Peróxido de Hidrógeno
- Solución de ácido úrico

Preparación de la Muestra

A partir de la planta *Azadirachta sp*, se recolectaron los frutos en buen estado vegetativo, para dejarlos secar a la sombra de 5 a 7 días. Posteriormente, con ayuda de un mortero se procedió a pelar ligeramente los frutos enteros, con el fin de abrir las cascaras sin romper las almendras; dichas almendras fueron molidas hasta obtener un polvo fino, el cual representó la muestra para procedimientos posteriores.

El polvo fino proveniente de las semillas del Neem se mezcló por 15 minutos con los disolventes a emplear: agua y etanol y se dejaron reposar durante 30 horas, posteriormente la mezcla fue filtrada con papel filtro a fin de obtener los respectivos extractos que luego se utilizaron para la determinación de la actividad antioxidante.

Determinación de la Actividad Antioxidante

Para medir la actividad antioxidante, se tomaron los extractos acuosos y orgánicos de las semillas del Neem previamente preparados, en el cual se unieron 7,5g del polvo fino de las semillas con 30mL del solvente correspondiente (agua y etanol) para luego filtrar la mezcla y conservar el extracto el cual se utilizó en los respectivos métodos empleados.

Método del Radical ABTS●+

Se utilizó el ensayo de decoloración en solución etanólica, donde el catión radical ABTS+● fue producido por la reacción de la solución stock de ABTS previamente diluida a 7mM, con el persulfato de potasio a una concentración

final de 2.45mM (en agua). Este proceso fue realizado en oscuridad durante 12-16 horas antes de su uso.

Para el estudio de compuestos fenólicos, la solución de ABTS+● se diluyó con etanol hasta una absorbancia de 0.70 (± 0.02) a 734nm a 30°C, la cual se logró mezclando aproximadamente 40 μ L de la solución de ABTS y 960 μ L de etanol al 20%v/v. Posteriormente fueron tomados 10 μ L de las soluciones stock de antioxidantes fenólicos preparados en etanol y se colocaron en la cubeta del espectrofotómetro con 1.0mL de la solución de ABTS+●, para medir los valores de densidad óptica a una longitud de onda de 734nm en 1 minutos y luego a los 6 minutos después de la mezcla.

Se utilizó como estándar una solución de 8mM de Trolox, la cual fue diluida previamente para obtener concentraciones finales de 1, 2, 4 y 8 μ M, en buffer PBS 5mM (pH 7.4). Finalmente se procedió a calcular el porcentaje de disminución de color (o de secuestro del catión radical ABTS) a 734nm después de 6 minutos de reacción, para realizar una gráfica del porcentaje de disminución de color en función de las diferentes concentraciones del estándar (Trolox), y poder reportar el valor de actividad antioxidante total (AAT) de las muestras problemas en comparación con la ecuación de la recta obtenida con este gráfico. El valor de AAT para una muestra dada fue el equivalente en concentración de Trolox que produce el mismo porcentaje de disminución de color. Todas las determinaciones se llevaron a cabo tres veces, para cada una de las muestras y soluciones estándar.

Método de la Actividad Antioxidante (AOA)

El valor de la AOA fue determinado por el método de Koracevic, donde se utilizó una solución estandarizada de Fe-EDTA que reaccionó con el peróxido de hidrogeno, produciendo la formación del radical hidroxilo (OH•). El radical libre formado (OH•) debe reaccionar con el benzoato degradándolo y liberando especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Los reactivos utilizados fueron: Buffer fosfato de sodio 100mM pH 7.4, Benzoato de sodio 10mM, NaOH 50mM, EDTA 2mM en buffer fosfato, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2mM, solución Fe- EDTA, H_2O_2 10mM, ácido acético 20% v/v, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% p/v en 50mM de NaOH, ácido úrico 1mM en 5mM de NaOH. Esta reacción fue monitoreada espectrofotométricamente, donde la inhibición del desarrollo de color en presencia del antioxidante se definió como AOA, en comparación con ácido úrico como estándar.

Para cada muestra a estudiar se tuvo que preparar su propio control, en la cual la mezcla Fe-EDTA y el H_2O_2 se agregaron después del ácido acético 20%. Para cada serie de análisis se preparó un control negativo (K1 y K0), por triplicado conteniendo los mismos reactivos que A1 o A0, excepto que la muestra antioxidante fue reemplazada con buffer fosfato. Los estándares contendrán 1mM de ácido úrico (UA1 y UA0) y fueron usados en la calibración.

Posterior a la preparación, los tubos se incubaron por 10 minutos a 100°C en baño de maría, y se dejaron enfriar en baño de hielo. Luego se procedió a medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 532nm, donde se utilizó agua destilada como blanco.

Determinación de Fenoles Totales

La determinación de FeT se basó en el método reportado por Kim et al. (2003), empleando el método descrito por Singleton y Rossi (1965), con algunas modificaciones. Para ello, una alícuota (200 μ L) del extracto fenólico fue transferido a un balón volumétrico de 25mL que contendría 9mL de H₂O. Seguidamente, fueron añadidos 1mL del reactivo Folin & Ciocalteu y se agitó. Después de 5 minutos, se agregaron 10mL de Na₂CO₃ al 7% m/v y se aforó con H₂O, agitando vigorosamente. Posteriormente, se procedió a incubar por 90 minutos en un lugar oscuro y la absorbancia fue medida en un (Spectronic 20 Genesys®, USA) a una longitud de onda de 750nm. La absorbancia final de cada muestra fue comparada con una curva estándar de ácido gálico (0-20mg/L) preparados en H₂O. La curva se construyó siguiendo el mismo procedimiento descrito para la muestra pero sustituyéndola por 1mL de cada patrón de ácido gálico (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 500mg/L), y utilizando H₂O como blanco. El contenido de fenoles totales del material vegetal se expresó en mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g de muestra seca. La precisión analítica fue evaluada mediante las desviaciones estándares relativas (DER) obtenidas para un total de tres repeticiones por muestra.

Determinación de Flavonoides Totales

El contenido de FIT se determinó de acuerdo al método colorimétrico del cloruro de aluminio, procedimiento modificado reportado por Woisky y Salatino (1998). En este método, la Quercitina fue usada como estándar para construir una curva de calibración, para lo cual 10mg de Quercitina se disolvieron en etanol al 80% (v/v), y fueron diluidos hasta concentraciones de

25, 50 y 100µg/mL. Las soluciones estándar diluidas (0,5mL) se mezclaron por separado con 1,5mL de etanol al 95% (v/v), 0,1mL de cloruro de aluminio al 10% (p/v), 0,1mL de acetato de potasio 1M y 2,8mL de agua destilada. Después de la incubación por 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de la mezcla de reacción a 415nm. La cantidad de cloruro de aluminio se sustituye por agua destilada en el blanco. De modo similar, 0,5mL de los extractos de la muestra en estudio (etanol y agua) se dejaron reaccionar con el cloruro de aluminio para la determinación del contenido de flavonoides como se describió anteriormente. El contenido de flavonoides totales se expresó en mg equivalente de Quercitina/g de muestra seca.

Diseño de Análisis

Los datos recolectados fueron analizados a través de un enfoque cuantitativo, al expresar numéricamente los resultados. Igualmente tuvieron un enfoque cualitativo, al describir los resultados obtenidos. En el análisis de los datos de la investigación se utilizó la T de student para correlacionar los valores para fenoles, flavonoides y actividad antioxidante y determinar diferencias significativas entre los mismos.

CAPITULO IV

MARCO DE LA INVESTIGACION

Resultados y discusiones

Los extractos etanólicos y acuosos de *Azadirachta sp* en el presente trabajo de investigación fueron obtenidos a partir de las semillas, dichas muestras se recolectaron en la finca “El Garzón”, sector Caño las Monas, parroquia Urdaneta, municipio Páez, estado Apure, Venezuela. Estas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de los Andes, donde se determinó la concentración de fenoles, flavonoides; además de determinar la actividad antioxidante a través de diferentes métodos (ABTS y AOA). Las distintas determinaciones que se realizaron fueron analizadas por medio de la T de student donde se determinaron relaciones entre los valores obtenidos de cada método.

Determinación de la concentración de fenoles y flavonoides de los extractos etanólicos y acuosos de *Azadirachta sp*.

La presencia de fenoles y flavonoides de los extractos etanólicos y acuosos de *Azadirachta sp*. están reflejados en la tabla N°3 donde se observan las concentraciones medias obtenidas tanto para el extracto acuoso como el extracto etanólico, que fueron determinadas en las muestras analizadas a través de diferentes métodos.

Tabla N° 3. Concentración media de fenoles y flavonoides de las muestras analizadas.

	Fenoles		Flavonoides	
	mg Equivalentes de ácido gálico/ g de muestra	µg Equivalentes de ácido gálico/ mL	Mg equivalentes de Quercitina/ g de muestra	µg equivalentes de Quercitina/ mL
Extracto				
Etanol	0,271±0,03	67,63±6,64	0,472±0,024	11,80±0,62
Agua	0,530±0,01	132,9±2,65	0,509±0,028	12,74±0,70

Los datos reportados representan la media ± desviación estandar (n=3).

Respecto a los valores reflejados en la tabla podemos observar que el contenido de fenoles vario significativamente entre el extracto acuoso y etanólico, con un (p valor<0,05) observando mayor contenido de fenoles totales en el extracto acuoso, sin embargo en el extracto etanólico están presentes pero a concentraciones más bajas. En cuanto a la determinación de flavonoides los valores presentes en la tabla nos muestran que hay mayor contenido de los mismos en el extracto acuoso en comparación con el etanólico, pero estos valores no presenta una diferencia significativa obteniéndose un (p valor >0,05).

En un estudio realizado por Amal Kumar *et al.*, (2009) cuyo objetivo fue evaluar la Actividad antioxidante y estimación cuantitativa de azadiractina y nimbina en *Azadirachta Indica A. Juss* tanto en hoja como en corteza, procesaron 30 g de cada una de las muestras para luego suspender y

extraer con 500 mL de metanol al 80% (v/v), estas mezclas fueron mantenidas durante 2 días en agitación a temperatura ambiente, para luego ser filtradas y rota-evaporadas, dicho procedimiento lo realizaron por duplicado. Los valores obtenidos para el contenido fenólico presentaron diferencia significativa entre la corteza y la hoja. El extracto bruto metanólico mostró el mayor contenido de polifenoles con 651.07 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en la corteza y 126.72 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en la hoja, en cuanto a la determinación cuantitativa de flavonoides el estudio reveló que la hoja tiene mayor contenido de flavonoides que la corteza, por otra parte al realizar la estimación cuantitativa de azadirachtina y nimbina, en este artículo de investigación donde se hizo análisis de HPLC de distintos compuestos con actividad biológica en distintas partes de la planta determinaron que la presencia de los mismos y sus concentraciones dependen tanto del solvente como de la parte de la planta del cual se extraen.

Por otro lado, Ravichandran *et al.*, (2012) realizaron un estudio en el que determinaron la Caracterización del potencial antioxidante in vitro de *Azadirachta indica* y *Abutilon indicum* mediante diferentes métodos de ensayo, basados en las flores de *A. indica* y hojas de *A. indicum*, en el cual utilizaron para sus determinaciones un extracto en metanol, mezclando 20 gramos en 200 mL de solvente, este procedimiento fue realizado por triplicado y concentrados en un rota-evaporador, dichos extractos fueron designados como AFE para *A. indica* y ALE para *A. indicum*, encontrando los siguientes resultados, en los extractos de metanol de AFE registrados arrojaron altos niveles de fenoles libres totales ($350 \pm 0,97$ mg EAG/ g) seguido de alcaloides totales ($32 \pm 2,46$ mg / g); total saponinas (1.426 ± 1.05 mg / g) y flavonoides totales (0.355 ± 1.35 mg EQ / g), determinando así que el ingrediente activo en el aceite AFE en mayor cantidad son los fenoles, el cual muestra una notable actividad antioxidante.

Otro ejemplo lo constituye el trabajo realizado por Cipiran (2019), en el que determinó la Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de hojas y frutos de *Azadirachta indica* "Neem", para lo cual tomaron 0,25 g de hojas y 0,30 g de fruto en 15 mL de metanol mezclándolo con ácido fórmico, posteriormente filtraron, pesaron el filtrado y centrifugaron obteniendo el sobrenadante, este procedimiento fue realizado por triplicado, adicionalmente a eso prepararon por infusión y decocción 2 g tanto de hoja como de fruto para también ser utilizados en los ensayos posteriores, encontrando los siguientes resultados: polifenoles en hoja 20,36 mg / g y en fruto 58,99 mg / g, infusión en hoja 25,63 mg /g y en fruto 11,47 mg/ g y por último decocción en hoja 15,19 mg/ g y en fruto 11,01 mg / g.

Como se puede observar en los trabajos anteriormente mencionados, todas las concentraciones obtenidas tanto de fenoles como flavonoides en las distintas partes de la planta procesadas, reflejan valores de concentración muy elevados a los obtenidos en el trabajo realizado, esto puede explicarse debido a que los métodos para la preparación de los extractos en cada uno de los artículos mencionados contenían procedimientos donde permitían concentrar la muestra, extraer mayor cantidad de compuestos bioactivos de cada parte de la planta y utilizar relaciones de porcentaje (p/v) que involucraran mayor peso de muestra y mayor volumen de solventes, esto implica que los extractos utilizados en cada uno de los trabajos de las investigaciones anteriormente mencionadas fueron más procesados que los utilizados para nuestro estudio.

Ahora bien, en un trabajo realizado por Gayatri y R.K (2011), donde evaluaron la actividad antioxidante de flor y aceite de semilla de *Azadirachta indica* A. juss, la extracción de aceite la realizaron por prensado mecánico y las flores fueron procesadas mediante un aparato Soxhlet utilizando diversos

solventes (agua, metanol y etanol), luego se filtraron y los extractos fueron concentrados en un rota-evaporador para posteriormente ser utilizados en las distintas determinaciones. Los resultados obtenidos para fenoles fueron de 132 $\mu\text{g} / \text{mL}$ en semilla, para flores 86 $\mu\text{g} / \text{mL}$ en etanol, 34 $\mu\text{g} / \text{mL}$ en metanol y 15 $\mu\text{g} / \text{mL}$ en agua, las proporciones para la mezcla de los extractos no fueron publicadas, a pesar de la falta de los datos de las concentraciones de preparación de los extractos de este artículo de investigación y de que nuestro extracto no proviene de un aceite de semilla de neem donde los compuestos activos se presentan en mayor concentración podemos inferir que nuestros valores en concentración de fenoles son iguales e incluso hasta mayores que los reportados tanto para los extractos de flor procesados en Soxhlet como los extractos de aceite de semilla de neem, lo que indica que nuestro procedimiento de extracción a pesar de ser muy básico permite obtener valores comparables con procedimientos un poco más elaborados y mezclas más bioactivas como es el caso del aceite crudo de neem.

Por último, Al Akeel *et al*, (2015) realizaron un trabajo en el que analizaron la actividad antibacteriana y antioxidante de la corteza de *Azadirachta indica* utilizando diversos extractos de disolventes, dichos extractos fueron preparados mezclando 100 g de polvo de corteza en 500 mL de los distintos solventes, reportando para fenoles concentraciones en los extractos de metanol y etanol de 2,680 y 1,462 mg EAG / mL respectivamente, mientras que para los extractos en acetona y agua reportan valores de 0,592 y 0,762 mg EAG / mL, en cuanto a los flavonoides los resultados fueron de 3,58; 2,53; 1,79 y 1,48 mg EQ /mL para metanol, etanol, acetona y agua respectivamente, indicando una vez más que los valores obtenidos por nosotros son el resultado de la metodología utilizada para obtener los extractos ya que la cantidad de muestra y volumen de solvente utilizado en

este trabajo de investigación representan más de diez veces el volumen y la cantidad de muestra utilizada por nosotros, lo que se refleja en las concentraciones de fenoles y flavonoides obtenidas. Adicionalmente a esto como se observa en los distintos trabajos mencionados las cantidades de fenoles y flavonoides obtenidas también dependen de los solventes utilizados y de la parte de la planta que se esté estudiando, aunado a esto existe infinidad de reportes como los de (Kaura, 1998; Kaushik, 2007), que indica que la composición fotoquímica de la planta esta influenciada también por la ubicación geográfica de la misma.

Actividad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de *Azadirachta sp*

Una vez realizada la determinación de la presencia de fenoles y flavonoides, se procedió a determinar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de *Azadirachta sp* mediante el método del catión radical ABTS y el método AOA, cuyos resultados obtenidos están representados en la tabla N°4, de acuerdo al método en ABTS los resultados fueron expresados en mg E de trolox/ gramo de muestra y en μM equivalentes de trolox, en cuanto al método AOA, Los valores obtenidos en los extractos analizados se expresaron en mM equivalentes de ácido úrico, adicionalmente se calcularon los porcentajes de inhibición en función de la disminución de la absorbancia reportada para el método ABTS a 734nm.

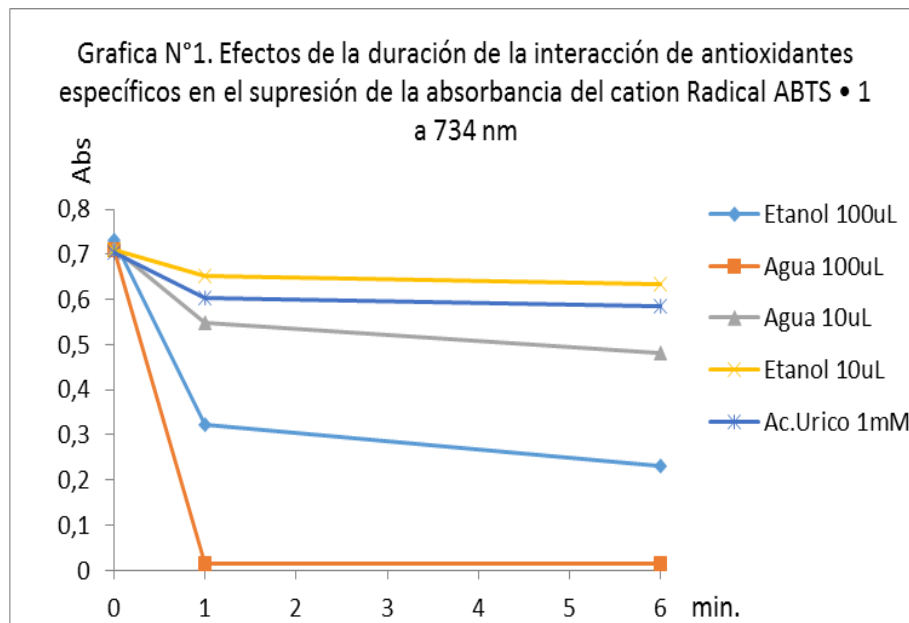
Tabla N°4. Actividad antioxidante de los extractos analizados por el método del radical ABTS, método AOA y % de inhibición

ABTS					AOA (mM equivalentes de Ácido úrico)	
mg Equivalentes de trolox/g de muestra			µM equivalentes de trolox			
	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua
10µL	0,00019±0,005	0,00242±0,00	0,19±0,02	2,421±0,085	1,139±0,034	
100µL	0,0062±0,00021	0,0093±0,00023	6,233±0,336	9,012±0,016		-0,014±0,025
Porcentajes de inhibición para ABTS						
10µL			100µL			
Etanol	10,72%		68,44%			
Agua	32,69%		97,89%			
Ácido úrico	16,9%					

Los datos reportados representan la media ± desviación Estándar (n=3).

Como se puede observar en la tabla, con respecto a los resultados de ABTS para los extractos en agua obtuvimos valores significativamente mayores que los obtenidos para los extractos en etanol, con un (p valor < 0,05) lo que indica que los mismos poseen mayor actividad antioxidante que los etanólicos, tanto para 10 µL de muestra como para 100 µL de muestra, por otro lado en cuanto a los porcentajes de inhibición, fue mucho mayor en los extractos acuosos que en los etanólicos para las mismas condiciones de ensayo, incluso se pudo determinar que el extracto acuoso posee mayor porcentaje de inhibición que el ácido úrico, siendo conocido como un compuesto antioxidante y que también está presente en la sangre.

En un trabajo realizado por Rinaldi, et al (2017) en el cual caracterizaron y evaluaron la actividad antioxidante de nanoemulsiones de aceite de neem, así como la actividad antioxidante del aceite solo, utilizando aceite comercial, encontraron por el método de ABTS un valor de 14,78 mg E de trolox / g de aceite y por el DPPH 7,59 mg E de trolox / g de aceite, a su vez reportaron para las nanoemulsiones valores de: 35,02 y 22,72 mgE trolox/ L de la muestra A1 para ABTS y DPPH respectivamente y 53,06 en ABTS y 87,79 en DPPH mg E trolox/ L de muestra A2. En base a esto se puede inferir que la concentración obtenida de la capacidad antioxidante de las extractos en estudio en mg equivalentes de trolox / g de muestra, representa un valor muy bajo en comparación, esto probablemente se deba a que en el aceite, los compuestos antioxidantes están en mayor proporción que los presentes en un extracto crudo obtenido en las condiciones de ensayo utilizadas; a su vez estos valores también indican que la concentración obtenida va a estar definida por el método que se utilice.



Sin embargo, como se puede observar en la gráfica N°1 donde se ilustra los efectos de la duración de la interacción de antioxidantes específicos en la supresión de la absorbancia del catión radical ABTS+ a 734 nm de los extractos tanto en agua como en etanol utilizando volúmenes de 100 μ L y 10 μ L y comparado con una solución de Ácido Úrico 1 mM, podemos inferir que nuestro extracto en agua para 10 μ L (volumen utilizado para la solución de Ácido Úrico 1 mM) presenta mayor disminución de absorbancia a lo largo del tiempo que la solución de ácido úrico 1 mM utilizado como estándar, a pesar de estar a una concentración muy inferior 2,42 μ M Etrolox, a su vez vale la pena resaltar que para un volumen de 100 μ L (concentración 9 μ M Etrolox de extracto en agua) obtuvimos una supresión total de la absorbancia en 1 minuto de reacción. En el caso de los extractos en Etanol, solo la muestra de 100 μ L presentó mayor disminución de la absorbancia a una concentración de 6,23 μ M ETrolox que el estándar de ácido úrico.

En base a esto y según lo expuesto por Re, *et al* (1998), donde se propone y se explica el método original de ABTS, concluyen, que para determinar la actividad antioxidante de un compuesto en base a distintos estándares o patrones, se hace necesario tomar en cuenta las influencias tanto de la concentración de antioxidante como de la duración de la reacción en la inhibición de la absorción del catión radical, por tal motivo, se procedió a evaluar la actividad antioxidante presentada por los extractos en estudio, tanto en etanol como en agua, ya que en este método se estudia la capacidad antioxidante del trolox presentada en porcentaje de inhibición con respecto a la concentración del trolox, realizada en las mismas condiciones experimentales utilizadas en esta experiencia. A su vez realizando comparaciones de este porcentaje de inhibición de Trolox, en función de la concentración con distintos tipos de compuestos estándares con actividad antioxidante todos basados en la supresión de las absorbancias de los

mismos con respecto al tiempo y comparando los resultados obtenidos de porcentaje de inhibición de los extractos estudiados con respecto a los porcentajes de inhibición de Trolox a distintas concentraciones (2 μ M trolox aprox. 8%; 9 μ M trolox aprox. 40% Valores reportados por Re, et al 1998) pudiendo concluir que los extractos en agua de la presente investigación presentan mejor porcentaje de inhibición que el Trolox a la concentraciones evaluadas con un aumento del porcentaje de inhibición de más del 20% para la concentración de 2 μ M de Trolox y más de 50% para una concentración de 9 μ M de trolox, todos estos resultados indican la alta capacidad antioxidante que tienen estos extractos con respecto al trolox y con respecto al ácido úrico 1 mM utilizado como compuesto estándar en nuestra medición (valores expresados en la tabla). Adicionalmente para el extracto en Etanol a una concentración de 6,23 μ M Etrolox, se determinó que este extracto también presentó mejor porcentaje de inhibición que el Trolox a la concentraciones evaluada (6 μ M de trolox; % inhibición aprox. 28%. Valor reportado por Re, et al 1998) con un aumento del porcentaje de inhibición de nuestro extracto cerca del 40%.

Desde el punto de vista biotecnológico los resultados obtenidos son muy importantes ya que aparte de indicarnos que los extractos estudiados poseen un alto porcentaje de inhibición del catión radical ABTS+ en comparación con varios compuestos estándares de uso comercial, también nos indica que estos porcentajes se obtuvieron a concentraciones muy bajas en comparación con valores reportados en las bibliografías disponibles para este método, lo que se traduce en una mejor actividad antioxidante de los extractos estudiados, sumado a esto resalta la metodología como fueron obtenidos dichos extractos, la cual no involucra costos de producción elevados.

En cuanto a los resultados obtenidos por el método AOA plasmados en la tabla N° 3, podemos observar que en comparación con el extracto acuoso, el extracto etanólico es quien presenta mayor actividad antioxidante por este método, incluso mayor en comparación con el patrón de ácido úrico cuya concentración es de 1 mM, esta diferencia de concentración entre ambos extractos y teniendo en cuenta que con el método de ABTS se presenta de manera contraria podría deberse a diversos factores tales como: 1) los solventes empleados, 2) en este método el radical es formado durante la mezcla a diferencia del método de ABTS en el cual ya el radical está formado, lo cual puede estar influyendo en el valor obtenido y también podría deberse a que en este método el extracto reacciona con un radical de carga negativa mientras que el radical ABTS es de carga positiva, por otro lado comparando también con antioxidantes comerciales como Quercitina, Acido lipóico y melatonina cuyos valores son de 0,86; 0,71 y 0,83 mM equivalentes de ácido úrico respectivamente, el extracto etanólico presenta mayor actividad antioxidante, es importante destacar que los valores de actividad antioxidante de nuestro extracto etanólico es comparado con estos antioxidantes comerciales ya que estos compuestos presentan una gran capacidad antioxidante.

Ahora bien, en un trabajo realizado por Pérez, Rodríguez y Vit (2009), en el que evaluaron la actividad antioxidante en vinos de mora a través de diversos métodos entre ellos AOA procesaron la fruta a través de prensado para posteriormente dejarla fermentar y luego colarla, obteniendo valores de actividad antioxidante por el método AOA de 0,80 a 0,95 mM de ácido úrico, a pesar de la falta de los datos de las concentraciones que utilizaron para las determinaciones en este artículo de investigación y de que el presente estudio no se basa en vino sino en extractos provenientes de la semilla de neem podemos inferir que el valor obtenido en concentración de actividad

antioxidante en el extracto etanólico es superior que los reportados por el presente artículo de investigación, lo que indica que a pesar de ser muestras totalmente diferentes, pero de igual forma son productos de consumo natural nos permite obtener valores comparables en cuanto a concentración de actividad antioxidante.

En cuanto al trabajo de investigación realizado por Molina y Gracia (2020), cuyo objetivo fue determinar la actividad antioxidante en extractos metanólicos de hojas flores y semillas de *Moringa oleífera* en donde la muestra fue sometida a extracción sólido-líquido por maceración en frío, los resultados obtenidos fueron de hojas 1,00; flores 0,44 y semillas 1,20 mM equivalentes de ácido úrico, a pesar de tratarse de otra planta en estudio y de no conocer las concentraciones en que fueron procesados dichos extractos, comparando con nuestros resultados podemos inferir que nuestro extracto etanólico presenta mayor actividad antioxidante en comparación con los extractos en hojas y flores y muy similar con respecto al extracto en semilla.

Es importante mencionar que estos valores de actividad antioxidante obtenidos por éste método fueron comparados con los artículos anteriormente mencionados ya que no existe bibliografía sobre éste método aplicado a la planta en estudio, incluso a plantas pertenecientes a la misma familia, por lo que los resultados obtenidos fueron comparados con extractos de frutos, semillas, tallo y hojas de plantas que pertenecen a géneros y familias distintas a la planta en estudio, siendo así el primer resultado de actividad antioxidante en base a este método para éste género de planta.

Conclusiones

- El contenido de fenoles varió significativamente entre el extracto acuoso y etanólico, con un (p valor $< 0,05$) observando mayor contenido de fenoles totales en el extracto acuoso.
- El contenido de flavonoides es mayor en el extracto acuoso en comparación con el etanólico, pero estos valores no presenta una diferencia significativa obteniéndose un (p valor $> 0,05$).
- Los valores obtenidos de fenoles y flavonoides de nuestros extractos en estudio son bajos en comparación con la mayoría de los valores reportados en la bibliografía consultada lo que es debido al procedimiento de extracción utilizado.
- La actividad antioxidante medida por el método del radical ABTS para los extractos en agua apporto valores significativamente mayores que los obtenidos para los extractos en etanol, con un (p valor $< 0,05$), tanto para $10\mu\text{L}$ de muestra como para $100\mu\text{L}$ de muestra.
- El porcentaje de inhibición fue mucho mayor en los extractos acuosos que en los etanólicos para las mismas condiciones de ensayo.
- La concentración obtenida de la capacidad antioxidante de las extractos en estudio en mg equivalentes de trolox / g de muestra, representa un valor muy bajo en comparación con las bibliografías consultadas, por lo que relacionadas con los altos valores obtenidos de porcentajes de inhibición de la absorbancia del catión radical

ABTS+ a 734nm, indicaron que los extractos en estudio presentan muy buena actividad antioxidante, en comparación con el Trolox y otros compuestos antioxidantes estándares de uso comercial.

- La actividad antioxidante medida por el método AOA arrojó valores mayores en el extracto etanólico en comparación con el extracto acuoso.
- El extracto etanólico presenta mayor actividad antioxidante en comparación con antioxidantes comerciales (Quercitina, ácido lipóico y melatonina).
- El extracto etanólico presenta mayor o igual actividad antioxidante por el método AOA comparada con la bibliografía mencionada.

Recomendaciones

- Realizar estudios fotoquímicos de los extractos de *Azadirachta sp*, obtenidos en las mismas condiciones para determinar los metabolitos secundarios que se encuentran en mayor proporción con el fin de caracterizar la actividad antioxidante presentada por los mismos en el método de ABTS.
- Estudiar la actividad antioxidante a través de otros métodos, como DPPH, radical súper oxido dismutasa, entre otros, con el fin de caracterizarla y realizar comparaciones entre métodos para poder llegar en un futuro a establecer escales generales que permitan caracterizar la actividad antioxidante de extractos o compuestos puros en función de mayor o menor actividad
- Determinar las propiedades antimicrobianas de la *Azadirachta sp*, ya que se ha reportado que además de tener propiedades antioxidantes, también posee propiedades antifungicas, antivirales, antimicóticas y antibacterianas.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Al Akeel, R., Mateen, A., Janardhan, K. y Gupta, V. (2017). Analysis of antibacterial and anti oxidative activity of Azadirachta indica bark using various solvents extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 24, 11–14
- Amal Kumar Ghimeray, Cheng-Wu Jin, Bimal Kumar Ghimire and Dong Ha Cho. (2009). Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in Azadirachta Indica A. Juss grown in foothills of Nepal. *African Journal of Biotechnology Vol.8* (13) 3084-3091
- Angulo, M., Gardea, A., Vélez, R., García, R. y Carrillo, A. (2004). Contenido de Azadiractina A en semillas de NIM (Azadirachta indica A. Juss) colectadas en Sinaloa, México. *Rev Fitotecnia Mex*; 27: 305-11.
- Arias, F. (2006). *El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica*. Caracas – Venezuela. Editorial Episteme. 106–109
- Atawodi, S. y Atawodi, J. (2009). *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiplebiological and pharmacologicalactivities. *Phytochem Rev*. (8):601-620.
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca* (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145
- Balestrini, A. (2006). *Cómo se Elabora el Proyecto de Investigación*. (7ma. ed) Caracas: Consultores Asociados.
- Benoit, D., Renand, L. y Daniele, M. (2003). Variant Salmonella genomicisland 1 antibiotic gene resistance cluster in Salmonella enteric serovar. *Albany. Emerg. Infect*. 9 (5), 585–591.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R., Bandyopadhyay, U. (2002). Biological activities and medicinal properties of Neem (Azadirachta indica). *Curr. Sci*. 82:1336-1345

- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia*, Fitoquímica, Plantas Medicinales. Segunda Edición. Acribia. Zaragoza.
- Castellanos, I. y Espinosa, F. (1997). Plant secondary metabolite diversity as a resistance trait against insects: a test with *Sitophilus granaries* (Coleoptera:Curculionidae) and seed secondary metabolites. *Biochemical Systematics and Ecology* 25:591-602.
- Cipiran Vazquez, M. (2019). *Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de hojas y frutos de Azadirachta indica "Neem"*. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Católica los Ángeles, Chimbote Perú.
- Chattopadhyay, R. (2003). Possible mechanism of hepato protective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: Part II. *Journal of Ethnopharmacology*; 89(2-3):217-219.
- Chattopadhyay, R. y Bandyopadhyay, M. (2005). Effect of *Azadirachta indica* leaf extract on serum lipid profile changes in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *African Journal of Biomedical Research*; (8):101-4.
- Cordiés, J., Machado, L. y Hamilton, L (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Med* 8(1):13-27.
- Coventry, E. y Allan, E. (2001). Microbiological and chemical analysis of neem (*Azadirachta indica*) extracts: new data on antimicrobial activity. *Phytoparasitica*; 29: 1-10
- Davis, A. (2012). *Azadirachta indica*. Medicines by design. *NIH Publication* No. 06-474
- Deka, H., Das, S., Lahan, J. y Yadav, R. (2013). In-vitro Free Radical Scavenging, Antioxidant and Antibacterial Activity of *Azadirachta Indica* A. Juss. of Assam. *Advances in Life Sciences*, 3(1): 1-4
- Domingo, D. y Lopez, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *RevEspQuimioterap*; Vol. 16 (Nº 4): 385-393

- Edwards, R. y Gatehouse, J.(1999). Secondary metabolism. pp. 193-218. In: P.J. Lea., and R.C. Leegood (eds.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons Ltd. Maryland, USA. 384 p.
- Ermel, K. (1995). Azadirachtin contents of neem seed kernels from different regions of the world. In: Schmitterer, H. (Ed.). *The neem tree. Source of Unique Natural products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and other purposes*. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo (VCH), pp.89-92
- Escalona, J. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. como premisa para su introducción en la medicina complementaria. [Trabajo en línea]. Tesis de doctorado. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- Finkel, T. y Holbrook, N. (2000).Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Aging. *Nature*, 408, 239-247
- Fong, O., Berenguer, C., De la Vega, J., Wawoe, N. y Puente, E. (2014). Antioxidant potential of an aqueous leaf extract of Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss). *Rev Cubana PlantMed* vol.19 no.2
- Fretes, F. (2010). Plantas medicinales y aromáticas: Una alternativa de producción comercial. Agencia del Gobierno de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID). Paraguay
- Fuentes, R. y Granda, M. (1989). Plantas Medicinales, Medicina tradicional en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*; 23(1-2): 99-155.
- Gayatri Nahak and R.K. Sahu. (2011). Evaluation of antioxidant activity of flower and seed oil of *Azadirachta indica* A. juss. *Journal of Applied and Natural Science* 3(1): 78-81.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2010). *Metodología de la investigación* (5ta ed.). México D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Hurtado J. (2010). *Guía para la comprensión Holística de la Ciencia*. Fundación Sypal: Caracas.

- Kaura, S., Gupta, S. y Chowdhury, J. (1998). Morphological and oil content variation in seeds of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from northern and western provenances of India. Department of Genetics, CCS Haryana Agricultural Univ. Hisar, India.
- Kaushik, N., Gurudev Singh, B., Tomar, U., Naik, S., Satya, V., Bisla, S., Sharma, S., Banerjee, S. y Thakkar, P. (2007). *Curr.Sci*, 92(10),1400-1406.
- Kim, D.; S. Weon y C. Lee. 2003. Antioxidant Capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81:321-326.
- Kumar, V. y Navaratnam, V. (2013). Neem (*Azadirachta indica*): prehistory to contemporary medicinal uses to humankind. *AsianPac J TropBiomed.* 3(7):505-14.
- Kähkönen, M., Anu, I. C., y Marina, H. (2001). Berry fenolics and their Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076-4082.
- Leos, C., Rivas, C. y García, D. (2016). *Actividad antioxidante y toxicidad. Investigación en plantas de importancia médica.* Barcelona, España: OmniaScience. 41-76
- Li, H., Jiang, Y., Wong, C., Cheng, K. y Chen, F. (2007). Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Anal Bioanal Chem.* 388:483-489.
- López, V., Akerreta, S., Cavero, R. y Calvo, M. (2007). Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra. *Revista de Fitoterapia*; 7 (1): 43-47
- Manikandan. P., Letchoumy, P., Gopalakrishnan, M. y Nagini, S. (2008). Evaluation of *Azadirachta indica* leaf fractions for in vitro antioxidant potential and in vivo modulation of biomarkers of chemoprevention in

- the hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Food and Chemical Toxicology*. (46):2332-2343.
- Mead, P., Slutsker, L. y Dietz, V.(1999). Food related illnesses and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 841–842
- Mitchell, M., Smith, S., Johnson, S., y Morgan, E. (1997). Effects of the neem three components azadiractin, salanin, nimbin, and 6- desacetylnimbin on ecdysone 20- monooxygenase activity. *Arch Insect BiochemPhysiol*; 35: 199-209.
- Molina M Y Garcia A. (2020). *Actividad antioxidante in vitro de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de Moringa oleífera de Mérida (Venezuela)*. Trabajo de grado para optar por el título de Licenciada en Bioanálisis. Universidad de los Andes, Mérida.
- Mossini, S., De Oliveira, K. y Kimmelmeier, C. (2004).Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* cultured with neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. *J Basic Microbiol*;44(2):106-13.
- Muñoz, F. (2002). *Plantas Medicinales y Aromáticas. Estudio, cultivo y procesado*. Madrid: Mundi Prensa, pp 15
- Naima, S., Muhammad, R. y Maria, S. (2012).Antioxidant activity total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement. Altern.Med.* 12, 221.
- Nandita, D., MdEkramul, I., Nusrat, J., Mohammad, I., Alam,K., MdRafikul, I. y MstShahnaj, P.(2014). Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *BMC Complement.Altern.Med.* 14, 45.
- Nishan, M. y Subramanian, P. (2014). Pharmacological and non pharmacological activity of *Azadirachta indica* (Neem) - A review.*Int. J. Biosci.* Vol. 5, No. 6, p. 104-112

- Parella, S. y Martins, F. (2004). Metodología de la Investigación Cuantitativa. Caracas: Fedupel.
- Pankaj, S. (2011). Review on neem (*Azadirachta indica*) Thousand problem one solution *IRJP*, 2(12), 97-102.
- Parotta, J. (2001). Healing plants of Peninsular India. CABI Publishing. pp. 495-496
- Pastene, E. (2009). Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 449-455.
- Pérez-Pérez Elizabeth M, Rodríguez-Malaver Antonio y Vit Patricia (2009). Los vinos de mora de Mérida son una buena fuente de antioxidantes. *Salud, Arte y Cuidado*. Vol. 2. Nro. 2.
- Pokhrel, B., Rijal, S., Raut, S., y Pandeya, A. (2015). Investigations of antioxidant and antibacterial activity of leaf extracts of *Azadirachta indica*. Vol. 14(46), pp. 3159-3163
- Ravichandran Harini, Sivalingam Sindhu, Elumalai Sagadevan, Perumal Arumugam (2012). Characterization of in vitro antioxidant potential of *Azadirachta indica* and *Abutilon indicum* by different assay methods. *Journal of Pharmacy Research* 5 (6), 3227-3231.
- Re Roberta, Pellegrini Nicoletta, Proteggente Anna, Pannala Ananth, Yang Min and Rice-Evans Catherine (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, Nos. 9/10 1231–1237.
- Rinaldi Federica, Hanieh Patrizia Nadia, Longhi Catia, Carradori Simone, Secci Daniela, Zengin Gokhan, Ammendolia Maria Grazia, Mattia Elena, Favero Elena, Marianecchi Carlotta y Carafa Maria (2017). Nanoemulsiones de aceite de neem: caracterización y actividad antioxidante. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32 (1): 1265-1273.

- Robbins, R. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887.
- Sagar, K. y Vidyasagar, G. (2010). Antimicrobial activity of -(1-hydroxy-2-methylpropyl)- (2-hidroxy-3-methylbut-2-en-1-yl) polymethylene from *Caesalpinia bonducella* (L.) *Flem. Indian J Pharm Sci.* 72(4):497-500.
- Sellapan, S., Akoh, C. y Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J Agric Food Chem.* 50:2432-2438.
- Singleton, V. y J Rossi. 1965. Colorimetric of total phenolic with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am.J. Enol. Vitic.* 16:144-158.
- Sepúlveda, G., Porta, H., y Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:355-363.
- Van Der Nat, M., Van Der Sluis, K. y Labadie, R. (1991). *J Ethnopharmacol*, 35, 1-24.
- Vongtau, H., Abbah, J., Chindo, B., Mosugu, O., Salawu, A., Kwanashie, H. y Gamaniel, K. (2005). Central inhibitory effects of the methanol extract of *Neorautanenia* root in rats and mice. *J. Pharm. Biol.* 43, 113-120.
- Wink, M. (1999). Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. pp. 1-17. In: M. Wink M. (ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Annual Plant Reviews. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK.* 374 p.
- Zengin, G., Cakmak, Y., Guler, G. y Aktumsek, A. (2011). Antioxidant properties of methanolic extract and fatty acid composition of *Centaurea urvillei* DC. subsp. *hayekiana* Wagenitz. *Rec. Nat. Prod.* 5, 123-132.

- Zhishen, J., T. Mengeheng y W. Jianming. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64:555-559.
- Zulfigar, A., Tikki, P. y Bhutta, B. (1994). Typhoid fever and other salmonellosis a continuing challenge. *TrendsMicrobiol.* 3 (7), 253–256.

www.bdigital.ula.ve