



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA EXTRACTABLE DE LA SEMILLA
DEL ÁRBOL DE NEEM (*Azadirachtin indica A. Juss*) OBTENIDA A NIVEL
LABORATORIO POR LIXIVIACIÓN**

Margarita María López Gomar

Asesorado por el Ing. César Alfonso García Guerra

Coasesorado por el Ing. Adrián Antonio Soberanis Ibáñez

Guatemala, julio de 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA EXTRACTABLE DE LA SEMILLA
DEL ÁRBOL DE NEEM (*Azadirachtin indica A. Juss*) OBTENIDA A NIVEL
LABORATORIO POR LIXIVIACIÓN**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

MARGARITA MARÍA LÓPEZ GOMAR

ASESORADO POR EL ING. CÉSAR ALFONSO GARCÍA GUERRA
COASESORADO POR EL ING. ADRIÁN ANTONIO SOBERANIS IBÁÑEZ

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, JULIO DE 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I	Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno
VOCAL II	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL III	Ing. Miguel Ángel Dávila Calderón
VOCAL IV	Br. Juan Carlos Molina Jiménez
VOCAL V	Br. Mario Maldonado Muralles
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. Jorge Mario Estrada Asturias
EXAMINADOR	Ing. Estuardo Edmundo Monroy Benítez
EXAMINADOR	Ing. Jaime Domingo Carranza González
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA EXTRACTABLE DE LA SEMILLA DEL ÁRBOL DE NEEM (*Azadirachtin indica A. Juss*) OBTENIDA A NIVEL LABORATORIO POR LIXIVIACIÓN

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 17 de abril de 2010.



Margarita María López Gomar



Guatemala, 13 de enero de 2012


Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
Director
Escuela de Ingeniería Química

Estimada Ingeniero Álvarez:

Con un cordial saludo me dirijo a usted para informarle que he revisado y aprobado el Informe Final del Trabajo de Graduación titulado: **“CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA EXTRACTABLE DE LA SEMILLA DEL ÁRBOL DE NEEM (*Azadirachtin indica A. Juss*), OBTENIDA A NIVEL LABORATORIO POR LIXIVIACIÓN”**. Elaborado por la estudiante de Ingeniería Química, Margarita María López Gomar con número de carné 200610996. Por lo que considero iniciar el trámite de aprobación oficial por la Dirección de Escuela.

Agradezco a usted la atención a la presente.

Atentamente,


Ingeniero Cesar Alfonso García Guerra
Asesor de Tesis
Jefe Sección Química Industrial
Centro de Investigaciones de Ingeniería/CII





UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Guatemala, 27 de febrero de 2012
Ref. EI.Q.TG-IF.004.2012

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el Acta TG-002-2012-IF le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Solicitado por la estudiante universitaria: **Margarita María López Gomar**

Identificada con número de carné: **2006-10996**

Previo a optar al título de INGENIERA QUÍMICA.

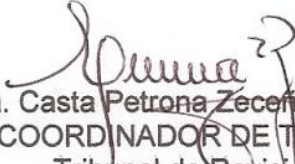
Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

**CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA EXTRACTABLE DE LA SEMILLA
DEL ÁRBOL DE NEEM (Azadirachtin indica A. Juss) OBTENIDA A NIVEL
LABORATORIO POR LIXIVIACIÓN**

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por el Ingeniero: **César Alfonso García.**

Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"


Dra. Casta Petrona Zeceña Zeceña
COORDINADOR DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



ESCUELA DE
INGENIERIA QUIMICA

C.c.: archivo

PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
ACREDITADO POR
Agencia Centroamericana de Acreditación de
Programas de Arquitectura y de Ingeniería
Período 2009 - 2012



ACAAI

Agencia Centroamericana de Acreditación de
Programas de Arquitectura y de Ingeniería



El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación de la estudiante, **MARGARITA MARÍA LÓPEZ GOMAR** titulado: "**CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA EXTRACTABLE DE LA SEMILLA DEL ÁRBOL DE NEEM (Azadirachtin indica A. Juss) OBTENIDA A NIVEL LABORATORIO POR LIXIVIACIÓN**".
Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, Julio de 2012

Cc: Archivo
VMMV/ale





DTG. 311.2012

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA EXTRACTABLE DE LA SEMILLA DEL ÁRBOL DE NEEM (Azadirachtin indica A. Juss) OBTENIDA A NIVEL LABORATORIO POR LIXIVIACIÓN**, presentado por la estudiante universitaria **Margarita María López Gomar**, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:



Ing. Murphy Olimpo Paiz Recinos
Decano

Guatemala, 5 de julio de 2012.



/gdech

ACTO QUE DEDICO A:

Dios

El creador del cielo de la tierra, el todopoderoso, el santo, el constructor de mi vida, mi padre, mi señor, mi salvador, mi torre fuerte, mi amigo fiel, mi roca, mi refugio, mi sostén, mi apoyo, mi amado; porque sin Él nada sería.

AGRADECIMIENTOS A:

Dios

Por su infinito amor y misericordia.

Mis padres

Rolando López y Margarita Gomar, por todo su apoyo, su paciencia, sus esfuerzos, su dedicación, su cariño, su comprensión, su guía, sus consejos, pero sobre todo, por su amor.

Mis hermanos

Rolando, Pablo, Andrea y Paola López, por su apoyo en todo momento, por sus detalles y por su amor; ustedes son mis mejores amigos.

Mis amigos

María José Abreu, José Alejandro Castañeda, Julio Martínez, Doris Morales, Lucía Escoto, Boris Gil, Nora Escoto, Paola Vettorazzi, Melissa Rodríguez, Gaby Castañeda, Any de Castañeda, Romy Godínez, Elena Pineda, Gerald García, Javier Muralles, Luis Mayora, Adriana Valle, Luis Diego Meléndrez, Edwin Ramírez y Juan Diego Regalado; por su linda amistad, su apoyo, sus consejos y sus oraciones.

Mi familia

Abuelos, tías, tíos, primos y primas; por su apoyo y preocupación.

Los ingenieros

Adrián Soberanis, Paulo Vendrell, César García, y la Licda. Ingrid Benítez; por su apoyo, por su enseñanza y por el cariño.

**Universidad de
San Carlos de Guatemala**

Por ser mi casa de estudios y formarme como profesional.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VII
LISTA DE SÍMBOLOS	XI
GLOSARIO	XVII
RESUMEN.....	XXV
OBJETIVOS / HIPÓTESIS.....	XXVII
INTRODUCCIÓN	XXIX
1. ANTECEDENTES.....	1
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Árbol de Neem	5
2.1.1. Etimología	6
2.1.2. Taxonomía	7
2.1.3. Origen de la planta	8
2.1.4. Descripción botánica	9
2.1.4.1. Tronco y corteza	10
2.1.4.2. Hojas.....	11
2.1.4.3. Flores.....	12
2.1.4.4. Frutos.....	12
2.1.4.5. Semillas	14
2.1.5. Propagación y crecimiento	15
2.1.6. Requerimientos edafoclimáticos.....	18
2.1.6.1. Altitud.....	18
2.1.6.2. Suelo.....	19

	2.1.6.3.	Temperatura.....	19
	2.1.6.4.	Precipitación.....	20
	2.1.6.5.	Otros.....	20
	2.1.7.	Composición química.....	21
	2.1.8.	Usos o aplicaciones.....	23
2.2.	Lípidos.....		25
	2.2.1.	Ácidos grasos.....	25
	2.2.2.	Oleorresinas.....	28
	2.2.3.	Aceites esenciales.....	29
	2.2.3.1.	Terpenoides y su clasificación.....	30
	2.2.4.	Metabolitos secundarios presentes en el Neem.....	34
	2.2.4.1.	Limonoides.....	34
		2.2.4.1.1. Azadiractina.....	36
		2.2.4.1.2. Meliantriol.....	38
		2.2.4.1.3. Salannina.....	39
		2.2.4.1.4. Nimbina y Nimbidina.....	40
		2.2.4.1.5. Otros.....	41
2.3.	Tratamiento de la materia prima.....		41
	2.3.1.	Recolección.....	41
	2.3.2.	Secado.....	42
	2.3.3.	Almacenamiento.....	43
	2.3.4.	Molienda.....	44
	2.3.5.	Preparación de las semillas de Neem.....	45
2.4.	Solventes.....		46
	2.4.1.	Clasificación.....	46
	2.4.2.	Características.....	48
	2.4.3.	Función.....	49
	2.4.4.	Selección de solventes.....	51
2.5.	Proceso de extracción.....		52

2.5.1.	Variables del proceso extractivo.....	53
2.5.1.1.	Temperatura	54
2.5.1.2.	Tamaño de partícula.....	54
2.5.1.3.	Naturaleza del solvente	55
2.5.1.4.	Agitación	55
2.5.2.	Preparación del sólido.....	56
2.5.3.	Extracción sólido-líquido por lixiviación	57
2.5.3.1.	Velocidad de lixiviación.....	61
2.5.3.2.	Temperatura de lixiviación	62
2.5.3.3.	Extracción por lixiviación utilizando unidad Soxhlet	63
2.6.	Caracterización de la fracción lipídica.....	64
2.6.1.	Tamizaje fitoquímico.....	64
2.6.2.	Cromatografía	65
2.6.2.1.	Cromatografía en capa fina	67
2.6.2.2.	Cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-MS)	70
2.6.2.3.	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	71
2.6.3.	Índice de refracción	73
2.6.4.	Densidad	74
2.7.	Análisis proximal	75
2.7.1.	Proteína cruda.....	76
2.7.2.	Extracto etéreo (grasa bruta).....	77
2.7.3.	Fibra cruda	78
2.7.4.	Humedad.....	80
2.7.5.	Cenizas	81
2.8.	Estudio histológico	82

3.	DISEÑO METODOLÓGICO	87
3.1.	Variables.....	87
3.1.1.	Descripción de variables	88
3.2.	Delimitación de campo de estudio	91
3.2.1.	Localización	91
3.2.2.	Selección de muestra.....	91
3.2.3.	Diseño experimental	93
3.2.4.	Manejo experimental.....	94
3.2.4.1.	Método de extracción utilizado	95
3.3.	Recursos humanos disponibles	96
3.4.	Recursos físicos disponibles.....	97
3.5.	Recursos materiales disponibles	98
3.5.1.	Materia prima	98
3.5.2.	Reactivos	98
3.5.3.	Equipo.....	100
3.5.4.	Cristalería.....	100
3.6.	Técnica cuantitativa	101
3.7.	Recolección y ordenamiento de la información	101
3.8.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información	105
3.8.1.	Métodos para monitorear	105
3.8.1.1.	Densidad	105
3.8.1.2.	Sólidos solubles totales	106
3.8.2.	Métodos para determinar las propiedades físicas..	106
3.8.2.1.	Índice de refracción	107
3.8.2.2.	Densidad	107
3.8.3.	Método para determinar las propiedades químicas por cromatografía (CG-MS)	107

3.8.4.	Métodos para determinar las propiedades fitoquímicas	108
3.8.4.1.	Tamizaje fitoquímico	108
3.9.	Análisis estadístico	108
4.	RESULTADOS	111
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	115
6.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	125
	CONCLUSIONES	139
	RECOMENDACIONES	141
	BIBLIOGRAFÍA	143
	APÉNDICES	149
	ANEXOS	193

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Árbol de Neem.....	6
2.	Partes del árbol de Neem.....	9
3.	Rama del árbol de Neem.....	11
4.	Fruto verde del árbol de Neem.....	12
5.	Frutos de Neem.....	13
6.	Cotiledón de la semilla de Neem.....	14
7.	Semilla entera y su almendra.....	15
8.	Frutos maduros de Neem.....	16
9.	Unidad Isopreno.....	31
10.	Estructura molecular de un limonoide (limonina).....	35
11.	Estructura molecular de Azadiractina.....	37
12.	Estructura molecular del Meliantriol.....	38
13.	Estructura molecular de la Salannina.....	39
14.	Estructura molecular de la Nimbina y la Nimbidina.....	40
15.	Equipo de extracción Soxhlet.....	63
16.	Índice de refracción.....	74
17.	Esquema del proceso histológico.....	83
18.	Corte de una semilla de manzana (<i>Malus domestica</i>), teñida con safranina y azul alción.....	85
19.	Mapa de Zacapa, Guatemala con la ubicación exacta del lugar.....	90
20.	Diagrama del equipo de extracción Soxhlet.....	96
21.	Diagrama de flujo del proceso experimental.....	102

22.	Flujograma de la metodología para un proceso de extracción sólido-líquido	104
23.	Distribución de los resultados experimentales del porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica de la semilla de Neem en función del solvente utilizado en la extracción	115
24.	Comparación de la media del porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica de la semilla de Neem en función del solvente utilizado en la extracción	116
25.	Distribución de los resultados experimentales del índice de refracción de la fracción lipídica de la semilla de Neem en función del solvente utilizado en la extracción	117
26.	Comparación de la media del índice de refracción de la fracción lipídica de la semilla de Neem en función del solvente utilizado en la extracción	118
27.	Diagrama de los rendimientos obtenidos con el equipo Soxhlet utilizando hexano con una confianza de 95%	120
28.	Diagrama de rendimientos obtenidos con el equipo Soxhlet utilizando isopropanol con una confianza de 95%	120
29.	Diagrama de los rendimientos obtenidos con el equipo Soxhlet utilizando metanol con una confianza de 95%	121
30.	Diagrama de los índices de refracción de la fracción lipídica obtenida con hexano, con una confianza de 95%	122
31.	Diagrama de los índices de refracción de la fracción lipídica obtenida con isopropanol, con una confianza de 95%	122
32.	Diagrama de los índices de refracción de la fracción lipídica obtenida con metanol, con una confianza de 95%	123

TABLAS

I.	Tolerancia del Neem a factores climáticos y del suelo	18
II.	Ácidos grasos	27
III.	Clasificación de los solventes.....	47
IV.	Definición operacional de las variables para el proceso de extracción de la fracción lipídica de la semilla de Neem por lixiviación utilizando la técnica Soxhlet.....	87
V.	Especificaciones de las variables para el proceso de extracción por lixiviación utilizando la técnica Soxhlet.....	88
VI.	Especificaciones de las constantes para el proceso de extracción por lixiviación utilizando la técnica Soxhlet.....	89
VII.	Recursos físicos disponibles	97
VIII.	Datos requeridos para un experimento en una dirección, con k tratamientos y n repeticiones.....	109
IX.	Organización de datos para el análisis de varianza (ANOVA)	109
X.	Análisis proximal de la almendra de la semilla de Neem.....	111
XI.	Características dimensionales de la semilla de Neem	111
XII.	Porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica extraída de la semilla de Neem obtenida con hexano por la técnica de extracción Soxhlet	112
XIII.	Porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica extraída de la semilla de Neem obtenida con isopropanol por la técnica de extracción Soxhlet	112
XIV.	Porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica extraída de la semilla de Neem obtenida con metanol por la técnica de extracción Soxhlet	113
XV.	Perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica extraída de la semilla de Neem, utilizando cromatografía de gases <i>fid</i> (GC).....	113

XVI.	Metabolitos secundarios detectados en la fracción lipídica extraída de la semilla de Neem con diferente solvente utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS).....	114
XVII.	Presencia de metabolitos secundarios, tamizaje fitoquímico	114
XXVIII.	Análisis de varianza para el porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica de la semilla de Neem	116
XIX.	Comparación de la media HDS de Tuckey (porcentaje de rendimiento)	117
XX.	Análisis de varianza para el índice de refracción de la fracción lipídica de la semilla de Neem.....	118
XXI.	Comparación de la media HDS de Tuckey (índice de refracción) ..	119
XXII.	Límites de confianza al 95% de la variable dependiente: rendimiento.....	119
XXIII.	Límites de confianza al 95% de la variable dependiente: índice de refracción.....	121

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
pH	Acidez
Ac	Actinio
α	Alpha (porcentaje de confiabilidad)
Al	Aluminio
θ	Ángulo
S	Azufre
Br	Bachiller
β	Beta
C	Carbono
cm	Centímetro
cm³	Centímetro cúbico
K	Coeficiente de reparto

CM	Cuadrado medio
CME	Cuadrado medio del error
CMS	Cuadrado medio del solvente
ρ	Densidad en g/ml o g/cm ³
HDS	Diferencia honesta significativa
S_i	Efecto del solvente
Σ_{ij}	Error experimental
\exists	Existe
EE	Extracto etéreo
ELN	Extractos libres de nitrógeno
FV	Fuente de varianza
FC	Fibra Cruda
°	Grado
°C	Grado Celsius
gl	Grados de libertad

g	Gramo
H	Hidrógeno
Ha	Hipótesis alterna
Ho	Hipótesis nula
h	Hora
=	Igual
kg	Kilogramo
MTS	Materia total seca
>	Mayor
<	Menor
m	Metro
m³	Metro cúbico
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro

min	Minuto
'	Minutos
SH	Muestra de hexano
SI	Muestra de isopropanol
SM	Muestra de metanol
x	Multiplicación
µm	Nanómetro
N	Nitrógeno o Norte
≠	No es igual
O	Oxígeno
∇	Para todo
/	Por
%	Por ciento
µ	Promedio general de porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica extractable de la semilla de Neem

PC	Proteína cruda
F	Prueba de Fisher
:	Razón
v/v	Relación volumen-volumen
Y_{ij}	Rendimiento
n	Repetición
''	Segundos
Si	Silicio
Na	Sodio
SDT	Sólidos disueltos totales
SC	Suma de cuadrados
SCE	Suma de cuadrados del error
SCS	Suma de cuadrados del solvente
SCT	Suma de cuadrados total
Φ	Tamaño

T Temperatura

k Tratamiento estadístico

UV Ultravioleta

GLOSARIO

ANOVA	Análisis de varianza
Biomoléculas	Organizaciones moleculares que integran la materia viva. Los cuatro bioelementos más abundantes en los seres vivos son el carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, representando alrededor del 99% de la masa de la mayoría de las células.
CC	Cromatografía en columna
CG	Cromatografía de gases
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada espectrofotometría de masas.
Cofia	Cubierta membranosa con forma de dedal que envuelve algunas semillas. La cofia brinda una protección a la raíz, que sirve para cuando esta va abriéndose camino por la tierra. Se puede observar como un pequeño abultamiento en el extremo de la raíz.

Difusión

Es un proceso físico irreversible, en el que partículas materiales se introducen en un medio que inicialmente estaba ausente, aumentando la entropía del sistema conjunto formado por las partículas difundidas o soluto y el medio donde se difunden o disolvente. Normalmente los procesos de difusión están sujetos a la Ley de Fick. La membrana permeable puede permitir el paso de partículas y disolvente siempre a favor del gradiente de concentración.

La difusión, proceso que no requiere aporte energético, es frecuente como forma de intercambio celular.

EEUU

Estados Unidos

Emulsión

Es una mezcla de dos líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea. Un líquido (la fase dispersa) es dispersado en otro (la fase continua o fase dispersante).

Endocarpio

Capa interna de las tres que forman el pericarpio del fruto. Recubre la semilla.

Epicarpio	Es la parte del pericarpio que suele proteger al resto del fruto del exterior. El epicarpio forma la epidermis protectora del fruto que, a menudo, contiene glándulas con esencias y pigmentos. En muchas frutas se llama comúnmente piel. En el epicarpio se acumulan muchas vitaminas.
Extracto	Sustancia muy concentrada que se obtiene de otra por distintos procedimientos.
Fase	Se denomina fase a cada una de las partes macroscópicas de una composición química y propiedades físicas homogéneas que forman un sistema. Los sistemas monofásicos se denominan homogéneos y los que están formados por varias fases se denominan mezclas o sistemas heterogéneos.
Flores protándricas	Estas flores funcionan primero como flor masculina y luego como flor femenina, debido a que los órganos masculinos maduran antes.
Foliolo	Se llama pinna o foliolo a cada una de las piezas separadas en que a veces se encuentra dividido el limbo de una hoja. Cuando el limbo foliar está formado por un solo foliolo, es decir, no está dividido, se dice que la hoja es una hoja simple. Cuando el limbo foliar está dividido en foliolos se dice que la hoja es hoja compuesta.

Fruto drupáceo

Fruto carnoso, que no está preparado para abrirse espontáneamente de forma que puedan salir las semillas, generalmente monospermo, con mesocarpo carnoso y endocarpo lignificado. Fruto carnoso con hueso.

Hojas imparipinadas

Tipo de hojas compuestas con número de folíolos impar, por lo que no crecen en pares alrededor de la ramita o raquis de sostén. Pueden parcialmente crecer en pares, pero generalmente la última hoja es solitaria en la punta del raquis.

HPLC

Cromatografía líquida de alta eficiencia

Imbibición

Es el resultado del conjunto de absorción-adsorción. Se define como el desplazamiento de un fluido viscoso por otro fluido inmiscible con este. Entre los factores que afectan la imbibición están la temperatura, la viscosidad del líquido, la concentración de solutos, el espacio disponible, la energía cinética de las partículas al igual que la cohesión y adhesión de las moléculas del líquido.

Inflorescencia	Es la disposición de las flores sobre las ramas o la extremidad del tallo; su límite está determinado por una hoja normal. La inflorescencia puede presentar una sola flor, como en el caso de la magnolia y el tulipáno constar de dos o más flores como en el gladiolo y el trigo. En el primer caso se denominan inflorescencias unifloras y en el segundo se les llama plurifloras.
IPA	Alcohol Isopropílico
LIPRONAT	Laboratorio de investigaciones de productos naturales.
Lixiviación	También llamada extracción sólido-líquido. Es un proceso en el que un disolvente líquido pasa a través de un sólido pulverizado para que se produzca la elución de uno o más de los componentes solubles del sólido. El constituyente soluble puede ser sólido o líquido y estar incorporado, combinado químicamente o adsorbido o bien mantenido mecánicamente, en la estructura porosa del material insoluble.
Mesocarpio	Capa media de las tres que forman el pericarpio de los frutos. Normalmente es la parte carnosa. El mesocarpio contiene azúcares y grasas de reserva.

Metabolitos secundarios

Compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas. Los metabolitos secundarios de las plantas intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.

Mucílago

Es una sustancia vegetal viscosa, coagulable al alcohol. También es una solución acuosa espesa de una goma o dextrina utilizada para suspender sustancias insolubles y para aumentar la viscosidad.

Percolación

Consiste en hacer pasar el solvente a través de la materia prima, hasta su extracción exhaustiva completa. La percolación simple, comprende la extracción exhaustiva de la materia prima con el solvente siempre renovado.

En pequeña escala, la percolación se realiza en aparatos, denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo del solvente.

Pericarpio

Parte exterior del fruto de las plantas, que cubre las semillas. Este se divide en tres partes: el epicarpio o exocarpio, el mesocarpio y el endocarpio.

Principio activo	Sustancia a la cual se debe el efecto farmacológico de un medicamento y su uso se remonta a la prehistoria, en un principio eran hierbas y sustancias naturales, luego en los últimos siglos se fueron aislando los componentes de las plantas y en el siglo XX se logró identificar la estructura de muchos de ellos. La actividad de un principio activo varía debido a la naturaleza de este, pero siempre está relacionado a la cantidad ingerida o absorbida.
p-valor	Nivel de significación empírico del contraste
Termolábil	Sustancia que se descompone o se desnaturaliza por el calor, perdiendo, generalmente, su actividad.
Terpenos	<p>Son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno, un hidrocarburo de cinco átomos de carbono.</p> <p>Los terpenos se originan por polimerización enzimática de dos o más unidades de isopreno, ensambladas y modificadas de muchas maneras diferentes. La mayoría de los terpenos tienen estructuras multicíclicas, las cuales difieren entre sí, no sólo en grupo funcional sino también en su esqueleto básico de carbono.</p>

RESUMEN

El objetivo principal del presente estudio es la caracterización de la fracción lipídica de la semilla de Neem (*Azadirachta indica A. Juss*) obtenida a nivel laboratorio por lixiviación, tomando como parámetros de comparación el rendimiento, las propiedades fisicoquímicas y fitoquímicas de los extractos. Las semillas fueron recolectadas siguiendo un sistema aleatorio, en un bosque silvestre nacional de carácter privado. Los componentes principales de la almendra son: proteína cruda, fibra cruda y aceite, siendo este último confirmado por medio de un corte histológico.

Para la extracción de la fracción lipídica se utilizó el método de lixiviación mediante la técnica Soxhlet, variando el tipo de solvente, hexano al 99,80% v/v, isopropanol al 99,97% v/v y metanol al 99,90% v/v y teniendo muestras de semilla de Neem con un tamaño de partícula 841 – 1 190 micrones y una humedad menor al 10% w/w. A cada tratamiento se le realizaron 5 repeticiones para el análisis estadístico (con un 95% de confiabilidad), el cual determinó que no existe diferencia significativa en el rendimiento obtenido con isopropanol y hexano y el mayor rendimiento se obtuvo con metanol ($32,17 \pm 3,96$ %).

El tamizaje fitoquímico confirmó la presencia de sesquiterpenlactonas, flavonoides y antiocianinas, más no de triterpenoides, los cuales son referidos en la literatura. El aceite obtenido presenta abundantes ácidos grasos insaturados (62 a 67%) y aproximadamente el 80% son cadenas de 18 carbonos. Entre ellos el de mayor proporción es el ácido oleico (monoinsaturado).

OBJETIVOS

General

Caracterizar la fracción lipídica extractable de la semilla del árbol de Neem (*Azadirachtin indica A. Juss*), proveniente de un bosque silvestre ubicado en la aldea de Mayuelas, Gualán, Zacapa, Guatemala, obtenida a nivel laboratorio por lixiviación mediante la técnica Soxhlet con tres diferentes solventes.

Específicos

1. Realizar un análisis proximal de las semillas enteras del árbol de Neem (*Azadirachtin indica A. Juss*).
2. Realizar el estudio histológico de las porciones de la semilla del árbol de Neem (*Azadirachtin indica A. Juss*).
3. Evaluar y comparar el porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica extractable de la semilla del árbol de Neem (*Azadirachtin indica A. Juss*) obtenida por lixiviación mediante la técnica Soxhlet, a partir de tres diferentes solventes: metanol al 99,90% v/v, isopropanol al 99,97% v/v y hexano al 99,80% v/v.
4. Cuantificar los metabolitos secundarios contenidos en la fracción lipídica extractable de la semilla del árbol de Neem (*Azadirachtin indica A. Juss*) obtenida por lixiviación mediante la técnica Soxhlet.

5. Caracterizar fitoquímicamente los metabolitos secundarios de la fracción lipídica extractable de la semilla del árbol de Neem (*Azadirachtin indica* A. Juss) obtenida por lixiviación mediante la técnica Soxhlet, a partir de tres diferentes solventes.

HIPÓTESIS

Es posible realizar la extracción y caracterización de la fracción lipídica de la semilla de Neem utilizando la técnica Soxhlet con tres distintos solventes.

Hipótesis estadística

Ho: no existe diferencia significativa en el rendimiento y las propiedades fisicoquímicas (índice de refracción y densidad) de la fracción lipídica de la semilla de Neem obtenida con cada uno de los solventes de extracción.

$$\forall_i \mu_i = \mu$$

Hi: existe diferencia significativa en el rendimiento y las propiedades fisicoquímicas (índice de refracción y densidad) de la fracción lipídica de la semilla de Neem obtenida con cada uno de los solventes de extracción.

$$\exists_i \mu_i \neq \mu$$

INTRODUCCIÓN

El árbol del Neem es conocido con el nombre botánico de *Azadirachta Indica A. Juss*, es un árbol nativo de la India. Entre los muchos usos y beneficios que se pueden obtener del árbol del Neem, uno de los más importantes es su utilización en el control de plagas de los cultivos, aparte que durante años se han utilizado sus distintas partes como medicina natural y para la recuperación de los suelos.

Las propiedades insecticidas del árbol del Neem se han estudiado desde los años 20, pero estos trabajos fueron poco apreciados en su momento. Aunque son muchas las plantas que pueden ser usadas para el control de insectos, las investigaciones impulsadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos mostraron que el Neem es el que posee mayor potencialidad como insecticida.

Gran parte de la literatura relacionada con la obtención de los extractos de Neem consiste en patentes que se enfocan generalmente en la descripción de diversos procedimientos de extracción y en la comparación de la efectividad de diferentes solventes. Sin embargo, en Guatemala no hay una información concreta de las semillas del árbol Neem ni de los extractos que estas contienen, ya que este árbol no es explotado en la región. Ante estas circunstancias se ha respondido con procesos de investigación orientados a la búsqueda de nuevas fuentes potenciales de desarrollo para el país.

Por lo tanto, esta investigación pretende contribuir a esclarecer las propiedades y características fisicoquímicas y fitoquímicas de los extractos que se extraen de la semilla del árbol del Neem en Guatemala, para poder hacer uso de esta.

1. ANTECEDENTES

Debido a que el árbol de Neem es un árbol nativo de la India y recientemente se ha introducido en el país, se cuenta con poca investigación acerca de sus propiedades en suelo guatemalteco. Actualmente, se sabe que el árbol se reproduce en varios lugares del país, sin embargo, son árboles que están sembrados de manera silvestre o como árboles ornamentales y en su mayoría en pequeñas cantidades, no existen grandes plantaciones.

Dentro de los estudios con enfoque de graduación en la Universidad de San Carlos de Guatemala, no se han realizado estudios específicos sobre las semillas del árbol de Neem, pero, existe un estudio de tesis acerca de la formulación de un nematocida a partir de aceite de la semilla de Neem, titulado como “Evaluación experimental de formulación y diseño del proceso de fabricación de un nematocida orgánico, a partir de aceite Neem como materia prima” realizado por el estudiante Ovidio Alonzo Paau Can en el 2001 y asesorado por el Ing. Estuardo Monroy Benítez.

Estudios específicamente sobre la semilla del árbol de Neem se han llevado a cabo alrededor del mundo entre ellos:

- Extracción del aceite de la semilla de Neem (*Azadirachta indica*), realizado por Carlos Romero y Maritza Vargas, Departamento de Química Tecnológica, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo. Naguanagua. Venezuela, en 2005.

En este estudio se determinaron parámetros dimensionales y la composición química proximal de la semilla no germinable del árbol de Neem recolectada en una plantación venezolana, también se compararon diferentes técnicas convencionales de extracción del aceite, que serían extracción Soxhlet y extracción mecánica por prensado hidráulico; y se realizó la caracterización fisicoquímica y el perfil de ácidos grasos del aceite. Obteniendo como resultados que la semilla se adapta a un modelo elipsoidal con una relación largo-ancho de 2,06, la masa de la semilla es 0,21 g y el 62% de la masa corresponde a la almendra.

Los componentes principales de la almendra resultaron ser: aceite, fibra cruda y proteínas; mientras que en la cáscara fue la fibra cruda. Los macroelementos son superiores en la almendra y los microelementos en la cáscara. El mayor rendimiento de aceite se obtuvo con la técnica Soxhlet utilizando como solvente hexano; con la técnica de prensado, se obtuvo un rendimiento de aproximadamente 10% inferior. Las características químicas de los aceites resultaron semejantes a los aceites vegetales comunes, presentando abundantes ácidos grasos insaturados (51 a 59%) y aproximadamente el 70% son cadenas de 18 carbonos.

- Caracterización fisicoquímica de los extractos de la semilla del árbol de Neem (*Azadirachta Indica*) en el departamento del Cesar, realizado por los estudiantes Rhonal José Oñate López y Luis Alberto Quintero López de la Universidad Popular del César, Facultad de Ingenierías y Tecnológicas, Programa de Ingeniería Agroindustrial, Valledupar, Cesar, Colombia en el 2008.

En este estudio se presentan resultados sobre las características fisicoquímicas de los extractos presentes en la semilla del árbol de Neem; los cuales contienen una serie de componentes bases de insecticidas biodegradables. Tanto al aceite como al extracto etanólico, se le realizaron pruebas fisicoquímicas volumétricas, gravimétricas y cromatográficas que coincidieron con otros estudios.

Como resultados se encontró que la concentración de la cantidad de Azadiractina en el departamento del Cesar fue de 0,25%, intervalo de concentración mayor si se compara con datos reportados en regiones como Nigeria (0,15%) y Sudan (0,19%) y es inferior a Indonesia (0,47%), Nicaragua (0,47%), Togo (0,40%) e India (0,35%), lo cual según el investigador se debe a las características del suelo.

Existen muchísimos estudios tanto en el viejo continente como el nuevo. En América, los estudios se han enfocado más a la formulación de plaguicidas, nematocidas y otros, así también para el control de distintas plagas. Los estudios han sido realizados principalmente en Estados Unidos, México, Nicaragua, Haití, Colombia y Venezuela, entre otros; ya que en estos lugares existen muchas plantaciones específicamente para el Neem.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Árbol de Neem

El árbol de Neem (*Azadirachta indica*), es una especie vegetal de una importancia potencial relevante, en virtud de sus características muy distintas, las cuales se reconocen en el mundo científico de Occidente y su uso milenario en las culturas del viejo mundo, véase figura 1.

“Esta especie arbórea, ha despertado la atención del mundo científico biológico, por sus múltiples propiedades y usos; también se le conoce con los nombres comunes de cinamomo, acederaque y margoza o la planta milagrosa, o la botica del pueblo como lo llaman en la India, donde desde hace siglos los indios recurren a este árbol para aliviar el dolor, la fiebre y las infecciones”.¹

Por ese motivo, en los últimos años ha ido en aumento el interés de la ciencia por esta especie, ya que dos decenios de investigación revelan resultados prometedores en tantos campos, que esta especie pudiera aportar enormes beneficios a la humanidad.

¹ PURI, H.S. “Neem: the divine tree (*Azadirachta Indica*)”. En: Hardman, Roland (ed). *Medicinal and Aromatic Plants*. Amsterdam, Holanda: *Harwood Academic Publishers*, 1999. vol 5, p. 27. ISBN: 0203344006.

Figura 1. **Árbol de Neem**



Fuente: Mayuelas, Gualán departamento de Zacapa, Guatemala.

2.1.1. Etimología

El nombre popular actual Neem, también escrito como Nim, se deriva de la palabra sanscrita nimba, que significa por aspersion, que es el término corto de aspersor de néctar (ambrosia).

Los otros sinónimos en sánscrito para el árbol, refiere a su hábitat y el uso del mismo en la antigua India. “El significado de la denominación genérica *Azadirachta* no parece ser interpretado correctamente en la mayoría de la literatura. A menudo se dice que se deriva de las palabras persas *azad* que significa libre y *drakhat* que significa árbol, es decir, árbol libre y cuando el nombre específico, indica, se le añade, el significado del nombre botánico se convierte en el árbol de la India libre, que no transmite ningún significado específico del nombre”.²

² National Research Council. *Neem, a tree for solving global problems: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development National Research Council*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992. p. 23. ISBN 0-309-04686-6.

Las opiniones expresadas por el botánico escocés Sir George Watt, en su obra titulada: *a dictionary of the comercial products of India*, parecen ser más convincentes, estas expresan que los persas estaban bien instruidos sobre un árbol de la misma familia llamado *azedarach Melia*, también conocido comúnmente como la cereza de China, pero en persa como *Azadarakhat*.

A raíz de esto se discutió con un erudito persa en la Universidad de Panjab, India, que *aza* significa amargo en persa y *drakhat* significa árbol, así que el nombre de la baya de China en persa significaba árbol amargo. “Cuando el Neem fue introducido en Irán, para distinguirla de la baya China, que se asemejaba en gran medida al Neem, este fue llamado *Aza-drakhat Hindi*, es decir, el árbol amargo de la India, lo que condujo a la actual denominación botánica de *Azadirachta indica*”.³

2.1.2. Taxonomía

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Sapiendales
Familia:	Meliaceae
Género:	Azadirachta
Especie:	indica
Nombre Científico:	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss
Nombres Comunes:	Nim, Árbol del Neem, Margosa, Limba, Cinamomo, Mimba, Nimba, Kohomba y Lila India.

³ National Research Council. *Neem, a tree for solving global problems: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development National Research Council*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992. p. 24. ISBN 0-309-04686-6.

2.1.3. Origen de la planta

Según el botánico inglés James Sykes Gamble, en su obra *A manual for indian timbers*, el centro de origen del Neem radica en los bosques de Karnatka (sur de la India) o en los bosques secos del interior de Birmania (Myanmar). Otros investigadores sugieren que este árbol se originó en los bosques de las colinas de Shivalik (al pie de la Himalaya occidental) o en la costa Este del Sur de la India. La gran variedad en la forma de las hojas y otras características morfológicas apoyan la teoría de que el origen del Neem se ubica en las partes altas de Myanmar y que al cabo del tiempo esta especie se fue adaptando y naturalizando en los bosques del centro y el Oeste de la India.

A principios del siglo XX, fue introducido en África y actualmente está bien establecido cuando menos en 30 países de este continente, particularmente en la región Sur del Sahara en donde se ha convertido en un importante proveedor de madera. Asimismo, a lo largo del siglo ha sido establecido en Australia, Haití, República Dominicana, Islas Vírgenes, Puerto Rico, Fiji, Mauritania, Estados Unidos de América y otros países de Centro y Sur América.

2.1.4. Descripción botánica

“El Neem es un árbol que se caracteriza por ser de rápido crecimiento y de tamaño pequeño a mediano que puede alcanzar una altura total de 15 a 25 metros, alcanzando ocasionalmente hasta 30 m, con un diámetro de tronco que alcanza de 30 a 90 cm. Los tallos de las ramas de 2 a 5 metros forman una corona unida, densa, redonda y en forma ovalada. Tiene abundante follaje todas las temporadas del año, pero en condiciones severas se deshoja casi completamente. El ramaje es amplio y puede alcanzar de 15 a 20 m de diámetro ya desarrollado”.⁴

Figura 2. Partes del árbol de Neem



Fuente: SURI, Savitha. *Beaming health with Neem*. <www.boloji.com>.

[Consulta: mayo de 2010].

⁴ KOUL, O.; WAHAB, S. *Neem: today and in the new millennium* [en línea]. Estados Unidos de Norteamérica: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 5. <<http://es.scribd.com/doc/6442200/NeemToday-and-in-the-New-Millennium>>. [Consulta: mayo de 2010].

El Neem está caracterizado por un sistema de raíces constituida por una robusta raíz principal y raíces laterales muy desarrolladas y penetrantes, que pueden extenderse hasta 15 m, con una cofia relativamente corta. Este árbol normalmente empieza a dar fruto entre los 3 y 5 años de edad y se convierte totalmente reproductivo a los 10 años, produciendo hasta 50 kg de fruta anualmente. El Neem puede vivir por más de dos siglos.

2.1.4.1. Tronco y corteza

El color de la corteza varía según la parte de la planta, su edad y localidad. Las ramas más jóvenes tienen una corteza de color más claro que el de un tronco maduro, que puede ser entre gris y negro grisáceo. “La corteza del Neem es moderadamente gruesa y dura, con una textura áspera y exfoliada, posee débiles fisuras de color rojizo-castaño. Siempre está verde o muda, dependiendo del clima, los períodos de deshoje son normalmente breves, y ocurren durante las sequías prolongadas”.⁵

La superficie interna de la corteza es fibrosa y de color rojizo. Pequeños depósitos de goma pueden estar presentes en el tronco, en algunos lugares, pero de vez en cuando en algunos árboles, que son muy viejos y se encuentran en un clima húmedo, una savia fétida puede ser exudada del tronco.

⁵ KOUL, O.; WAHAB, S. *Neem: today and in the new millennium* [en línea]. Estados Unidos de Norteamérica: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 15. <<http://es.scribd.com/doc/6442200/NeemToday-and-in-the-New-Millennium>>. [Consulta: mayo de 2010].

2.1.4.2. Hojas

Las hojas son del tipo imparipinadas con foliolos de color verde claro e intenso en dependencia de las condiciones agroclimáticas (véase en la figura 3), aunque las hojas muy jóvenes o tiernas son normalmente de color rojo o purpura. Estas se encuentran en posiciones alternas y compuestas, de 10 a 38 cm. Y agrupadas al extremo de las ramas.

Cada tallo cuenta con una cantidad de hojas entre 20 y 31 unidades y normalmente la hoja terminal es a menudo faltante. La longitud de las hojas varía entre 3 y 8 cm. La forma de las hojas maduras es menos asimétrica que la de las más jóvenes y sus márgenes están dentados.

Figura 3. Rama del árbol de Neem



Fuente: Mayuelas, Gualán departamento de Zacapa, Guatemala.

2.1.4.3. Flores

Las flores del Neem son protándricas, bisexuales y masculinas, su coloración es blanca o crema; están dispuestas en racimos de hasta 25 cm de longitud. Las inflorescencias, que se ramifican en tercer grado tienen de 150 a 250 flores. Cada flor mide de 5 a 6 milímetros de longitud y de 8 a 11 milímetros de ancho. Estas tienen la característica de producir un aroma como el de la miel y es por eso que atraen muchas abejas. La miel de las flores de Neem es muy popular ya que no contiene rastro alguno de Azadirachtina.

2.1.4.4. Frutos

Los frutos son drupáceos, parecidos a una aceituna en forma que varía desde un ovalo elongado hasta uno ligeramente redondo y cuando madura su longitud oscila entre 1,4 y 2,8 cm y su diámetro o ancho entre 1,0 y 1,5 aproximadamente (véase figura 4). Estos empiezan a aparecer cuando el árbol alcanza una edad de 3 a 5 años y normalmente contienen sólo una semilla aunque existen casos en los que se ha visto más de una.

Figura 4. **Fruto verde del árbol de Neem**



Fuente: Mayuelas, Gualán departamento de Zacapa, Guatemala.

El color del pericarpio varia, es de color verde claro durante su desarrollo, tornándose progresivamente hasta amarillo y de textura rugosa en la madurez como lo muestra la figura 5. La fruta madura es pulposa y posee un epicarpio delgado, el mesocarpio es blanco amarillento, fibroso y sabe dulce, pero es desagradable al gusto. El endocarpio es blanco, duro y almacena una semilla elongada con una corteza de color castaño.

Figura 5. **Frutos de Neem**



Fuente: OLAMS. *Neem fruits*. <www.africanmarketsquare.ca>. [Consulta: febrero de 2012].

2.1.4.5. Semillas

La semilla que contiene el fruto es de forma alargada, con tamaño variable y de color blanco cuando está seca.

Cada semilla está compuesta de una coraza y una almendra, cada almendra pesa alrededor de la mitad de la semilla en su totalidad (véase figura 6). “La almendra es usada comúnmente para el control de plagas ya que esta posee la mayor cantidad de Azadirachtina producida por el árbol, la cual funciona como pesticida natural. Las hojas también contienen ingredientes pesticidas pero son menos efectivos que los que se encuentran en la semilla”.⁶

Figura 6. Cotiledón de la semilla de Neem



Fuente: Mayuelas, Gualán departamento de Zacapa, Guatemala.

⁶ OÑATE, R. J.; QUINTERO, L. A. *Caracterización fisicoquímica de los extractos de la semilla del árbol de Neem (Azadirachta Indica) en el Departamento del Cesar*. Trabajo de graduación de Ing. Agroindustrial. Facultad de Ingeniería y Tecnología, Universidad Popular del Cesar. Colombia, 2008. p. 35.

Figura 7. **Semilla entera y su almendra**



Fuente: *Plant extracts Neem*. <www.infonet-biovision.org>. [Consulta: febrero de 2012].

2.1.5. Propagación y crecimiento

“El árbol se propaga fácilmente, tanto sexual como vegetativamente. Puede ser plantado usando semillas, plántulas, árboles a raíz desnuda, tocones, renuevos, chupones de raíz, esquejes o cultivo de tejidos. Sin embargo, normalmente se cultiva a partir de semillas, ya sea directamente sembradas en el sitio o por el trasplante de plántulas previamente cultivadas en viveros. Aunque en su ambiente natural, el árbol de Neem se propaga ampliamente bajo las condiciones favorables del lugar, ya que las semillas son distribuidas por las aves, murciélagos y monos”.⁷

⁷ National Research Council. *Neem, a tree for solving global problems: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development National Research Council*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992. p. 31. ISBN 0-309-04686-6.

Las semillas de Neem tienen fama de no ser viables por mucho tiempo, normalmente por medio de un proceso natural, los frutos cuando están maduros (como en la figura 8) caen al suelo y germinan si las condiciones en las que se encuentran son adecuadas, siendo su capacidad de germinación muy alta durante las primeras cuatro semanas, descendiendo luego, rápidamente.

Figura 8. **Frutos maduros de Neem**



Fuente: Mayuelas, Gualán departamento de Zacapa, Guatemala.

Si las semillas son preparadas, se considera que después de 2 – 6 meses de almacenamiento estas ya no germinan. Sin embargo, algunas observaciones de unas semillas de Neem que habían sido almacenadas en Francia, indicaron que las semillas sin endocarpo tienen una aceptable capacidad germinativa (42%) después de más de cinco años.

“El Neem es un árbol que generalmente crece rápidamente aunque su crecimiento en la primera etapa se ve afectado por la cantidad de sol que recibe y naturalmente se da mejor en áreas donde no recibe la luz solar en forma directa; la humedad es otro factor que afecta la primera etapa de crecimiento de estas plantas por lo que el sitio debe ser seco”.⁸ Por lo tanto, la regeneración natural bajo árboles viejos es a menudo abundante.

La raíz principal, al menos en los ejemplares jóvenes, puede llegar a ser hasta dos veces la altura del árbol. Las malas hierbas raras veces afectan el crecimiento. “El Neem puede dominar sobre casi todos los competidores que se encuentren en su entorno, salvo en el caso de plantas muy jóvenes. De hecho, los árboles en sí se pueden llegar a convertir en malas hierbas”.⁹

El desarrollo más o menos óptimo de este árbol se ve condicionado por los siguientes factores:

- Humedad relativa
- Tipo de suelo (acidez o basicidad)
- Edad del árbol (para descubrir a qué edad, el contenido de *Azadiractina* es mayor).

⁸ National Research Council. *Neem, a tree for solving global problems: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development National Research Council*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992. p. 33. ISBN 0-309-04686-6.

⁹ RAMOS, C., et al. “Variación en contenido de azadiractina en frutos de margosa durante su desarrollo”[en línea]. *Artículo Científico: Revista Fitotecnia Mexicana*, Septiembre 2004. vol. 27, núm. especial 1, p. 83. <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=61009917>>. [Consulta: mayo de 2010].

Tabla I. **Tolerancia del Neem a factores climáticos y del suelo**

Límites	Intervalo	Límites inferiores	Óptimo	Límites superiores
Lluvia (mm)	< 300	500 - 800	1800	2000 – 2500
Temperatura (°C)	4	10 - 20	27	40 - 49
Arcilla (%)	< 25	25 - 45	> 45	> 70
Arena (%)	< 50	50 - 75	> 75	> 85
Marco (m)	< 1,8 x 1,8	3 x 3 - 4 x 5	> 7 x 7	

Fuente: OÑATE, Rhonal. *Caracterización fisicoquímica de los extractos de la semilla del árbol de Neem en el departamento del Cesar*. p. 29.

2.1.6. Requerimientos edafoclimáticos

El Neem se adapta a un extenso rango de climas y condiciones de suelos, es por ello que se dice que este árbol crece casi en cualquier lugar, en las regiones tropicales, tropicales húmedas, subtropicales y áridas.

2.1.6.1. Altitud

Es una especie de luz que se encuentra en elevaciones entre el nivel del mar y los 700 metros, sin embargo, puede crecer en altitudes de hasta 1500 m, cerca del ecuador.

2.1.6.2. Suelo

“El Neem es un árbol que prefiere los suelos profundos, livianos, permeables y arenosos, por lo menos sin horizontes endurecidos, pero puede plantarse en una amplia variedad de tipos de suelo, incluyendo sitios difíciles donde la mayoría de otras especies no se desarrollan bien. Puede prosperar en suelos rocosos, secos, arcillosos, calcáreos, vértigos, alófilos, poco profundos (20 – 50 cm) e infértiles, pero no se recomienda para ciénagas barrosas o fangosas, suelos barrosos, salinos o donde la subsuperficie sea dura o se hallen capas de laterita. Tampoco debe sembrarse donde los suelos se vuelvan empapados o temporalmente inundados, ya que muere rápidamente si el sitio se encharca”.¹⁰

2.1.6.3. Temperatura

La temperatura a la cual el Neem está adecuado, normalmente oscila entre una temperatura media anual de 9,5 a 37 °C; la cual se podría decir que es una temperatura moderada.

Sin embargo, prospera en condiciones muy calientes, donde la temperatura máxima puede elevarse sobre los 50 °C, pero no soporta la congelación o extensas heladas.

¹⁰ STONEY, Carol. *Azadirachta indica - Neem, a versatile tree for the tropics and subtropics: a quick guide to multipurpose trees from around the world* [en línea]. Hoja Informativa FACT 1997-05. Morrilton, Arkansas: *Forest, Farm, and Community Tree Network, Winrock International*. Septiembre, 1997. <www.winrock.org/forestry/factnet.htm>. [Consulta: mayo de 2010].

2.1.6.4. Precipitación

“Requiere precipitaciones anuales tan pocas como de 150 mm en áreas en donde el sistema de raíz pueda acceder al agua subterránea dentro de los 9 a 12 metros de la superficie; sin embargo, se desarrolla mejor en zonas que reciben de 450 a 1200 mm de lluvia al año, con un requerimiento óptimo de 800 mm/año”.¹¹

Este árbol maravilloso también es altamente tolerante de la sequía y una vez establecido, puede sobrevivir a estaciones secas de 7 a 8 meses.

2.1.6.5. Otros

“El árbol crece en suelos donde el rango de pH varía entre 5,2 y 7,0 con un óptimo de 6,8, sin embargo, crece bien en algunos suelos ácidos tolerando un pH de 5,0 como mínimo y suelos alcalinos de hasta un pH de 8,0 como máximo. De hecho, se dice que las hojas de Neem que caen al suelo, que son ligeramente alcalinas (pH 8,2), son buenos para la neutralización de la acidez en el suelo”.¹²

El Neem también se adapta muy bien en donde la salinidad del suelo es menor a 4 dS/m y en un ambiente donde exista un fotoperíodo menor a 12 horas.

¹¹ National Research Council. *Neem, a tree for solving global problems: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development National Research Council*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992. p. 37. ISBN 0-309-04686-6.

¹² *Ibíd.* p. 38.

2.1.7. Composición química

“El Neem se protege de una gran cantidad de plagas con una gran cantidad de ingredientes plaguicidas. Estos miles de compuestos químicos de especial interés son terpenoides o más específicamente limonoides, estos compuestos están primordialmente formados por C, H y O; la presencia del oxígeno hace estos compuestos más solubles en agua, metanol o etanol que en hexano, gasolina u otros solventes similares. Actualmente se conoce de la existencia de unos 100 terpenoides. El más activo es la azadiractina, de la que existen varios tipos que varían desde la azadiractina A, a la azadiractina K”.¹³

Los primeros trabajos sobre la química del Neem se hicieron en la India en los años 20, con el aislamiento de un ácido en el aceite de Neem al que se llamó ácido margósico. Desde los primeros estudios de aislamiento del Dr. Anees Ahmed Siddiqui en la Universidad Integral de la India en 1942, más de 100 componentes terpenoides, la mayoría de los tetranotriterpenoides, diterpenoides, triterpenoides, pentanotriterpenoides, hexanotriterpenoides y algunos compuestos no terpenoides, han sido aislados de varias partes del árbol.

Los principales compuestos que están contenidos en el árbol de Neem son los siguientes:¹⁴

¹³ PURI, H.S. “Neem: the divine tree (*Azadirachta Indica*)”. En: Hardman, Roland (ed). *Medicinal and Aromatic Plants*. Amsterdam, Holanda: *Harwood Academic Publishers*, 1999. vol 5, p. 27. ISBN: 0203344006.

¹⁴ *Ibíd.*p. 82.

Componentes Terpenoides:

- Protolimonoides
- Limonoides
- Pentatriterpenoides
- Hexatriterpenoides

Componentes no Terpenoides:

- Hidrocarburos
- Ácidos grasos
- Esteroides
- Fenoles
- Flavonoides y otros compuestos

Existen muchos más compuestos activos en el árbol del Neem:

- Hojas: de las hojas se pueden aislar varias moléculas como un flavonoide polifenólico llamado quercetina, un β -sitosterol, el nimbosterol, nimbina y otros limonoides, como la nimocinolida e isonimocinolida. También se han aislado un grupo de alcanos de entre 14 y 31 carbonos, aminoácidos y ácidos grasos.
- Flores: de las flores se extrae un aceite que contiene sesquiterpenos, nimbosterol y numerosos flavonoides entre los que destacan la melicitrina y el kaempferol. Las flores producen una cera compuesta por una mezcla compleja de ácidos grasos (araquídico, esteárico, palmítico, oleico y linoléico).

- Corteza: la corteza y madera del árbol del Neem son también fuente de numerosos principios activos: nimbina, nimbidina, nimbinina, nimbosterol, margosina, nimbineno y algunos diterpenos como la nimbinona, nimbocilina, nimbidiol y nimbiona.

- Semillas: sin duda el elemento más interesante en la bioquímica del Neem son las semillas, por su riqueza en lípidos y la presencia de moléculas con una intensa actividad biológica. “El hueso de la drupa contiene una o dos semillas y de ellas se obtiene un aceite compuesto de ácido oleico (50 – 60%), palmítico (13 – 15%), esteárico (14 – 19%), linoléico (8 – 16%) y araquídico (1 – 3%), composiciones que varían según el método de extracción, así como varios metabolitos secundarios de gran actividad”.¹⁵

2.1.8. Usos o aplicaciones

“El Neem, es un árbol de uso múltiple. La madera es utilizada para leña tanto en India como en África; por ejemplo, en Ghana, en plantaciones con espaciamiento de 2,4 x 2,4 m, en el primer corte de madera realizado a los 8 años se produjo de 108 – 137 m³ de leña por hectárea”.¹⁶ Por sus características, la madera es excelente para construcción de casas habitación y para la elaboración de muebles, por no ser atacados por termitas.

¹⁵ National Research Council. *Neem, a tree for solving global problems: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development National Research Council*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992. p. 21. ISBN 0-309-04686-6.

¹⁶ *Ibíd.* p. 39.

El aceite de la semilla (hasta 40%), es usado como combustible para lámparas y como lubricante para maquinaria; también como ingrediente útil en jabones y desinfectantes, así como en productos farmacéuticos y de cosmetología.

La pasta derivada de la extracción del aceite de la semilla se ha reportado como un excelente fertilizante varias veces más rico en nutrientes para las plantas que el estiércol. Sus hojas y ramas son utilizadas ampliamente como *mulch* y fertilizante en Sri Lanka, India y Burma.

Para el control de plagas, las diferentes partes del árbol de Neem se presentan como una promesa en el control de plagas de granos almacenados y de cultivos en los países en vías de desarrollo y también para los agricultores de recursos limitados.

“Posee constituyentes biológicamente activos que controlan más de 100 especies de insectos, además de ácaros y nematodos, incluyendo plagas de importancia económica, dentro de ellas están: Orthóptera, Homóptera, Thysanóptera, Coleóptera, Lepidóptera, Díptera, Himenóptera y Heteróptera. En estos insectos se reconocen los siguientes efectos: interrumpen o inhiben el desarrollo de huevos, larvas y pupas; bloquean la muda de larvas a ninfas; repele larvas y adultos; repelen a las hembras para ovipositar; esteriliza a los adultos; envenena a las larvas y adultos; disuade a los insectos a alimentarse; confunde a los insectos para realizar la metamorfosis; e inhibe la formación de quitina”.¹⁷

¹⁷ ANGULO, Miguel A., et al. “Contenido de azadiractina A en semillas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) colectadas en Sinaloa, México” [en línea]. *Artículo Científico: Revista Fitotecnia Mexicana*, Octubre-Diciembre 2004. vol. 27, núm. 004, p. 309. <<http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/27-4/2a.pdf>>. [Consulta: mayo de 2010].

2.2. Lípidos

Los lípidos constituyen un grupo de biomoléculas estructuralmente muy heterogéneo, pero con características comunes de solubilidad; es decir, son poco o nada solubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos. La mayor parte de los lípidos constituyen los aceites y grasas, que suelen ser productos de reserva y protección en el ser vivo, aunque no se debe olvidar que algunos lípidos complejos forman parte de las membranas biológicas y de este modo participan activamente en muchos aspectos de la fisiología celular.

“La mencionada heterogeneidad estructural de los lípidos dificulta cualquier clasificación sistemática. Aunque rara vez se hallan en estado libre, los llamados ácidos grasos, ácidos carboxílicos de cadena larga, forman parte de la inmensa mayoría de los lípidos. Por lo tanto, se clasifican normalmente en lípidos relacionados con ácidos grasos y lípidos no relacionados con ácidos grasos. En este último grupo se encuentran los terpenoides contenidos en el Neem”.¹⁸

2.2.1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son biomoléculas orgánicas de naturaleza lipídica formados por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de número par de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. Cada átomo de carbono se une al siguiente y al precedente por medio de un enlace covalente sencillo o doble. Estos se hallan normalmente formando parte de otros lípidos, casi siempre por medio de enlaces éster y rara vez amida.

¹⁸ MACARULLA, J. M; GOÑI, F. M. *Biomoléculas: lecciones de bioquímica estructural*. España: Reverté, 1978. p. 57. ISBN: 9788429191844.

“Según la naturaleza de la cadena carbonada, los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados, lineales, ramificados o alicíclicos y pueden contener como sustituyentes grupos hidroxilo u oxo”.¹⁹

Los más abundantes son, con gran diferencia, los ácidos grasos lineales con número par de átomos de carbono, generalmente superior a 12 e inferior a 24. Una nomenclatura abreviada, muy útil para designar ácidos grasos, es la que emplea una C mayúscula seguida de números, separados por dos puntos, que indican respectivamente el número de carbonos y el de dobles enlaces. La posición de los dobles enlaces se indica como superíndices del segundo número.

¹⁹ MACARULLA, J. M; GOÑI, F. M. *Biomoléculas: lecciones de bioquímica estructural*. España: Reverté, 1978. p. 59. ISBN: 9788429191844.

Tabla II. **Ácidos grasos**

Nombre del ácido	Estructura	Clasificación	Observaciones
Láurico	C 12:0	saturado	
Mirístico	C 14:0		
Palmítico	C 16:0		Muy abundante
Margárico	C 17:0	peculiar	Muy escaso
Esteárico	C 18:0	saturado	Muy abundante
Araquídico	C 20:0		
Lignocérico	C 24:0		En cerámidos
Palmitoleico	C 16:1 ⁹	monoinsaturado	Típicos de aceites vegetales
Oleico	C 18:1 ⁹		
Elaídico	C 18:1 ⁹ (<i>trans</i>)	peculiar	
Linoléico	C 18:2 ^{9, 12}	polinsaturado	Esenciales en la alimentación humana
Linolénico	C 18:3 ^{9, 12, 15}		
Araquidónico	C 20:4 ^{5, 8, 11, 14}		
Nervónico	C 24:1 ¹⁵		En cerámidos
Cerebrónico	(2R) hidroxilignocérico		
Hidroxinervónico	(2R) hidroxinervónico		
Tuberculoesteárico	(10R) metilesteárico		En bacilo tuberculoso
Chaulmógrico	13-(2'-ciclopentenil)-tridecanoico		Leprostático

Fuente: MACARULLA, José; GOÑI, Félix. *Biomoléculas: lecciones de bioquímica estructural*. p. 57.

2.2.2. Oleorresinas

Son extractos de especias, que se obtienen por tratamiento de la materia prima seca con solventes. Los solventes empleados son eliminados casi completamente por procesos de destilación al vacío, destilación azeotrópica o ambas. Tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas. Tienen uso en las industrias de alimentos y de medicamentos, sustituyendo las plantas secas o las tinturas. Las oleorresinas contienen aceites esenciales, aceites fijos, colorante y principios activos de las plantas.

Las oleorresinas son líquidos naturales extraídos de especias o extractos herbales que contienen compuestos volátiles y no volátiles los cuales caracterizan el sabor, color y aroma de materias primas naturales. “Las oleorresinas son exudados compuestos principalmente por constituyentes volátiles y resinosos. Los bálsamos son oleorresinas caracterizadas por su alto contenido en compuestos benzoicos o cinámicos. Las oleorresinas son extractos de naturaleza oleosa, obtenidos de especias o diferentes plantas que proporcionan a los productos color, sabor, según las necesidades del cliente. Las oleorresinas son muy viscosas y coloreadas”.²⁰

Las oleorresinas generalmente están formadas por ésteres, alcoholes, aldehídos, ácidos, fenoles, cetonas, éteres, lactosas, terpenos e hidrocarburos.

²⁰ SOBERANIS, Adrián Antonio. *Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la oleorresina de cardamomo (elletteria cardamomum, l. Matton) obtenida a nivel laboratorio utilizando dos métodos de lixiviación a tres diferentes temperaturas*. Trabajo de graduación de Ing. Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009. p. 32.

2.2.3. Aceites esenciales

Se les da el nombre de aceites esenciales a los aceites volátiles o aceites etéreos, mezclas complejas de sustancias, de variadas funciones químicas.

En general los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta y ámbar gris). “Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales”.²¹ Se oxidan por exposición al aire.

Las plantas elaboran los aceites esenciales con el fin de protegerse de las enfermedades, ahuyentar insectos depredadores o atraer insectos benéficos que contribuyen a la polinización.

El aceite esencial dentro de la planta se encuentra confinado en un tejido al cual se le denomina micela, que son células esféricas o diferentes cavidades o canales en el parénquima y cuando dan el olor a las flores, se encuentran en las glándulas odoríferas, desde donde son liberados.²²

²¹ SOBERANIS, Adrián Antonio. *Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la oleoresina de cardamomo (elletteria cardamomum, I. Matton) obtenida a nivel laboratorio utilizando dos métodos de lixiviación a tres diferentes temperaturas*. Trabajo de graduación de Ing. Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009. p. 37.

²² MACARULLA, J.M; GOÑI, F.M., *Biomoléculas: lecciones de bioquímica estructural*. España: Reverté, 1978. p. 70. ISBN: 9788429191844.

Se obtienen a partir de diferentes plantas mediante destilación, prensado o extracción por agentes. Usados diferentemente para fabricar fragancias, también tienen aplicación como sustancia beneficiosa en la aromaterapia y son muy apreciados para perfumar ambientes o como productos de baño.

Están formados principalmente por terpenoides volátiles, formados por unidades de isopreno unidas en estructuras de 10 carbonos (monoterpenoides) y 15 carbonos (sesquiterpenoides). Las sustancias responsables del olor suelen poseer en su estructura química grupos funcionales característicos: aldehídos, cetonas, ésteres, etcétera. Cada aceite lo integran por lo menos 100 compuestos químicos diferentes, clasificados como aldehídos, fenoles, óxidos, ésteres, cetonas, alcoholes y terpenos. También puede haber muchos compuestos aún por identificar.

En su mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los de ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados.

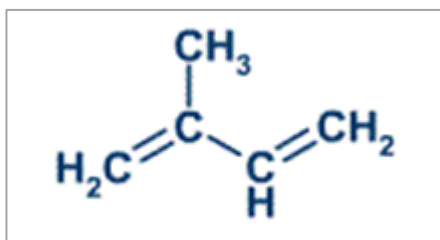
2.2.3.1. Terpenoides y su clasificación

Los terpenoides dentro de los lípidos se clasifican como lípidos isoprenoides; algunas veces referidos como isoprenoides, son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos similares a los terpenos. “Los terpenoides pueden verse formados por unidades de 5-carbono isopreno (pero el precursor es el isopentenildifosfato), ensambladas y modificadas de muchas maneras diferentes, siempre basadas en el esqueleto del isopentano”.²³

²³ CROTEAU, R., et al. “*Natural products (secondary metabolites)*”. En: Buchanan B.; Grissem W.; Jones R. (ed). American Society of Plant Physiologists. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Rockville, Maryland: John Wiley & Sons, 2000. p. 1396. ISBN: 0943088399.

La mayoría de los terpenoides tiene estructuras multicíclicas, las cuales difieren entre sí no sólo en grupo funcional sino también en su esqueleto básico de carbono. Los monómeros generalmente son referidos como unidades de isopreno (véase figura 9) porque la descomposición por calor de muchos terpenoides da por resultado ese producto; y porque en condiciones químicas adecuadas, se puede inducir al isopreno a polimerizarse en múltiplos de 5 carbonos, generando numerosos esqueletos de terpenoides. Por eso se relaciona a los terpenoides con el isopreno, si bien se sabe ya desde hace más de 100 años que el isopreno no es el precursor biológico de esta familia de metabolitos.

Figura 9. **Unidad Isopreno**



Fuente: CORTES, Ruth. *Bioquímica 109*.

<bioquimicaabc109.blogspot.com/2010_04_01_archive.html>. [Consulta: mayo de 2010].

Los terpenoides de las plantas son extensamente usados por sus cualidades aromáticas. Juegan un rol importante en la medicina tradicional y en los remedios herbolarios y se están investigando sus posibles efectos antibacterianos y otros usos farmacéuticos. La biosíntesis de los terpenoides en las plantas es a través de la vía del ácido mevalónico.

La clasificación de los terpenoides según su estructura química, es similar a la de los terpenos, los cuales son clasificados con base al número de unidades isopreno presentes y en el caso de los triterpenoides, si están ciclados. Se les clasifica en:

- Hemiterpenoides: los terpenoides más pequeños, con una sola unidad de isopreno. Poseen 5 carbonos. El hemiterpenoide más conocido es el isopreno mismo, un producto volátil que se desprende de los tejidos fotosintéticamente activos.
- Monoterpenoides: terpenoides de 10 carbonos. Llamados así porque los primeros terpenoides aislados del aguarrás alrededor de 1850, fueron considerados la unidad base, a partir de la cual se hizo el resto de la nomenclatura. Los monoterpenoides son mejor conocidos como componentes de las esencias volátiles de las flores y como parte de los aceites esenciales de hierbas y especias, en los que ellos forman parte de hasta el 5 % en peso de la planta seca.
- Sesquiterpenoides: terpenoides de 15 carbonos (es decir, terpenoides de un monoterpenoide y medio). Como los monoterpenoides, muchos sesquiterpenoides están presentes en los aceites esenciales. Además muchos sesquiterpenoides actúan como fitoalexinas, compuestos antibióticos producidos por las plantas en respuesta a la aparición de microbios y como inhibidores de la alimentación (*antifeedant*) de los herbívoros oportunistas.

- Diterpenoides: terpenoides de 20 carbonos. Entre ellos se incluye el fitol, que es el lado hidrofóbico de la clorofila, las hormonas giberelinas, los ácidos de las resinas de las coníferas y las especies de legumbres, las fitoalexinas y una serie de metabolitos farmacológicamente importantes, incluyendo el taxol, un agente anticáncer encontrado en muy bajas concentraciones (0,01% de peso seco) en la madera del tejo (*yew*), y forskolina, un compuesto usado para tratar el glaucoma. Algunas giberelinas tienen 19 átomos de carbono por lo que no son consideradas diterpenoides porque perdieron un átomo de carbono durante una reacción de *cleavage*.

- Triterpenoides: terpenoides de 30 carbonos. Son por lo general generados por la unión cabeza-cabeza de dos cadenas de 15 carbonos, cada una de ellas formada por unidades de isopreno unidas cabeza-cola. Esta gran clase de moléculas incluye a los brassino esteroides, componentes de la membrana que son fitoesteroles, algunas fitoalexinas, varias toxinas y *feeding deterrents* y componentes de las ceras de la superficie de las plantas, como el ácido oleanólico de las uvas.

- Tetraterpenoides: terpenoides de 40 carbonos (8 unidades de isopreno). Los tetraterpenos más prevalentes son los pigmentos carotenoides accesorios que cumplen funciones esenciales en la fotosíntesis.

- Politerpenoides: los politerpenoides, que contienen más de 8 unidades de isopreno, incluyen a los *prenylated quinone electron carriers* como la plastoquinona y la ubiquinona, también poliprenoles de cadena larga relacionados con las reacciones de transferencia de azúcares (por ejemplo el dolicol), y también a enormemente largos polímeros como el *rubber*, usualmente encontrado en el látex.

- Meroterpenoides: así se llama a los metabolitos secundarios de las plantas que tienen orígenes solo parcialmente derivados de terpenoides. Por ejemplo, tanto las citoquininas como numerosos fenilpropanoides contienen cadenas laterales de un isoprenoide de 5 carbonos. Algunos alcaloides, como las drogas anticáncer vincristina y vinblastina, contienen fragmentos terpenoides en sus estructuras. Además algunas proteínas modificadas incluyen una cadena lateral de 15 o 20 carbonos que es un terpenoide, que es el que ancla la proteína a la membrana.
- Esteroides: triterpenos basados en el sistema de anillos ciclopentano perhidrofenantreno. No son considerados terpenoides.

2.2.4. Metabolitos secundarios presentes en el Neem

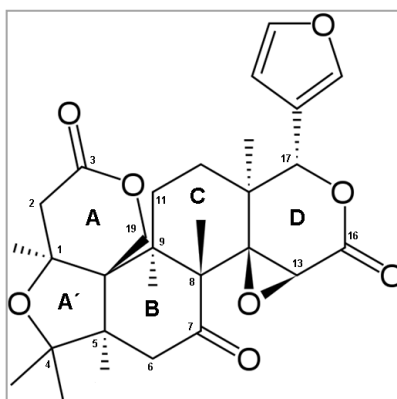
El Neem produce más de 300 metabolitos secundarios, un tercio de los cuales son limonoides (tetranotriterpenoides) de interés comercial y científico por sus efectos biológicos.

2.2.4.1. Limonoides

Los limonoides son producidos por especies de las familias Meliaceae, Rutaceae y Simaroubaceae. Son compuestos homogéneos estereo químicamente con una estructura típica derivada de un esqueleto 4,4,8-trimetil-17-furanilesteroides como precursor (véase su estructura molecular en figura 10). Los limonoides cítricos por ejemplo, contienen un anillo furano unido al anillo D en C-17 y grupos funcionales que contiene oxígeno en C-3, C-4, C-7, C-16 y C-17.

Las variaciones estructurales de los limonoides de Mealiaceae son mayores que las de Rutaceae y se presentan modificación en todos los anillos. Muchos limonoides de Meliaceae son estructuras complejas con un alto grado de oxidación y sufren arreglos múltiples.

Figura 10. Estructura molecular de un limonoide (limonina)



Fuente: National Research Council. *Neem: a tree for solving global problems*. p. 32.

“Los limonoides están bajo investigación por una amplia variedad de efectos terapéuticos tales como antivirales, antifúngicos, antibacterianos, antineoplásicos y antimaláricos. Ciertos limonoides son insecticidas tales como la azadiractina del árbol de Neem. Los frutos de cítricos contienen los limonoides, limonina, nomilina y ácido nomilínico, mientras que semillas y hojas del árbol de Neem contienen el limonoide azadiractina, aunque las concentraciones más altas están en las semillas”.²⁴

²⁴ PURI, H.S. “Neem: the divine tree (*Azadirachta Indica*)”. En: Hardman, Roland (ed). *Medicinal and Aromatic Plants*. Amsterdam, Holanda: *Harwood Academic Publishers*, 1999. vol 5, p. 81. ISBN: 0203344006.

“Hasta el momento, al menos nueve limonoides del Neem han demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de insectos, afectando una serie de especies que incluye algunas de las plagas más mortíferas de la agricultura y la salud humana. Nuevos limonoides todavía se están descubriendo en el Neem, pero la azadiractina, salannina, meliantriol, nimbina y nimbidina son los más conocidos y, al menos por ahora, parecen ser los más significativos”.²⁵

2.2.4.1.1. Azadiractina

La azadiractina, C₃₅H₄₄O₁₆ (véase figura 11) se considera el principal limonoide responsable de la actividad insecticida del Neem. Además, es el limonoide más abundante, biodegradable, ambientalmente seguro y únicamente es producido por esta especie.

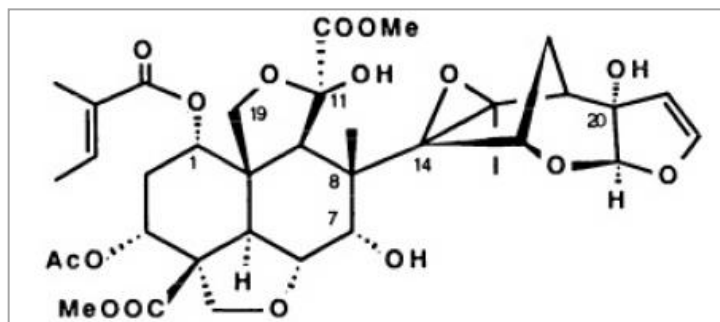
La mayoría de la investigación sobre el Neem se ha enfocado intensamente en la azadiractina y se han identificado 9 isómeros de esta molécula, siendo la azadiractina A y la azadiractina B los más abundantes. La concentración de azadiractina A en las semilla es de 0,56 – 3,03 g/kg y azadiractina B de 0,04 – 0,59 g/kg.

La azadiractina es efectiva contra cerca de 200 especies de insectos, no afecta los mamíferos o los animales que consumen estos insectos, ni tampoco a los insectos útiles para la polinización o que son benéficos para la planta.

²⁵ PURI, H.S. “Neem: the divine tree (*Azadirachta Indica*)”. En: Hardman, Roland (ed). *Medicinal and Aromatic Plants*. Amsterdam, Holanda: *Harwood Academic Publishers*, 1999. vol 5, p. 82. ISBN: 0203344006.

“Cuando un insecto ingiere azadiractina no muere inmediatamente; la molécula afecta su patrón de alimentación (efecto antialimentario), el desarrollo de su cuerpo (metamorfosis) y su ciclo reproductivo, actuando como una toxina. Así, se sabe que la azadiractina interfiere con las glándulas corpora cardiaca y corpora alta, inhibiendo la producción de la neuro hormona protoracicotropica, la cual a su vez regula de la biosíntesis de las hormonas de la metamorfosis (ecdisona) y la hormona juvenil”.²⁶

Figura 11. Estructura molecular de Azadiractina



Fuente: National Research Council. *Neem: a tree for solving global problems*. p. 34.

Estas hormonas son esenciales para los insectos, pues determinan la muda y la maduración de huevos; sin ellas, las larvas pueden durar hasta 3 semanas sin empuparse pero los adultos salen con alas deformadas y otras deficiencias. Los estados adultos que ingieren demasiada azadiractina demuestran una fecundidad reducida.

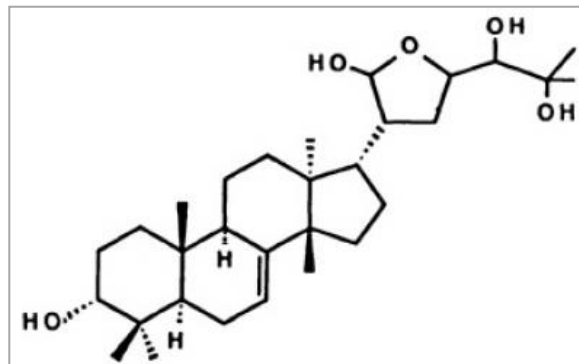
²⁶ National Research Council. *Neem, a tree for solving global problems: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development National Research Council*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992. p. 35. ISBN 0-309-04686-6.

“La azadiractina es la materia más eficaz de las contenidas en el Neem, capaz de garantizar el control de las plagas y de ser la alternativa a productos sintéticos, ya que el control añadido de los insectos útiles, que no son afectados, posibilita el reducir el número de aplicaciones tal como se ha comprobado en ensayos de diversos cultivos en diferentes países”.²⁷

2.2.4.1.2. Meliantriol

Su estructura es también muy complicada al igual que la de la azadiractina (véase figura 12). “El meliantriol es otro inhibidor de la alimentación, en concentraciones extremadamente bajas es capaz de provocar que los insectos cesen de comer. La demostración de su capacidad para prevenir el mascado de las langostas en los cultivos, fue la primera prueba científica para el uso tradicional del Neem para el control de insectos en los cultivos de la India”.²⁸

Figura 12. Estructura molecular del Meliantriol



Fuente: National Research Council. *Neem: a tree for solving global problems*. p. 35.

²⁷ National Research Council. *Neem, a tree for solving global problems: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development National Research Council*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992. p. 35. ISBN 0-309-04686-6.

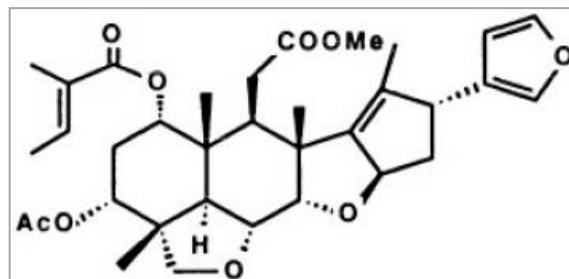
²⁸ *Ibíd.* p. 36.

2.2.4.1.3. Salannina

Fue la tercera materia activa aislada del Neem (véase su estructura en figura 13). Estudios indican que este compuesto inhibe también, poderosamente la alimentación, pero no influye en los distintos cambios hasta que los insectos no llegan a ser adultos.

“Se probó su poder en laboratorio contra varios tipos de plagas, como la langosta migratoria, la trepadora roja de California, el escarabajo rayado del pepino, el escarabajo japonés y la mosca doméstica; en todos los casos se demostró su alto poder inhibidor de la alimentación”.²⁹

Figura 13. Estructura molecular de la Salannina



Fuente: National Research Council. *Neem: a tree for solving global problems*. p. 34.

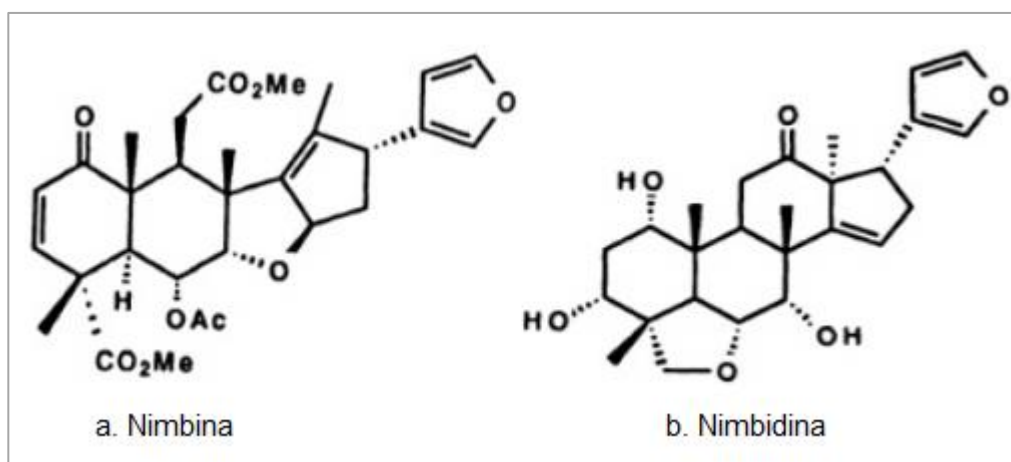
²⁹ OÑATE, R. J.; QUINTERO, L. A. *Caracterización fisicoquímica de los extractos de la semilla del árbol de Neem (Azadirachta Indica) en el Departamento del Cesar*. Trabajo de graduación de Ing. Agroindustrial. Facultad de Ingeniería y Tecnología, Universidad Popular del Cesar. Colombia, 2008. p. 41.

2.2.4.1.4. Nimbina y Nimbidina

Estos compuestos han demostrado su actividad sobre el Virus X de la patata, *Vaccinia virus* y sobre el virus de las enfermedades venéreas de las aves.

La Nimbidina es el componente primario de principios amargos (véase su estructura en figura 14), que se produce cuando las semillas de Neem son sometidas a un proceso de extracción con alcohol. Esto ocurre en cantidades bastante grandes; sobre el 2% del núcleo.

Figura 14. Estructura molecular de la Nimbina y la Nimbidina



Fuente: National Research Council. *Neem: a tree for solving global problems*. p. 35.

2.2.4.1.5. Otros

Ciertos compuestos de menor importancia también trabajan como antihormonas. La extensa investigación ha demostrado que algunos de estos productos químicos del Neem, pueden incluso paralizar el mecanismo de tragar, y así evitar que los insectos se alimenten. “Uno de estos componentes recién descubiertos en el Neem como limonoide es el deacetilazadiractinol que funciona como antihormona y paraliza el sistema digestivo de ciertos insectos como el gusano de la yema del tabaco. La 3-deacetilsalanina y el salanol están relacionados químicamente con la salannina y también son antialimentarios”.³⁰

2.3. Tratamiento de la materia prima

Toda materia prima tiene que ser tratada antes de ser procesada para poder hacer un uso óptimo de esta. En los procesos extractivos normalmente se requiere de ciertas condiciones para poder realizar un máximo trabajo extractivo.

2.3.1. Recolección

Para cada planta existe un momento adecuado para realizar su recolección. La determinación de los principios activos permite establecer con exactitud el tiempo correcto de la recolección. Sin embargo, para las plantas cuyos principios activos todavía no se conocen, pueden aplicarse algunas reglas generales.

³⁰ OÑATE, R. J.; QUINTERO, L. A. *Caracterización fisicoquímica de los extractos de la semilla del árbol de Neem (Azadirachta Indica) en el Departamento del Cesar*. Trabajo de graduación de Ing. Agroindustrial. Facultad de Ingeniería y Tecnología, Universidad Popular del Cesar. Colombia, 2008. p. 41.

Por ejemplo, las frutas se recolectarán antes de alcanzar su estado maduro. Las semillas son recolectadas después de estar maduras; si estas provienen de frutos carnosos deben estar limpias de los restos de la pulpa que las envuelve y deben estar secas.

Los períodos de sequía y de lluvia influyen en el contenido de los principios activos. Por ejemplo, el contenido de los alcanoides disminuye después de las lluvias y el de los aceites esenciales aumenta. “El contenido de los aceites esenciales disminuye después de la época seca. El contenido de los principios activos varía según el período del día. En general, los glicósidos alcanzan su mayor concentración en la tarde, mientras los aceites esenciales alcanzan su máxima concentración alrededor del mediodía, habiendo excepciones”.³¹

2.3.2. Secado

“Luego de la recolección viene un tratamiento especial de la semilla, teniendo como objetivo la conservación de las características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas. Un tratamiento inadecuado de la semilla da como resultado una materia prima de baja calidad, con pérdida de principios activos, así como un aumento de la carga microbiana”.³²

Por lo tanto, el secado es una etapa muy importante para la materia prima ya que facilita su conservación por períodos de tiempo prolongados sin verse afectadas sus propiedades. El contenido de humedad en las plantas frescas varía de 60% a 80%. El proceso de secado reduce este contenido a 5 – 12%.

³¹ SHARAPIN, Nikolai. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 2000.p. 28. ISBN: 958-698-001-4.

³² *Ibíd.* p. 29.

“El secado interrumpe los procesos de degradación causadas por enzimas o fermentos, impide el desarrollo de microorganismos y las reacciones de oxidación y de hidrólisis, sin embargo, como este proceso involucra calor, pueden presentarse pérdidas de aceites esenciales y de sustancias volátiles, así como el riesgo de degradación de las sustancias termolábiles. La mayoría de las plantas medicinales pueden ser secadas a temperaturas que varían entre 30 °C y 60 °C; dejando siempre una buena circulación de aire para facilitar el proceso de secado”.³³

El proceso de secado puede ser realizado al sol o a la sombra, extendiendo la planta en capas finas, en una superficie limpia. Sin embargo, este proceso no permite un control de la temperatura y debe interrumpirse cuando comienza a anochecer, recogiendo las plantas y guardándolas en un local cubierto, para impedir la absorción de la humedad durante la noche. Los mejores resultados se obtienen utilizando secadores solares o secadores que operan con aire caliente.

2.3.3. Almacenamiento

Por grandes que hayan sido los cuidados durante la recolección y el proceso de secado, las plantas pierden principios activos por degradación durante el almacenamiento. La conservación de la materia prima vegetal por períodos prolongados de tiempo depende de las condiciones de almacenamiento.

³³ SOBERANIS, Adrián Antonio. *Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la oleoresina de cardamomo (elletteria cardamomum, l. Matton) obtenida a nivel laboratorio utilizando dos métodos de lixiviación a tres diferentes temperaturas*. Trabajo de graduación de Ing. Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009. p. 71.

Las condiciones apropiadas impiden que el producto tenga contacto con el sol, el polvo, los roedores y los insectos y otros factores de degradación impidiendo la pérdida de los principios volátiles. El material puede ser guardado en sacos de fique o en fardos prensados. El uso de sacos plásticos debe evitarse porque estos no permiten una ventilación apropiada.

2.3.4. Molienda

La molienda tiene como objetivo la disminución del tamaño de las partículas de la materia prima vegetal para adecuarla a la etapa siguiente del proceso de extracción. La extracción de una materia prima entera o dividida en fragmentos gruesos sería incompleta, debido a la pobre penetración del solvente en el tejido vegetal y sería igualmente muy lenta, una vez que las membranas celulares actúan como verdaderas barreras que dificultan el proceso de extracción.

En el caso de la materia prima previamente dividida, tales membranas se encuentran parcialmente destruidas, lo que facilita la disolución de los constituyentes celulares en el líquido externo. Sin embargo, la división excesiva, con formación de polvos muy finos, puede causar problemas en el transcurso de la extracción.

Para aumentar la superficie de contacto y obtener la forma más apta de extracción, la operación preliminar a la misma es generalmente la trituración. La trituración expone más glándulas de aceite esencial crudo y reduce el grueso del material; esto permite una extracción más rápida, mayor rendimiento y mejor calidad del aceite esencial crudo, al mismo tiempo que menor consumo de solvente.

El grado de trituración para cada planta se debe aprender por experiencia. Es claro que el material desmenuzado debe ser extraído lo más pronto posible para reducir al mínimo la pérdida de aceite esencial crudo por evaporación.

Se debe emplear el seccionamiento que consiste en la división de los sólidos por medio de cortadoras y luego empleando una banda de cuchillas. También se puede emplear el proceso de percusión cuyo efecto de rompimiento se realiza por golpes bruscos de martillos. “La mayor parte del aceite esencial crudo fácilmente extraíble proviene de las células que se rompen durante los procesos de trituración, cocción, presión y laminado, el cual es obtenido por disolución; la fracción más difícil de extraer proviene de las células enteras o parcialmente rotas y es el obtenido por difusión”.³⁴

2.3.5. Preparación de las semillas de Neem

Las semillas son bastante fáciles de preparar. El fruto cae de los árboles por sí misma, la pulpa, puede ser removida fácilmente cuando está mojada por el roce contra una superficie tosca y después limpiada, por medio de un lavado con agua, obteniendo así semillas blancas. Las semillas de Neem tienen fama de no ser viables por mucho tiempo.

³⁴ SOBERANIS, Adrián Antonio. *Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la oleoresina de cardamomo (elletteria cardamomum, l. Matton) obtenida a nivel laboratorio utilizando dos métodos de lixiviación a tres diferentes temperaturas*. Trabajo de graduación de Ing. Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009. p. 73.

“En general se considera que después de 2 – 6 meses de almacenamiento estas ya no germinan. Sin embargo, algunas observaciones recientes de unas semillas de Neem que habían sido almacenadas en Francia, indicaron que las semillas sin endocarpo tienen una aceptable capacidad germinativa (42%) después de más de 5 años”.³⁵

2.4. Solventes

Los solventes en general son compuestos químicos de distinto origen y naturaleza, caracterizados por determinadas propiedades físicas y químicas que los hacen aptos para su uso como tales.

“Los solventes orgánicos comprenden el conjunto de compuestos orgánicos líquidos que tienen la capacidad de disolver, suspender o extraer otra sustancia, sin reaccionar químicamente con la misma, manteniéndose inertes. Constituyen un amplio grupo de sustancias de diversa polaridad, permitiendo la disolución de sustancias orgánicas con polaridades similares”.³⁶

2.4.1. Clasificación

Los solventes poseen varias características, pero la polaridad es una de las más importantes, debido a que esta propiedad dicta la capacidad para solvatar y estabilizar cargas, por lo tanto, es el punto de partida para clasificarlos.

³⁵ STONEY, Carol; HUGHES, Erin. *Use of Neem as a biological pest control agent: a quick guide to multipurpose trees from around the world* [en línea]. Hoja Informativa FACT 1998-01. Morrilton, Arkansas: Forest, Farm, and Community Tree Network, Winrock International, Enero 1998. <www.winrock.org/forestry/factnet.htm>. [Consulta: mayo de 2010].

³⁶ SHARAPIN, Nikolai. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 2000.p. 25. ISBN: 958-698-001-4.

Los solventes pueden catalogarse de dos maneras: polares y no polares. Además, pueden subdividirse en solventes polares próticos, polares apróticos, solventes apolares no oxigenados y apolares oxigenados.

“Un solvente polar prótico es aquel que posee un grupo funcional (OH, NH, SH) capaz de ceder protones o liberar un hidrógeno por ionización y tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno, por ejemplo, el agua, amidas, ácidos carboxílicos, alcoholes. Caso contrario es el del solvente aprótico debido a que carece de grupos funcionales capaces de ceder protones, pero estos se caracterizan por tener una constante dieléctrica alta, ejemplos: nitrilos, cetonas, nitrocompuestos”.³⁷

Tabla III. **Clasificación de los solventes**

	División	Subdivisión	Solvente	Cte. Dieléctrica (25 °C)	Punto de Ebullición
SOLVENTES	Polar	Prótico	Agua	78,30	100,0 °C
			Metanol	33,60	65,0 °C
			Isopropanol (IPA)	18,30	82,0 °C
			Etanol	24,30	79,0 °C
		Aprótico	Acetona	20,70	56,0 °C
	Apolar	Hidrocarburo Oxigenado	Éter Etilico	4,34	34,6 °C
Hidrocarburo no Oxigenado		Hexano	1,89	69,0 °C	

Fuente: SHARAPIN, Nikolai. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. p. 36.

³⁷ SHARAPIN, Nikolai. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 2000.p. 38. ISBN: 958-698-001-4.

Los solventes apolares, en general, tampoco poseen grupos funcionales que cedan protones y se caracterizan por tener constantes dieléctricas bajas. Un solvente apolar oxigenado, es aquel que contiene oxígeno en su estructura, pero este no ayuda a la polaridad de la molécula, por ejemplo, el éter metílico. Queda claro que los solventes apolares no oxigenados son únicamente los formados por hidrocarburos, como hexano y heptano.

2.4.2. Características

Los solventes orgánicos comúnmente poseen las siguientes características:

- Son compuestos líquidos y de peso molecular ligero.
- Comúnmente tienen unos puntos de ebullición relativamente bajos.
- Poseen gran volatilidad, por lo que presentan una alta presión de vapor, pudiendo pasar fácilmente a la atmósfera en forma de vapor durante su manejo y por ello, susceptibles de ser inhalados fácilmente.
- Pueden ser recuperados por destilación luego de su uso.
- La mayoría de los solventes tienen menor densidad que el agua, excepto algunos halogenados como el cloruro de metileno o cloroformo que son más densos que el agua.
- En general son mezclas de varios compuestos químicos mayoritarios acompañados de trazos de otros.

- Su composición puede variar con el tiempo, dada su volatilidad y elevada presión de vapor y por el hecho de que se contaminan con el uso.
- Uso muy amplio y diverso.
- En general, producen importantes efectos tóxicos.
- Son sustancias combustibles cuyos vapores mezclados con el aire pueden dar lugar a mezclas inflamables y con riesgo de explosión.
- Comúnmente se utilizan como agentes de limpieza, vehículos para la aplicación de otras sustancias o como agentes extractores.

2.4.3. Función

Los solventes tienen un gran papel. Las moléculas del soluto no existen en solución como partículas desnudas; están solvatadas. Hay muchas moléculas de disolventes unidas por enlaces a cada partícula disuelta y es la formación de dichos enlaces la que proporciona la energía necesaria para que se rompan las fuerzas de atracción que mantienen unidas a las partículas del soluto. Dichas fuerzas de atracción o enlaces son las siguientes:

- Enlaces ión-ión: muestra la atracción entre las cargas opuestas de un catión y un anión.
- Enlaces dipolo-dipolo: atracción entre el extremo positivo de una molécula polar y el negativo de otra, también polar.

- Fuerzas de Van der Waals: es la atracción entre los extremos con cargas opuestas de dipolos momentáneos e inducidos en moléculas vecinas. Estas fuerzas actúan entre todas las moléculas, incluidas las no polares.
- Enlaces ión-dipolo: atracción de un ión positivo por el extremo negativo de las moléculas de un disolvente polar y de un ión negativo por el extremo positivo.

“Las características de la solubilidad de los solutos no iónicos dependen principalmente de su polaridad y en particular de su capacidad para formar puentes de hidrógeno. La simple premisa que la estructura molecular determina el comportamiento químico y la que menciona que una sustancia disuelve a otra semejante, dan idea del porqué sustancias que son polares, son insolubles en disolventes orgánicos”.³⁸

En realidad un buen solvente debe presentar el llamado poder de solvatación: o la capacidad de formar enlaces. Dicho poder no depende simplemente de un elevado momento dipolar, sino que también tiene que ver con la naturaleza de los enlaces químicos formados.

³⁸ SANTIZO RODAS, Ivo Mahelly. *Identificación de familias de metabolitos secundarios en Myrica cerifera L.* Trabajo de graduación de Lic. Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2003. p. 21.

2.4.4. Selección de solventes

Por medio de la utilización de un solvente como agente extractor se consiguen arrastres extractores de sustancias mezcladas con otras no solubles. Tras su arrastre, la destilación permite, por evaporación del disolvente extractor, recuperar o separar las sustancias así extraídas por disolución.

Dependiendo de la finalidad deseada, el solvente utilizado extrae, selectivamente o no, cierta clase de compuestos. “Entre los solventes más utilizados en la extracción, son los alcoholes alifáticos de hasta 3 carbonos o mezclas de estos con el agua. Estos solventes logran extraer la gran mayoría de sustancias naturales de interés como los alcaloides, los flavonoides, los glicósidos cardiotónicos y los terpenos. Debido a su poder extractivo, estos solventes son los indicados para los casos en que los constituyentes activos de las plantas no son bien conocidos, siendo necesario agotar completamente la droga.”³⁹

El alcohol etílico y sus mezclas con agua es el solvente por excelencia para la obtención de extractos y tinturas. “Cuando no existen estudios específicos, se recomienda utilizar una mezcla de alcohol:agua 7:3 o 8:2 para la extracción de las partes leñosas de la planta, raíces y semillas, mientras la proporción de 1:1 es recomendada para extraer las hojas o las partes aéreas verdes, ya que en esta concentración se evita la extracción de la clorofila y de sustancias polimerizadas o resinoides que, generalmente, no presentan actividad terapéutica, pero complican las etapas siguientes de purificación, por el hecho de presentar precipitados viscosos”.⁴⁰

³⁹ SHARAPIN, Nikolai. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 2000.p. 104. ISBN: 958-698-001-4.

⁴⁰ *Ibíd.* p. 105.

2.5. Proceso de extracción

“En química, la extracción es un procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes no miscibles entre sí, con distinto grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interfase. La relación de las concentraciones de dicha sustancia en cada uno de los disolventes, a una temperatura determinada, es constante. Esta constante se denomina coeficiente de reparto y puede expresarse como”:⁴¹

$$K = \frac{[sustancia]_1}{[sustancia]_2} \quad [\text{Ec. 1}]$$

Donde $[sustancia]_1$ es la concentración de la sustancia que se pretende extraer, en el primer disolvente y, análogamente $[sustancia]_2$ la concentración de la misma sustancia en el otro disolvente.

Con relativa frecuencia aparecen en el proceso de extracción emulsiones o interfases que impiden una correcta separación en el embudo de decantación de las capas de disolventes, casi siempre acuosa y orgánica. Este problema se da, especialmente, cuando se trata de extracciones con cloruro de metileno. Para solventar este problema es conveniente añadir unos mililitros de salmuera y agitar de nuevo. En la mayor parte de los casos se produce la separación de las fases sin problemas. El proceso tiene repercusión industrial y se emplea en extracción de aceites, grasas y pigmentos.

⁴¹ SOBERANIS, Adrián Antonio. *Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la oleorresina de cardamomo (elletteria cardamomum, l. Matton) obtenida a nivel laboratorio utilizando dos métodos de lixiviación a tres diferentes temperaturas*. Trabajo de graduación de Ing. Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009. p. 81.

Durante el proceso de extracción ocurren dos fenómenos paralelos:

- La lixiviación de las sustancias solubles de células rotas.
- La disolución y difusión de las sustancias solubles de células intactas.

Mientras la lixiviación de las sustancias de las células rotas es rápida, la difusión de las sustancias a través de la membrana de células intactas es lenta y requiere etapas de humedecimiento y ablandamiento para aumentar la permeabilidad de la membrana. Este proceso comprende tres etapas: la penetración del solvente en la célula, la disolución de las sustancias extraíbles y la difusión de la solución fuera de la célula vegetal.

2.5.1. Variables del proceso extractivo

Como en el estudio de otras muchas operaciones, hay que considerar aquí el equilibrio que se tiende a alcanzar durante la operación y la velocidad con que se alcanza, en función de los diversos factores que pueden afectar a uno y a otra. El conocimiento que se posee de la interface líquido-sólido es escaso y por ello el mecanismo primario del cambio de fase de un soluto presente inicialmente en forma sólida, de la cual depende como es lógico, la cinética del proceso, permanece oscuro, haciendo difícil el desarrollo de una teoría general para esta operación.

Los factores que influyen en el equilibrio son: la naturaleza del soluto, la naturaleza del disolvente, la presión y la temperatura. En cambio, en la cinética del proceso, influyen además de los anteriores, la forma en que están divididos los sólidos, la presencia de restos de organización celular cuando se trata de tejidos animales o vegetales y las características propias del aparato y sistema de extracción que se emplee.

2.5.1.1. Temperatura

La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de la temperatura; esta contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Sin embargo, muchos principios activos son termolábiles y pueden ser destruidos, total o parcialmente, a temperaturas elevadas. El aumento de la temperatura también puede causar la pérdida de sustancias volátiles, como por ejemplo, los componentes de aceites esenciales.

2.5.1.2. Tamaño de partícula

Teóricamente, la eficiencia del proceso extractivo sería mayor cuanto menor sea el tamaño de las partículas, ya que así se obtiene una mayor área de contacto con el solvente. En la práctica, la presencia de partículas muy finas dificulta los procesos de percolación, pues se presenta compactación y formación de falsas vías.

Por otro lado, la penetración del solvente en fragmentos mayores de la droga es lenta y la salida de las sustancias extraíbles es difícil. Por esta razón, se recomienda la utilización de polvos moderadamente gruesos para la gran mayoría de las drogas.

2.5.1.3. Naturaleza del solvente

La naturaleza del solvente en una extracción es muy importante ya que dependiendo del propósito al que se destine, se puede obtener un extracto cuya composición química contiene la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta, o un extracto que contiene solamente constituyentes químicos con una determinada característica. En el primer caso, normalmente se usa un solvente de naturaleza general, de alta polaridad, como el alcohol etílico o el metanol. En el segundo caso se emplea un solvente selectivo, de menor polaridad, como el hexano que sólo extrae de la planta las grasas vegetales y otros componentes apolares.

La escogencia del solvente de extracción, así como la permanencia en la composición química de la materia vegetal, representan dos aspectos de suma importancia en cualquier proceso de fabricación, bien sea de productos fitoterapéuticos o de sustancias naturales aisladas.

2.5.1.4. Agitación

La eficiencia del proceso extractivo es función del equilibrio de saturación del solvente. La agitación hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en las sustancias extraíbles, entren en contacto con el sólido y un nuevo punto de equilibrio de saturación sea alcanzado. El movimiento del líquido, con ayuda de bombas para la recirculación del solvente o agitadores mecánicos, desplaza el equilibrio en el sentido de la saturación del solvente, aumentando la eficiencia del proceso.

2.5.2. Preparación del sólido

El éxito de una lixiviación y la técnica que se va a utilizar dependen con mucha frecuencia de cualquier tratamiento anterior que se le pueda dar al sólido.

“En algunos casos, las pequeñas partículas del material soluble están completamente rodeadas de una matriz de materia insoluble. Entonces, el disolvente se debe difundir en la masa y la solución resultante se debe difundir hacia el exterior antes de poder lograr una separación”.⁴² Esto es lo que sucede con muchos materiales metalúrgicos. La trituración y molienda de estos sólidos acelerará bastante la acción de lixiviación, porque las porciones solubles son entonces más accesibles al disolvente.

“Los cuerpos vegetales y animales tienen una estructura celular, los productos naturales que se van a lixiviar a partir de estos materiales se encuentran generalmente dentro de las células. Si las paredes celulares permanecen intactas después de la exposición a un disolvente adecuado, entonces en la acción de lixiviación interviene la ósmosis del soluto a través de las paredes celulares. Este puede ser un proceso lento. Sin embargo, moler el material lo suficientemente pequeño como para liberar el contenido de las células es poco práctico y algunas veces indeseable”.⁴³

⁴² SHARAPIN, Nikolai. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 2000.p. 102. ISBN: 958-698-001-4.

⁴³ *Ibíd.* p. 103.

En el caso de muchos productos farmacéuticos, recuperados a partir de raíces, tallos y hojas vegetales, el material vegetal con frecuencia se seca antes del tratamiento; esto favorece la ruptura de las paredes celulares y la liberación del soluto mediante la acción directa del disolvente. Las semillas vegetales y los cereales, tal como la soya, se aplanan o se hacen hojuelas para obtener partículas de 0,15 a 0,5 mm. Por supuesto, las células tienen un tamaño menor, pero se rompen bastante debido al proceso de formación de hojuelas; entonces, los aceites se ponen más fácilmente en contacto con el disolvente.

Cuando el soluto se adsorbe sobre la superficie de las partículas sólidas o se disuelve simplemente en una solución adherente, no es necesaria la trituración o molienda y las partículas pueden lavarse directamente.

2.5.3. Extracción sólido-líquido por lixiviación

Lixiviación es la eliminación de una fracción soluble, en forma de solución, a partir de una fase sólida permeable e insoluble a la cual está asociada. La separación implica, normalmente, la disolución selectiva, con difusión o sin ella, pero en el caso extremo del lavado simple, consiste sólo en el desplazamiento (con alguna mezcla) de un líquido intersticial por otro, con el que es miscible.

Otra definición dice que es un proceso por el cual se extrae uno o varios solutos de un sólido, mediante la utilización de un disolvente líquido. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos pueden difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los componentes originales del sólido.

El constituyente soluble puede ser sólido o líquido y estar incorporado, combinado químicamente o adsorbido, o bien mantenido mecánicamente, en la estructura porosa del material insoluble. El sólido insoluble puede ser másico y poroso; con mayor frecuencia es de partículas y estas últimas pueden ser poros abiertos, de celdas, con paredes celulares selectivamente permeables o con superficies activadas.

Esta operación unitaria, que implica una transferencia de masa, es de las más antiguas en la industria química, ha recibido muchos nombres, según la técnica más o menos compleja utilizada para llevarla a cabo. Entre los que se encuentran en la ingeniería química están la extracción, la extracción de sólido-líquido, la percolación, la infusión, el lavado, la elución y la decantación por sedimentación.

“La corriente de sólidos lixiviados y el líquido que la acompaña se denominan lodos. El contenido en sólidos de las corrientes es denominado, en algunas ocasiones, como marca (en particular en los procesos de separación de aceites). La corriente de líquido contenido en la solución lixiviada es el clarificado. Como abandonada el proceso de lixiviación, tiene otros nombres opcionales: extracto, solución, lixiviado o miscelado”.⁴⁴

⁴⁴ PERRY, Robert H. *Manual del Ingeniero Químico*. 7a ed. España: McGraw-Hill, 2001. cap. 18-1. ISBN: 84-481-3008-1.

El mecanismo de la lixiviación puede incluir una solución física simple o la disolución facilitada por una reacción química. “La velocidad de transporte de disolvente en la masa que se va a lixiviar o de la fracción soluble en el disolvente o de la solución de extracto del material insoluble, o alguna combinación de esas velocidades, pueden ser importantes. Es posible que exista una resistencia externa. Como el que una reacción química puede afectar a la velocidad de la lixiviación” .⁴⁵

“Ya que las corrientes de lodo y clarificado no son fases inmiscibles, sino corrientes basadas en el mismo disolvente, el concepto de equilibrio en lixiviación no es el mismo que el que se aplica en otras separaciones de transferencia de materia. Si el soluto no se adsorbe en el sólido inerte sólo se logra el equilibrio verdadero cuando todo el soluto se disuelve y se distribuye de forma uniforme en todo el disolvente, tanto en la corriente de lodos como la de clarificación (o cuando el disolvente se satura uniformemente con el soluto, situación que nunca se presenta en un equipo de extracción diseñado de forma adecuada). La interpretación práctica del equilibrio de lixiviación es el estado en que las corrientes de lodos y clarificado tienen la misma composición” .⁴⁶

Sea cual sea el mecanismo y el método de operación, resulta evidente que el proceso de la lixiviación estará favorecido por el aumento de la superficie por unidad de volumen de sólidos que se deben lixiviar y por la disminución de las distancias, en sentido radial, que se deben atravesar al interior de los sólidos y la disminución del tamaño de las partículas contribuye a ambas cosas.

⁴⁵ SOBERANIS, Adrián Antonio. *Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la oleoresina de cardamomo (elletteria cardamomum, l. Matton) obtenida a nivel laboratorio utilizando dos métodos de lixiviación a tres diferentes temperaturas*. Trabajo de graduación de Ing. Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009. p. 83.

⁴⁶ *Ibíd.* p 84.

Por otra parte, los sólidos finos provocan una velocidad lenta de percolación, dificultan la separación de sólidos y producen un sólido de mala calidad. Estas características establecen las bases para un tamaño óptimo de partículas.

Los equipos de lixiviación se distinguen por el ciclo de operación (intermitente, continuo o intermitente de cargas múltiples), por la dirección de las diferentes corrientes (concurrente, a contracorriente o flujo híbrido), por el número de etapas (una única etapa, etapas múltiples o etapa diferencial) y por el método de contacto (percolación por pulverización, percolación por inmersión o dispersión de sólidos). En general, los anteriores descriptores catalogan cuatro categorías y deben consignarse para el establecimiento completo de un sistema de lixiviación (por ejemplo, el extractor tipo Bollman es un percolador continuo, con etapas múltiples con pulverización y flujo híbrido).

Es a través de la clasificación mediante el tipo de contacto la que proporciona las dos categorías principales en las que se divide el equipo de lixiviación:

- Los que realizan la lixiviación por percolación.
- Aquellos en que las partículas sólidas se dispersan en un líquido y, posteriormente, se separan de él.

En cada una de esas clases existen unidades continuas y por cargas. Los materiales que se desintegran durante la lixiviación se tratan en los equipos de la segunda clase.

Algunos ejemplos de lixiviación son:

- El azúcar se separa por lixiviación de la remolacha con agua caliente.
- Los aceites vegetales se recuperan a partir de semillas, como los de soya y de algodón mediante la lixiviación con disolventes orgánicos.

La extracción de colorantes se realiza a partir de materias sólidas por lixiviación con alcohol o soda.

2.5.3.1. Velocidad de lixiviación

En la lixiviación de materiales solubles del interior de una partícula por acción de un disolvente, el proceso general consiste en los siguientes pasos:

- El disolvente se transfiere del volumen de solución a la superficie del sólido.
- Después, dicho disolvente penetra o se difunde en el sólido.
- El soluto se disuelve en el disolvente.
- Entonces, el soluto se difunde a través de la mezcla de sólido y disolvente hasta la superficie de la partícula.
- Finalmente, el soluto se transfiere a la solución general.

La velocidad de extracción es afectada por los siguientes factores: temperatura, concentración del solvente, tamaño de las partículas, porosidad y agitación.

En general, la velocidad de transferencia del disolvente de la solución general hasta la superficie del sólido es bastante rápida y la velocidad hacia el interior del sólido puede ser rápida o lenta.

Sin embargo, en la mayoría de los casos estas no son las etapas que limitan la velocidad del proceso total en contacto con el disolvente; aun así, la disolución del soluto en el disolvente en el interior del sólido puede ser un simple proceso físico de disolución o una verdadera reacción química que libera al soluto para la disolución. El conocimiento del proceso de disolución es bastante limitado y el mecanismo puede ser diferente en cada caso.

La velocidad de difusión del soluto a través del sólido y la del disolvente hasta la superficie del sólido suelen ser la resistencia que controla el proceso global de lixiviación y dependen de diversos factores. Si el sólido está constituido por una estructura inerte porosa, con el soluto y el disolvente localizados en los poros del sólido, la difusión a través del sólido poroso se puede describir como una difusividad efectiva. En sustancias biológicas o naturales hay complejidades adicionales debido a la presencia de células.

2.5.3.2. Temperatura de lixiviación

Las temperaturas elevadas producen la mayor solubilidad del soluto en el disolvente y, en consecuencia, concentraciones finales mayores en el licor de lixiviación. A temperaturas elevadas la viscosidad del líquido es menor y mayores las difusividades; esto incrementa la rapidez de lixiviación.

Al aumentar la temperatura se aumenta la velocidad porque la solubilidad es mayor, el aumento de temperatura es muy usado en procesos de reacción química. La temperatura máxima para cada sistema está limitada por: el punto de ebullición del solvente, el punto de degradación del producto o del solvente, solubilidad de impurezas y por economía.

2.5.3.3. Extracción por lixiviación utilizando unidad Soxhlet

Es un método de extracción sólido-líquido que hace uso del extractor Soxhlet (véase figura 15). Este extractor consta de cuatro partes o unidades principales, siendo estas: condensador, unidad de extracción, matraz y dedal; adicionalmente se necesitan mangueras y plancha de calentamiento.

Para realizar una extracción Soxhlet se coloca una cantidad de materia prima seca en el dedal de celulosa, seguidamente se deposita en la unidad de extracción y se adapta al matraz que contiene el solvente que separará las fracciones solubles, cuando este solvente llegue a su punto de ebullición, formará vapor que ascenderá por la pared interna del extractor.

Figura 15. **Equipo de extracción Soxhlet**



Fuente: NUÑEZ, Carlos. *Extracciones con equipo Soxhlet*.

<<http://es.scribd.com/doc/51551/Extraccion-con-equipo-Soxhlet>>. [Consulta: mayo de 2010].

En la parte superior de la unidad de extracción, se conecta el condensador, con su respectiva entrada y salida de agua, cuyo flujo será en contracorriente. Esta parte del extractor Soxhlet permitirá que el vapor que sube por la pared de la unidad de extracción cambie de fase logrando con esto que caiga a la muestra en estudio, en forma de gota. El dedal deberá llenarse con el solvente que ha sido condensado hasta que alcance la altura del sifón en el extractor, luego será devuelto al matraz para empezar nuevamente el ciclo de extracción.

2.6. Caracterización de la fracción lipídica

La caracterización de cualquier compuesto extraído es muy importante porque determina el potencial uso que se le puede dar al extracto y en general a la materia prima. Existen diferentes análisis que se le pueden realizar a un extracto para determinar sus características, pueden ser tanto físicos como químicos.

2.6.1. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje o *screening* fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación.

Diversos métodos de tamizaje fitoquímico están descritos en la literatura, algunos evalúan pocos grupos de sustancias, en compensación, otros evalúan la presencia de compuestos de poco interés, como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucilagos.

“La cantidad de material vegetal necesario para hacer las pruebas varía de 5g a 200g. La comparación de 5 métodos de tamizaje demostró que el método descrito por Ciulei y adaptado en el Laboratorio de Fitoquímica del Centro Pluridisciplinar de Investigaciones Químicas, Biológicas y Agrícolas de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP), ofrece mayor reproductibilidad, siendo de más fácil ejecución”.⁴⁷

El método permite determinar la presencia de los principales grupos de compuestos químicos, tanto libres, como en la forma de glicósidos.

2.6.2. Cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación extraordinariamente versátil que presenta distintas variantes. En toda separación cromatográfica hay dos fases (sólida, líquida o gas) una móvil y otra estacionaria, en donde se mueve una con respecto de la otra manteniendo un contacto íntimo. La muestra se introduce en la fase estacionaria y la móvil. Los componentes de la mezcla invierten un tiempo diferente en recorrer cada una de las fases, con lo que se produce la separación.

⁴⁷ OÑATE, R. J.; QUINTERO, L. A. *Caracterización fisicoquímica de los extractos de la semilla del árbol de Neem (Azadirachta Indica) en el Departamento del Cesar*. Trabajo de graduación de Ing. Agroindustrial. Facultad de Ingeniería y Tecnología, Universidad Popular del Cesar. Colombia, 2008. p. 49.

Si un componente está la mayor parte del tiempo en la fase móvil el producto se mueve rápidamente, mientras que si se encuentra la mayor parte en la fase estacionaria, el producto queda retenido y su salida es más lenta.

“Existen varios tipos de cromatografía entre los más generales están:”⁴⁸

- Líquido-sólido
Fase móvil: sólido inerte como gel de sílice o alúmina
Fase estacionaria: disolventes

- Intercambio iónico
Fase móvil: resina cambiadora
Fase estacionaria: soluciones acuosas

- Líquido-líquido
Fase móvil: líquido absorbido en un soporte sólido
Fase estacionaria: líquido

- Gas-líquido
Fase móvil: película de líquido absorbida sobre un soporte sólido
Fase estacionaria: gas

La más utilizada en química orgánica es cromatografía líquido sólido en sus dos variantes: cromatografía en columna (CC) y cromatografía de capa fina (TLC).

⁴⁸ SOBERANIS, Adrián Antonio. *Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la oleorresina de cardamomo (elletteria cardamomum, l. Matton) obtenida a nivel laboratorio utilizando dos métodos de lixiviación a tres diferentes temperaturas*. Trabajo de graduación de Ing. Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009. p. 82.

2.6.2.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana.

En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etcétera) distribuido uniformemente sobre una placa de vidrio o de aluminio.

La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluyente va a migrar por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada. Después de que ha ocurrido, se evapora el eluyente y la placa se analiza utilizando luz UV o luz visible, o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada.

El gran desarrollo de esta técnica se debe a las múltiples ventajas que ella ofrece, entre las cuales se pueden citar: fácil comprensión y rápida ejecución, versatilidad, reproducibilidad y bajo costo.

“El proceso de separación está fundamentado principalmente en una serie de etapas o equilibrios de adsorción-desorción. Otros tipos de cromatografía, como la de reparto o la de intercambio iónico, pueden tener lugar cuando se utilizan fases estacionarias apropiadas. En el mercado se pueden encontrar diferentes tipos de adsorbentes entre los cuales se pueden citar: la sílica gel (SiO_2), la celita (tierra de diatomeas), la alúmina (Al_2O_3), la celulosa (para cromatografía de reparto) y la poliamida”.⁴⁹ También ha sido bastante utilizada la incorporación de reactivos a los adsorbentes, con lo cual se busca la separación de las sustancias muy relacionadas.

En el mercado se pueden encontrar las placas cromatográficas prefabricadas a un precio relativamente elevado, las cuales no necesitan de la fase preparatoria y son más homogéneas y uniformes, facilitando de esta manera una mejor separación y haciendo más reproducibles los valores de R_f (factor de retención). El factor de retención es la medida de la migración de una sustancia determinada en un solvente dado como se describe en la ecuación 2.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el solvente}}{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}$$

[Ec. 2]

Los siguientes factores causan variaciones en el valor del R_f no permitiendo que sea un valor absoluto: las variaciones de temperatura del ambiente, el grado de pureza de los solventes utilizados y las variaciones de homogeneidad de las diferentes placas de capa fina.

⁴⁹ SOBERANIS, Adrián Antonio. *Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la oleoresina de cardamomo (elletteria cardamomum, l. Matton) obtenida a nivel laboratorio utilizando dos métodos de lixiviación a tres diferentes temperaturas*. Trabajo de graduación de Ing. Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009. p. 83.

Debido a estos factores, el uso de una sustancia de referencia para garantizar la identificación, es muy importante, principalmente cuando se trata de extractos de plantas.

Las placas cromatográficas pueden ser preparadas en el propio laboratorio de análisis para disminuir los costos. F.J. de Abreu Matos describe con lujo de detalles la forma de preparar estas placas, así como la técnica de aplicación de la muestra, la elusión, el revelado y la observación de los resultados. Escoger el eluyente apropiado es de gran importancia para la buena separación de las sustancias. Este debe ser seleccionado en función de la fase estacionaria empleada y en función de la naturaleza de las sustancias que van a ser separadas.

Las ventajas del uso de la cromatografía en capa fina pueden ser resumidas de la siguiente manera:

- Se necesita equipo simple y de bajo costo.
- Es fácil su comprensión y ejecución.
- Rapidez, reproducibilidad y versatilidad en el análisis.
- Utilización de una pequeña cantidad de solvente y de la muestra que será analizada.
- Posibilidad de revelar las placas con reactivos cromogénicos, lo cual hace posible detectar sustancias que no absorben en la región UV/visible.
- Posibilidad de efectuar separaciones en escala semipreparativa.

2.6.2.2. Cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-MS)

La cromatografía en fase gaseosa general es una técnica de análisis que ofrece resoluciones excelentes con sensibilidad del orden de miligramos a picogramos. Los resultados son cuantitativos y se obtienen en un espacio de tiempo relativamente corto.

Las desventajas son: los componentes de las muestras deben ser estables a la temperatura de operación, las muestras tienen que ser volátiles; es necesario hacer un tratamiento preliminar de las muestras, lo que convierte el proceso en difícil y complejo, además de que su eficacia no es muy alta, como técnica para las identificaciones cualitativas. La identificación de las sustancias presente en la muestra necesita de técnicas auxiliares.

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-MS) permite la identificación de casi todos los compuestos en el orden de microgramos.

Esta técnica asocia la separación cromatográfica en la fase gaseosa a una detección extremadamente sensible y específica de la espectrometría de masas. De esta manera, los compuestos separados por CG son transferidos al espectrómetro de masas por el gas que se disociará en fragmentos iónicos que serán analizados de manera cualitativa. Se obtiene un espectro de masas característico de la sustancia fragmentada que permite su identificación a partir de la comparación con una base de datos espectrales.

El cromatógrafo generalmente es de columna capilar para la reducción de la presión en la cámara de ionización (1 – 5 ml/min) y posee una interface de tipo conexión directa o de divisor abierto, para la conexión de los dos sistemas, la cual tiene como función concentrar y separar las moléculas de la muestra del gas de arrastre y de la fase móvil. La cámara de ionización funciona al calor y al vacío y la ionización de la muestra se produce por ionización química o por el impacto de electrones, llegando al sistema de detección de los iones para la interpretación de los resultados.

2.6.2.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia o *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. También se le denomina a veces Cromatografía Líquida de Alta Presión o *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC), aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En la HPLC isocrática el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna.

El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía.

Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria.

Por ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas por tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.

2.6.3. Índice de refracción

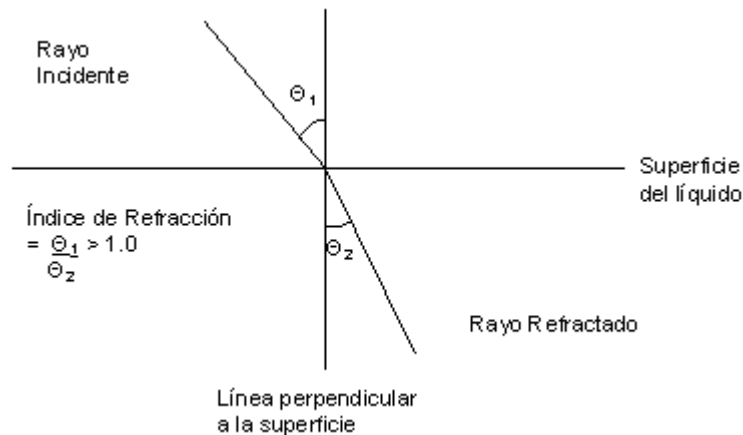
El índice de refracción es una propiedad física de los aceites y grasas. Este es un fenómeno óptico de los aceites que se define por la propiedad que poseen estos de desviar rayos luminosos de su dirección recta de propagación, dependiendo este desvío de la composición del aceite.

Como lo muestra la figura 16, al entrar el rayo en contacto con la grasa para atravesarla, sufre una desviación, formando un ángulo determinado con su primitiva dirección. El ángulo que forma el rayo antes de entrar en contacto con la grasa, medido a partir de una línea perpendicular a la superficie de ella, se denomina ángulo de incidencia. El nuevo ángulo que forma al atravesar la muestra se conoce con nombre de ángulo de refracción.

“El índice de refracción es la relación o cociente entre el ángulo de incidencia y el de refracción. El valor de este índice es una función directa del peso molecular de los aceites, aumentando en proporción al número de átomos de carbono que posean los ácidos grasos y a un grado de instauración”.⁵⁰

⁵⁰ ARIAS BARRIOS, René Filberto. *Preparación y acondicionamiento de semillas oleaginosas*. En: Manual del curso de preparación y acondicionamiento de semillas oleaginosos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Centro Universitario del Sur Escuintla. Guatemala: USAC, 1997. p. 18.

Figura 16. Índice de refracción



Fuente: ARIAS, René. *Preparación y acondicionamiento de semillas oleaginosas*. p. 18.

2.6.4. Densidad

“La densidad es la relación que existe entre la masa del cuerpo y su volumen. Se llama densidad específica de una sustancia a la relación que existen entre la densidad del material comparada con la del agua que se toma como 1. La densidad para aceites y ceras varía de 0,88 (aceite esperma) a 0,99 (cera japonesa)”.⁵¹ Esta es una propiedad física.

⁵¹ ARIAS BARRIOS, René Filberto. *Preparación y acondicionamiento de semillas oleaginosas*. En: Manual del curso de preparación y acondicionamiento de semillas oleaginosos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Centro Universitario del Sur Escuintla. Guatemala: USAC, 1997. p. 19.

2.7. Análisis proximal

“El análisis de alimentos es la disciplina que se ocupa del desarrollo, uso y estudio de los procedimientos analíticos para evaluar las características de alimentos y de sus componentes. Esta información es crítica para el entendimiento de los factores que determinan las propiedades de los alimentos, así como la habilidad para producir alimentos que sean consistentemente seguros, nutritivos y deseables para el consumidor”.⁵²

Existe un número considerable de técnicas analíticas para determinar una propiedad particular del alimento. De ahí que es necesario seleccionar la más apropiada para la aplicación específica. La técnica seleccionada dependerá de la propiedad que sea medida, del tipo de alimento a analizar y la razón de llevar a cabo el análisis.

Las determinaciones que se realizan más frecuentemente para conocer la composición de los alimentos incluyen la determinación de humedad, cenizas, extracto etéreo (grasa cruda), proteína total, fibra y carbohidratos asimilables, en un protocolo conocido como análisis proximal.

Estos procedimientos químicos revelan también el valor nutritivo de un producto y como puede ser combinado de la mejor forma con otras materias primas para alcanzar el nivel deseado de los distintos componentes de una dieta. Es también un excelente procedimiento para realizar control de calidad y determinar si los productos terminados alcanzan los estándares establecidos por los productores y consumidores.

⁵² Biblioteca Universea. *Análisis de alimentos, fundamentos y técnicas* [en línea]. <http://dspace.universia.net/bitstream/2024/1067/1/ManualdeFundamentosyTecnicasdeAnalisisdeAlimentos_6501.pdf>. [Consulta: mayo de 2010].

2.7.1. Proteína cruda

Las proteínas son sustancias químicas que están compuestas de aminoácidos de la misma manera que una pared está hecha de ladrillos.

En el trabajo de rutina se determina mucho más frecuentemente la proteína total que las proteínas o aminoácidos individuales. En general, el procedimiento de referencia Kjeldahl determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas.

El método se basa en la determinación de la cantidad de Nitrógeno orgánico contenido en el material, compromete dos pasos consecutivos:

- La descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado.
- El registro de la cantidad de amoníaco obtenida de la muestra.

Durante el proceso de descomposición ocurre la deshidratación y carbonización de la materia orgánica combinada con la oxidación de carbono a dióxido de carbono. El nitrógeno orgánico es transformado a amoníaco que se retiene en la disolución como sulfato de amonio. La recuperación del nitrógeno y velocidad del proceso pueden ser incrementados adicionando sales que abaten la temperatura de descomposición (sulfato de potasio) o por la adición de oxidantes (peróxido de hidrógeno, tetracloruro, persulfatos o ácido crómico) y por la adición de un catalizador.

En la mezcla de digestión se incluye sulfato sódico para aumentar el punto de ebullición y un catalizador para acelerar la reacción, tal como sulfato de cobre. El amoníaco en el destilado se retiene o bien por un ácido normalizado y se valora por retroceso, o en ácido bórico y valora directamente.

El método Kjeldahl no determina, sin embargo, todas las formas de nitrógeno a menos que se modifiquen adecuadamente; esto incluye nitratos y nitritos.

2.7.2. Extracto etéreo (grasa bruta)

También se le conoce como extracto de lípidos. Es la porción de un alimento que pueda ser extraída por medio de un solvente, por lo general hexano.

Los niveles de grasa se pueden interpretar como un indicador parcial del nivel energético que pueda tener un alimento pero de ninguna manera de su eficiencia total.

El contenido en lípidos libres, los cuales consisten fundamentalmente de grasas neutras (triglicéridos) y de ácidos grasos libres, se puede determinar en forma conveniente en la materia orgánica en estudio por extracción del material seco y reducido a polvo con una fracción ligera del petróleo o con éter dietílico en un aparato de extracción continua. Se dispone de estos en numerosos diseños, pero básicamente son de dos tipos:

- El tipo Bolton o Bailey-Walker que da una extracción continua debido al goteo del disolvente que se condensa sobre la muestra contenida en un dedal que es un filtro poroso, alrededor del cual pasa el vapor caliente del disolvente.
- El tipo Soxhlet da una extracción intermitente con un exceso de disolvente reciente condensado.

La eficiencia de estos métodos depende tanto del pretratamiento de la muestra como de la selección del disolvente. Para ambos métodos, después de eliminar el solvente en un rotavapor, se retiran los restos de este por arrastre con nitrógeno y se controla la pérdida de peso hasta obtener peso constante. Y así se calcula el porcentaje de extracto lipídico obtenido con base en el peso inicial de la muestra de material en estudio.

2.7.3. Fibra cruda

La fibra cruda está constituida por los carbohidratos presentes en los alimentos que no son digeridos por las enzimas de los animales. “Metodológicamente, este es el residuo orgánico insoluble resistente a la hidrólisis ácida (H_2SO_4 al 1,25%) y básica (NaOH al 1,25%). El residuo obtenido de esta forma contiene minerales y una mezcla de materiales componentes de la pared celular de los vegetales que no corresponde a ningún compuesto específico; correspondiendo aproximadamente el 97% de tales compuestos a celulosa y lignina”.⁵³

⁵³ Biblioteca Universea. *Análisis de alimentos, fundamentos y técnicas* [en línea]. <http://dspace.universia.net/bitstream/2024/1067/1/ManualdeFundamentosyTecnicasdeAnálisisdeAlimentos_6501.pdf>. [Consulta: mayo de 2010].

La fibra alimentaria cumple la función de ser la parte estructural de las plantas y, por tanto, se encuentran en todos los alimentos derivados de los productos vegetales como pueden ser las verduras, las frutas, los cereales y las legumbres.

La mayoría de las fibras son consideradas químicamente como polisacáridos, pero no todos los polisacáridos son fibras (el almidón por ejemplo no es una fibra vegetal). Las fibras se describen como polisacáridos no almidonados (polisacáridos no amiláceos). Algunos constituyentes de las fibras son la celulosa, las hemicelulosas, las pectinas, las gomas y los mucílagos. Las fibras pueden incluir también algunos compuestos no polisacáridos como puede ser la lignina (son polímeros de varias docenas de moléculas de fenol un alcohol orgánico con fuertes lazos internos que los hacen impermeables a las enzimas digestivos), las cutina y los taninos. A medida que se ha ido investigando la fibra, se han incorporado otros componentes químicos a la lista.

Los términos que a veces se mencionan de fibra cruda, fibra detergente neutra, fibra dietética se refieren a la fibra en general y reflejan tan solo diferentes metodologías empleadas para estimar el contenido de fibra en los alimentos, ya que no se pueden identificar con estos métodos los diferentes tipos de fibra.

El contenido de fibra es solamente una rápida aproximación al material digestible de los alimentos, no tiene un valor particular para los animales monogástricos y su exceso por lo general, va acompañado por baja energía.

2.7.4. Humedad

Es la medida del contenido de agua que tienen los ingredientes o alimentos. Todos los alimentos, cualquiera que sea el método de industrialización a que hayan sido sometidos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y un 95% en los alimentos naturales.

En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en dos formas generales: agua libre y agua ligada. El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad. El agua ligada se halla combinada o absorbida. Se encuentra en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos) o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales. Hay dos razones fundamentales para su determinación y control:

- Es el factor determinante en la descomposición de los alimentos, contribuyendo a la proliferación de hongos, bacterias e insectos, los cuales tienen requisitos de ambiente, humedad y nutrientes (como cualquier otro ser viviente).
- El contenido de humedad de los alimentos afecta la cantidad de nutrientes.

El método gravimétrico que normalmente se utiliza para su determinación se basa en someter la muestra a desecación en una estufa de aire forzado a determinada temperatura, según la cantidad y tipo de muestra, hasta obtener peso constante. Mediante la cuantificación de la pérdida de peso, se determina el porcentaje de humedad y materias volátiles contenidos en la muestra.

2.7.5. Cenizas

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las cenizas normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes.

El valor principal de la determinación de cenizas (y también de las cenizas solubles en agua, la alcalinidad de las cenizas y las cenizas insolubles en ácido) es que supone un método sencillo para determinar la calidad de ciertos alimentos, por ejemplo en las especias y en la gelatina es un inconveniente un alto contenido en cenizas.

“Las cenizas de los alimentos deberán estar comprendidas entre ciertos valores, lo cual facilitará en parte su identificación. En los vegetales predominan los derivados de potasio y en las cenizas animales los del sodio. El carbonato potásico se volatiliza apreciablemente a 700°C y se pierde casi por completo a 900°C. El carbonato sódico permanece inalterado a 700°C, pero sufre pérdidas considerables a 900°C. Los fosfatos y carbonatos reaccionan además entre sí”.⁵⁴

⁵⁴ Biblioteca Universea. *Análisis de alimentos, fundamentos y técnicas* [en línea]. <http://dspace.universia.net/bitstream/2024/1067/1/ManualdeFundamentosyTecnicasdeAnalisisdeAlimentos_6501.pdf>. [Consulta: mayo de 2010].

En general para el cálculo de las cenizas totales se utiliza un método gravimétrico que se basa en la calcinación de la muestra hasta cenizas albas en una mufla a 600 °C aproximadamente, controlando el peso, hasta que este sea constante. Se calcula el porcentaje de cenizas totales con base al residuo mineral obtenido. Frecuentemente su determinación, solamente se hace para estimar los carbohidratos presentes por diferencia.

2.8. Estudio histológico

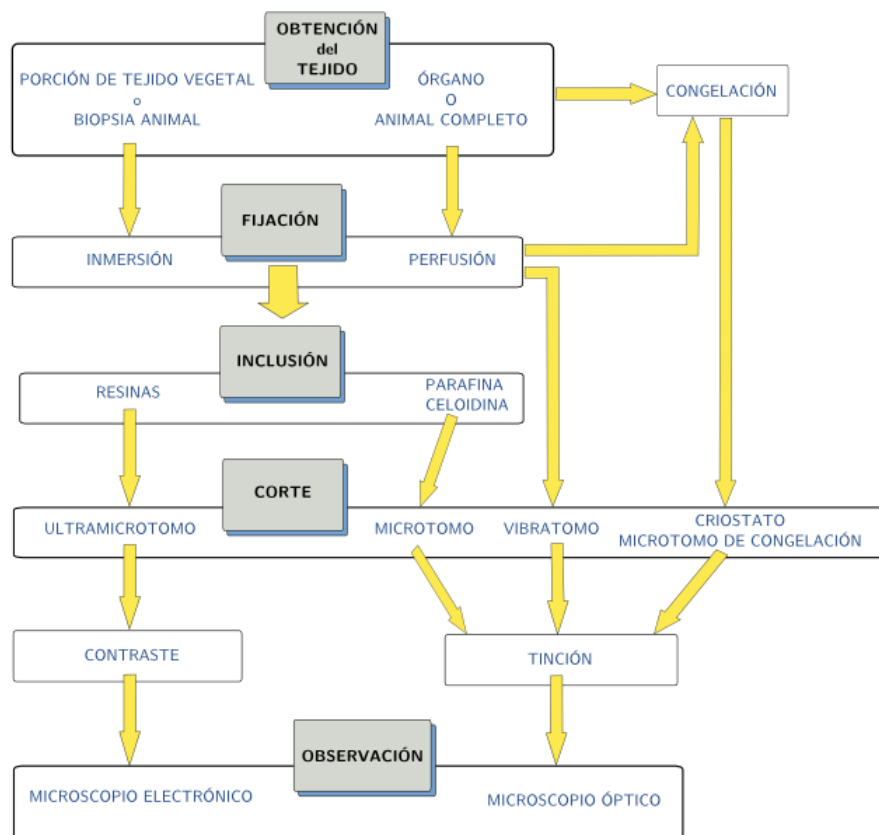
Se trata de una serie de métodos y técnicas utilizadas para estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. Hay diversas series de técnicas para estudiar los tejidos, que se utilizan dependiendo de qué característica se desee observar (el esquema del proceso se puede ver en la figura 17).

“El proceso o estudio histológico comienza con la obtención del tejido objeto de estudio. En el caso de los tejidos vegetales se toman muestras de los distintos órganos que componen el cuerpo de la planta, mientras que para los tejidos animales se puede optar por dos opciones: coger una porción de dicho tejido o procesar una parte, órgano o el animal completo. En cualquier caso las muestras son habitualmente fijadas con soluciones líquidas que contienen sustancias denominadas fijadores, las cuales mantienen las estructuras celulares y moleculares en sus posiciones iniciales durante el procesamiento posterior. También se pueden fijar las moléculas de los tejidos por congelación rápida”.⁵⁵

⁵⁵ MOLIST G., Pilar, et al. *Técnicas histológicas: atlas de la historia vegetal y animal* [en línea]. <<http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/1-introduccion.php>>. [Consulta: mayo de 2010].

Fijar un tejido es como si se hiciera una fotografía del tejido que se mantendrá hasta su observación. Sin embargo, el uso de fijadores o medios de inclusión afectan a veces las características tisulares que se quieren observar y por tanto, se tiene que recurrir a la congelación para endurecer el tejido y después poder obtener secciones del mismo.

Figura 17. **Esquema del proceso histológico**



Fuente: Atlas de la historia vegetal y animal. *Técnicas histológicas*. <webs.uvigo.es>.

[Consulta: mayo de 2010].

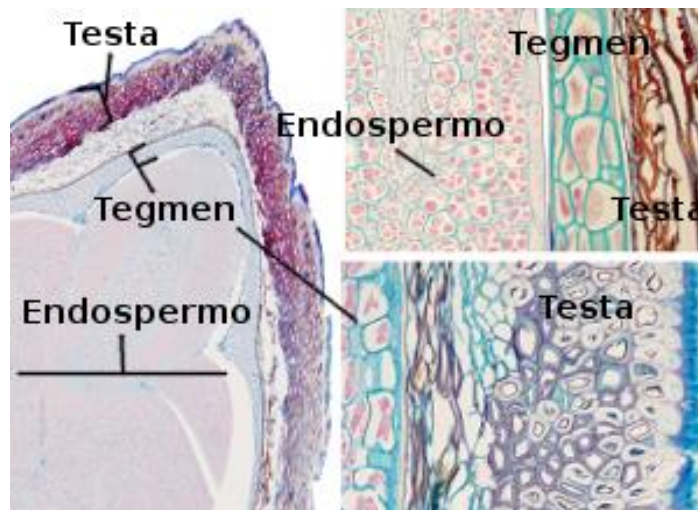
Normalmente, tras la fijación se procede a incluir el tejido para posteriormente obtener secciones de este. Esto se consigue embebiendo el tejido con sustancias líquidas que posteriormente polimerizarán (resinas) o se volverán consistentes (ceras). También se puede conseguir el mismo efecto mediante congelación rápida. Cortes más gruesos de 40 μm se pueden cortar sin necesidad de inclusión usando el vibratomo. Los medios de inclusión son normalmente no hidrosolubles por lo que se tiene que sustituir el agua de los tejidos por solventes orgánicos liposolubles y posteriormente añadir el medio de inclusión.

“Tras la inclusión o la congelación se procede a cortar los tejidos. Existen diferentes aparatos de corte que permiten conseguir secciones ultrafinas (del orden de nanómetros), semifinas (de 0,5 a 2 μm), finas (entre unas 3 y 10 μm) y gruesas (mayores a 10 μm). Estas secciones se tienen que procesar para poder observarlas, aunque ciertos tipos de microscopía, por ejemplo, con contraste de fase, permiten observar tejidos sin teñir. Normalmente, las secciones se tiñen con colorantes que son hidrosolubles, por lo que se tiene que eliminar el medio de inclusión para que los colorantes puedan unirse al tejido. Las secciones ultrafinas que se observan con el microscopio electrónico se pueden contrastar con metales pesados, opacos a los electrones, sin eliminar la resina”.⁵⁶

⁵⁶ MOLIST G., Pilar, et al. *Técnicas histológicas: atlas de la historia vegetal y animal* [en línea]. <<http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/1-introduccion.php>>. [Consulta: mayo de 2010].

Los tejidos procesados se observan con los microscopios. Existen dos tipos básicos de microscopios: electrónico y óptico. Los primeros permiten un gran poder de resolución, pudiéndose observar características ultra estructurales, mientras que los segundos, con menor poder de resolución, ofrecen una gran versatilidad en cuanto a modos de observar los tejidos: fluorescencia, contraste de fase, polarización o contraste de interferencia diferencial. Un ejemplo de un corte histológico se puede apreciar en la siguiente figura.

Figura 18. **Corte de una semilla de manzana (*Malus domestica*), teñida con safranina y azul alcian**



Fuente: Atlas de la historia vegetal y animal. *Órganos vegetales*. <webs.uvigo.es>.

[Consulta: mayo de 2010].

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Variables

Como resultado de la revisión bibliográfica sobre los factores que influyen en el método que se utilizó (lixiviación por técnica Soxhlet), se determinaron y definieron operacionalmente las variables manipuladas para medir el efecto sobre los resultados, así como las constantes.

Tabla IV. **Definición operacional de las variables para el proceso de extracción de la fracción lipídica de la semilla de Neem por lixiviación utilizando la técnica Soxhlet**

No.	Descripción	Factor potencial de diseño		Factor perturbador	
		constante	variable	controlable	no controlable
1	Solvente		X	X	
2	Temperatura		X	X	
3	Materia prima	X		X	
4	Relación soluto-solvente	X		X	
5	Tiempo de extracción		X		X
6	Tamaño de partícula	X		X	
7	Humedad de muestra	X		X	
8	Número de ciclos extractivos		X		X

Fuente: elaboración propia.

3.1.1. Descripción de variables

Debido al método utilizado, extracción por lixiviación utilizando la técnica Soxhlet, se tienen que especificar las variables y constantes como parámetro para el aseguramiento de calidad dentro del marco de la investigación.

Tabla V. **Especificaciones de las variables para el proceso de extracción por lixiviación utilizando la técnica Soxhlet**

Variable	Especificaciones dentro del marco de la investigación
Solvente	Tres diferentes solventes: <ul style="list-style-type: none">- Hexano al 99,80% v/v- Isopropanol al 99,97% v/v- Metanol al 99,90% v/v
Temperatura	Temperatura de ebullición de cada solvente <ul style="list-style-type: none">- Hexano: 65 °C a 640 mmHg- Isopropanol: 77 °C a 640 mmHg- Metanol: 60 °C a 640 mmHg
Número de ciclos extractivos	De forma experimental (por medio del monitoreo de la densidad, sólidos disueltos totales e índice de refracción) se determinó: <ul style="list-style-type: none">- Hexano: 8 ciclos (1,5 h)- Isopropanol: 10 ciclos (2,0 h)- Metanol: 15 ciclos (3,5 h)

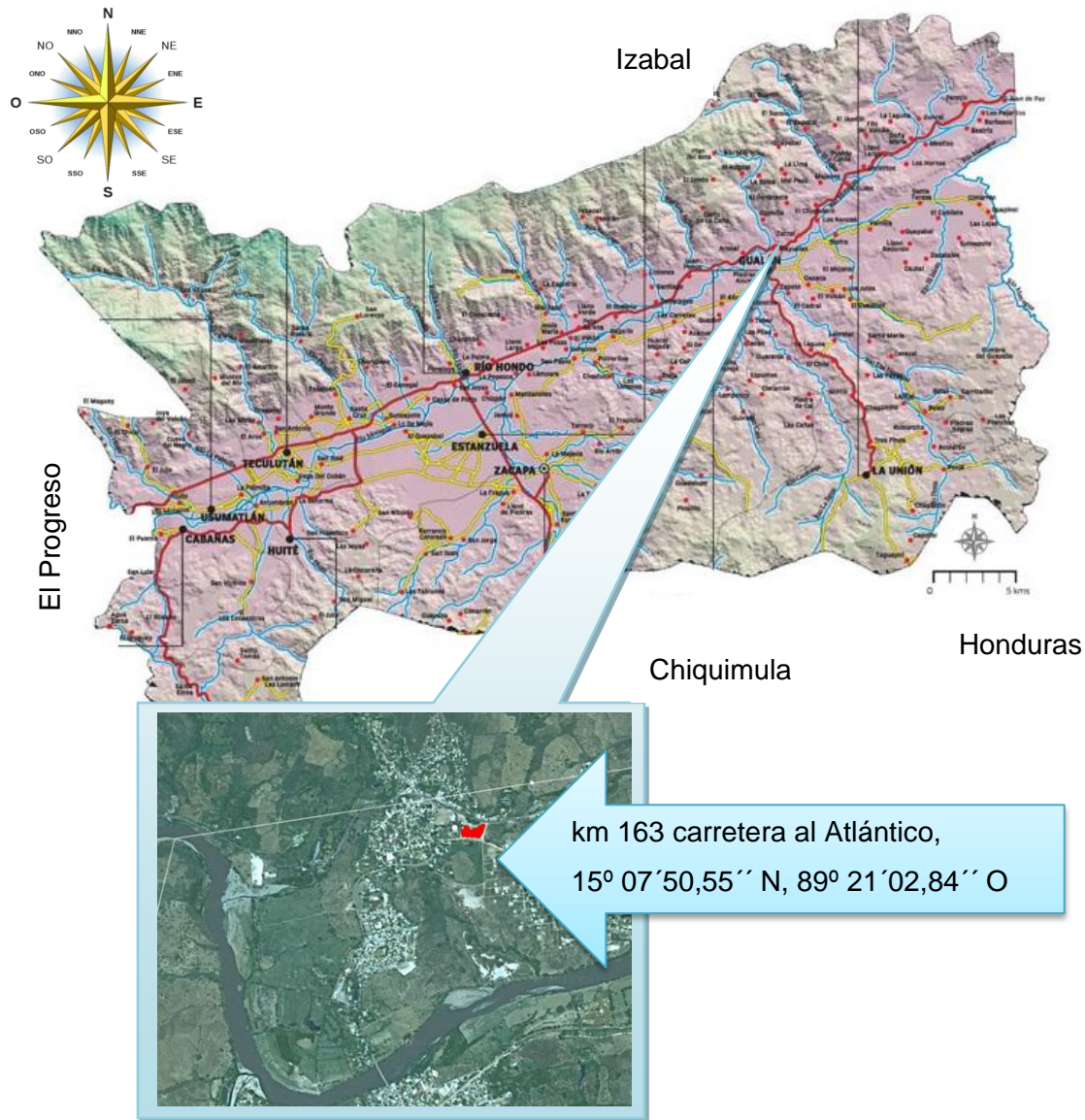
Fuente: elaboración propia.

Tabla VI. **Especificaciones de las constantes para el proceso de extracción por lixiviación utilizando la técnica Soxhlet**

Constante	Especificaciones dentro del marco de la investigación
Tamaño de la partícula	De 841 a 1190 micrones
Humedad de la muestra	$\%h < 10\%$ w/w
Materia prima	Semillas de Neem provenientes de un bosque silvestre, ubicado al costado sur de la carretera al Atlántico en el kilómetro 163, aldea Mayuelas, Gualán del departamento de Zacapa, Guatemala.

Fuente: elaboración propia.

Figura 19. **Mapa de Zacapa, Guatemala con la ubicación exacta del lugar**



Fuente: *Google Maps: searchable map of República de Guatemala.*

http://www.nationsonline.org/oneworld/map/google_map_guatemala.htm.

[Consulta: mayo de 2010].

3.2. Delimitación de campo de estudio

El estudio comprende una caracterización de la fracción lipídica extractable de Neem como objetivo principal, sin embargo, en Guatemala no existen muchos árboles de Neem, por lo tanto, se delimitó el estudio de campo a un sector pequeño en el departamento de Zacapa y luego se trabajó la parte experimental en la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Es importante resaltar la delimitación de la investigación para poder hacer las pertinentes conclusiones acerca de la investigación y tomar futuras decisiones con respecto a los resultados.

3.2.1. Localización

La parte experimental de la investigación se realizó en los laboratorios del Área de Química de la Escuela de Ingeniería Química y la Sección de Química Industrial, del Centro de Investigación de Ingeniería (CII) de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

3.2.2. Selección de muestra

Se seleccionaron árboles de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sembrados en una propiedad privada, situada en el kilómetro 163 de la carretera al Atlántico. Sitio que se localiza en la aldea de Mayuelas, municipio de Gualán, Zacapa, Guatemala, con coordenadas 15° 07'50,55" Norte y 89° 21'02,84" Oeste, a 160 metros sobre el nivel del mar aproximadamente.

Esta región, según el Atlas Nacional de Guatemala, posee un clima cálido ($T > 23,9$ °C), con características húmedas y bosques como vegetación natural característica. Esta zona posee inviernos benignos y sin una estación seca definida. Sus suelos están desarrollados sobre ceniza volcánica a elevaciones medianas (100 – 499 m). Estos son poco profundos o muy poco profundos en los casos en donde la erosión ha sido muy severa por cultivo de laderas. La textura del suelo superficial es franca y franco-arcillosa hasta profundidades de 26 cm. Los subsuelos son de textura franco arcillosa, de color café claro a café amarillento; son ligeramente ácidos y su profundidad promedio llega hasta 1 m.

La forma de la superficie terrestre en esta área del país es en su mayoría montañosa predominante de esquistos. Posee una zona de vida vegetal categorizada como tropical muy seca. El uso que se le da a la tierra en esta área es extensivo, principalmente en actividades agropecuarias normales, sin embargo, se sugiere que esta área dará bajos rendimientos unitarios para este uso, siendo más aprovechables para la explotación ganadera o forestal de carácter extensivo.

Las muestras de semillas que se recolectaron en la propiedad ya mencionada, se hizo de forma aleatoria, de tal manera que las muestras fueron combinaciones de unidades con la misma probabilidad de ser elegidas como muestra y en iguales condiciones para evitar posibles efectos negativos en los resultados de la investigación.

Las condiciones que se tomaron en cuenta a la hora de recolectar el fruto fueron las siguientes: frutos sin daños físicos, signos de enfermedades, golpes, magulladuras y que tengan coloración externa homogénea.

3.2.3. Diseño experimental

Inicialmente para llevar a cabo la investigación, se procedió a recolectar el fruto del árbol de Neem, despulparlo, obteniendo así una semilla limpia, para luego ser secada hasta llevarla a una humedad menor del 10% w/w y así evitar su descomposición. Posteriormente, las muestras se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético, para evitar un cambio de humedad y pérdida de las fracciones volátiles presentes en la materia prima.

Teniendo la materia prima en las condiciones de humedad requeridas se procedió a seleccionar aleatoriamente, de la muestra principal, la cantidad de 40 semillas, a las cuales se les midió la masa, la longitud y el ancho, tanto a la semilla entera como al cotiledón (almendra) para obtener las características dimensionales de la semilla.

Para estimar el porcentaje de fracción lipídica extractable contenida en la semilla del árbol del Neem, se realizaron inicialmente ensayos preliminares de la extracción de la fracción lipídica contenida en la semilla de Neem con cada solvente planteado (hexano, isopropanol y metanol) utilizando la técnica Soxhlet para determinar el tiempo óptimo de extracción. De estos ensayos preliminares se determinó que el número de ciclos adecuados para el proceso era de 8 ciclos (1,5 h) para el hexano, 10 ciclos (2,0 h) para el isopropanol y 15 ciclos (3,5 h) para el metanol.

También se determinó que la cantidad de muestra indicada era de 15 g; esto debido a la relación soluto-solvente la cual se estipuló era de 1:13,33.

Teniendo en cuenta lo anterior, para el desarrollo de la investigación se planteó un diseño experimental unifactorial o experimento con un solo factor, con 3 niveles del factor y cinco repeticiones.

Cada tratamiento se define por el solvente utilizado en la extracción de la fracción lipídica por medio de un método de lixiviación utilizando la técnica Soxhlet; los cuales son: hexano al 99,90% v/v, isopropanol al 99,97% v/v y metanol al 99,80% v/v. Los tratamientos se realizaron por quintuplicado para un total de 15 tratamientos experimentales. A cada tratamiento experimental se le determinó el porcentaje de fracción lipídica extraída de la semilla del árbol del Neem, valores que fueron registrados para realizar el diseño estadístico planteado.

3.2.4. Manejo experimental

Por la naturaleza de los objetivos de la investigación, se utilizaron los mismos parámetros de control durante cada etapa de extracción, las cuales implican diferente solvente, en este caso: hexano, isopropanol y metanol. Cada tratamiento planteado se realizó a través de la metodología de extracción por lixiviación utilizando la técnica Soxhlet; técnica seleccionada por ser teóricamente la más eficiente para la extracción sólido-líquido a nivel laboratorio.

Las extracciones de cada etapa se realizaron a la temperatura de ebullición de cada solvente mencionado a una presión de 640 mmHg. Las condiciones de la materia prima fueron las siguientes: un tamaño de partícula entre 841 y 1190 micrones y humedad menor del 10% w/w.

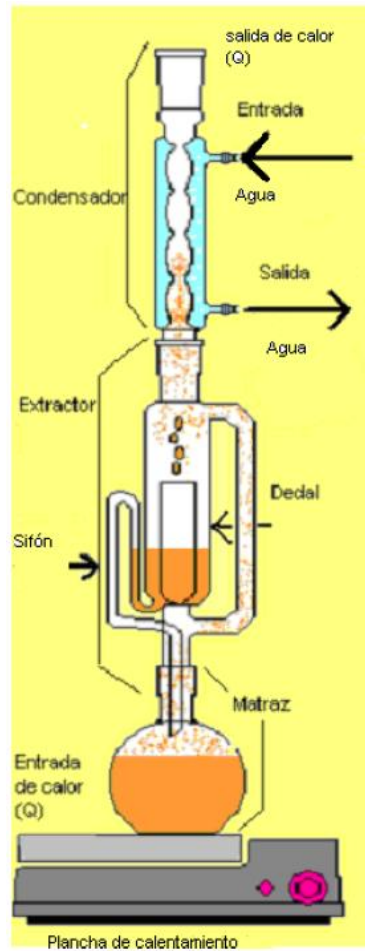
3.2.4.1. Método de extracción utilizado

Se utilizó una lixiviación por percolación utilizando la técnica Soxhlet, la cual se describe a continuación. Inicialmente el solvente se encuentra en un matraz, de fondo plano o redondo, el cual es agitado con un agitador magnético, este se eleva a temperatura de ebullición del solvente, con el objetivo de que el solvente evaporado se desplace por el brazo exterior del equipo de extracción Soxhlet que conecta el balón y la cámara de extracción, para luego condensarse en el refrigerante Allihn o de bolas y depositarse en el tubo extractor, donde se encuentra la materia prima dentro de un dedal de celulosa.

Una vez el nivel del soluto alcanza la altura del tubo de reflujo se produce el efecto de sifón que regresa el solvente al matraz de fondo plano, donde se repite el proceso, como se observa en la figura 18. El tiempo de contacto entre el soluto y el solvente es variable, ya que cada uno de los ciclos varía y depende, muchas veces, de las pérdidas de calor que se puedan presentar en el sistema. En este método extractivo es necesario tomar como parámetro de control del proceso, la temperatura a la cual el solvente alcanza el punto de ebullición, a una presión atmosférica determinada (para el caso de Guatemala a 640 mmHg).

Durante el proceso, en esta investigación, se llevó a cabo un monitoreo para determinar el final de la extracción, se tomaron alícuotas del solvente que se encontraba dentro del equipo Soxhlet para poder determinar valores de densidad, sólidos disueltos totales e índice de refracción. El punto final se determinó cuando el valor de la densidad, los sólidos disueltos totales y el índice de refracción del solvente presente dentro del equipo Soxhlet igualó el valor que el solvente presentaba al inicio de la extracción.

Figura 20. Diagrama del equipo de extracción Soxhlet



Fuente: NUÑEZ, Carlos. *Extracciones con equipo Soxhlet*.

<<http://es.scribd.com/doc/51751551/Extraccion-con-equipo-Soxhlet>>. [Consulta: mayo de 2010].

3.3. Recursos humanos disponibles

- Investigadora: Br. Margarita María López Gomar
- Asesor: Ing. Qco. César Alfonso García Guerra
- Coasesor: Ing. Qco. Adrián Antonio Soberanis Ibáñez

3.4. Recursos físicos disponibles

Todos los procedimientos que se realizaron para fines de esta investigación se llevaron a cabo en las instalaciones de los siguientes laboratorios de la Universidad de San Carlos de Guatemala:

Tabla VII. Recursos físicos disponibles

Laboratorio	Actividad a realizar
Laboratorios de la Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniería.	<ul style="list-style-type: none">- Secado de la materia prima- Medición de humedad- Molido y tamizado de la materia prima seca- Rotaevaporación- Medición del índice de refracción
Laboratorio de Microscopía de la Facultad de Agronomía.	<ul style="list-style-type: none">- Estudio histológico de la semilla
Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Veterinaria.	<ul style="list-style-type: none">- Análisis proximal de la semilla
Laboratorio del Área de Química de la Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería.	<ul style="list-style-type: none">- Extracción de la fracción lipídica- Monitoreo (medición de densidad y sólidos solubles totales)
Laboratorio del LIPRONAT, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.	<ul style="list-style-type: none">- Tamizaje fitoquímico
Laboratorio del Departamento de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.	<ul style="list-style-type: none">- Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Fuente: elaboración propia.

3.5. Recursos materiales disponibles

En una investigación es de suma importancia describir todos los recursos materiales a utilizar, ya que estos son los elementos con los cuales se trabajó durante el proceso.

3.5.1. Materia prima

El principal componente del presente estudio son las semillas del árbol de Neem (*Azadirachtin Indica A. Juss*), las cuales fueron escogidas aleatoriamente dentro de un bosque silvestre ubicado en la aldea de Mayuelas, Gualán del departamento de Zacapa, Guatemala.

3.5.2. Reactivos

Para esta investigación se utilizaron tres diferentes solventes, cada uno con diferentes características, las cuales se describen a continuación:

- Hexano al 99,8% v/v

- Fórmula molecular C_6H_{14}
- Masa molar 86,2 g/mol
- Apariencia Líquido claro, incoloro
- Densidad 0,66 g/ml (20 °C)
- Punto de ebullición 68,85 °C (760 Torr), 64,79 °C (640 Torr)
- Punto de fusión 95,15 °C (760 Torr)
- Temperatura de ignición 240 °C (760 Torr)
- Constante dieléctrica 1,89 (25 °C)
- Solubilidad en agua Inmiscible

- Isopropanol (IPA) al 99,97% v/v

- Fórmula molecular C_3H_8O
- Masa molar 60,1 g/mol
- Apariencia Líquido claro, incoloro
- Densidad $0,786 \text{ g/cm}^3$ (20 °C)
- Punto de ebullición 82,5 °C (760 Torr), 77,45 °C (640 Torr)
- Punto de fusión -89 °C (760 Torr)
- Temperatura de ignición 425 °C (760 Torr)
- Constante dieléctrica 18,3 (25 °C)
- Solubilidad en agua Miscible

- Metanol al 99,9% v/v

- Fórmula molecular CH_4O
- Masa molar 32,04 g/mol
- Apariencia Líquido claro, incoloro
- Densidad $0,786 \text{ g/cm}^3$ (20 °C)
- Punto de ebullición 64,7 °C (760 Torr), 59,90 °C (640 Torr)
- Punto de fusión -97,16 °C (760 Torr)
- Temperatura de ignición 455 °C (760 Torr)
- Constante dieléctrica 33,6 (25 °C)
- Solubilidad en agua Totalmente miscible

3.5.3. Equipo

- Equipo de extracción Soxhlet con una relación soluto-solvente de 1:13,33
- Molino de cuchillas
- Horno
- Plancha calentador-agitador
- Bomba de vacío
- Rotavapor
- Balanza analizadora de humedad
- Balanza analítica
- Campana de extracción
- Refractómetro
- Cronómetro digital

3.5.4. Cristalería

- Matraces de Erlenmeyer
- Balones
- Vasos de precipitados(*Beackers*)
- Termómetro
- Picnómetro
- Perlas de ebullición
- Probetas
- Pipetas volumétricas
- Bolsas plásticas con cierre hermético
- Vidrios de reloj
- Frascos de vidrio color ámbar

3.6. Técnica cuantitativa

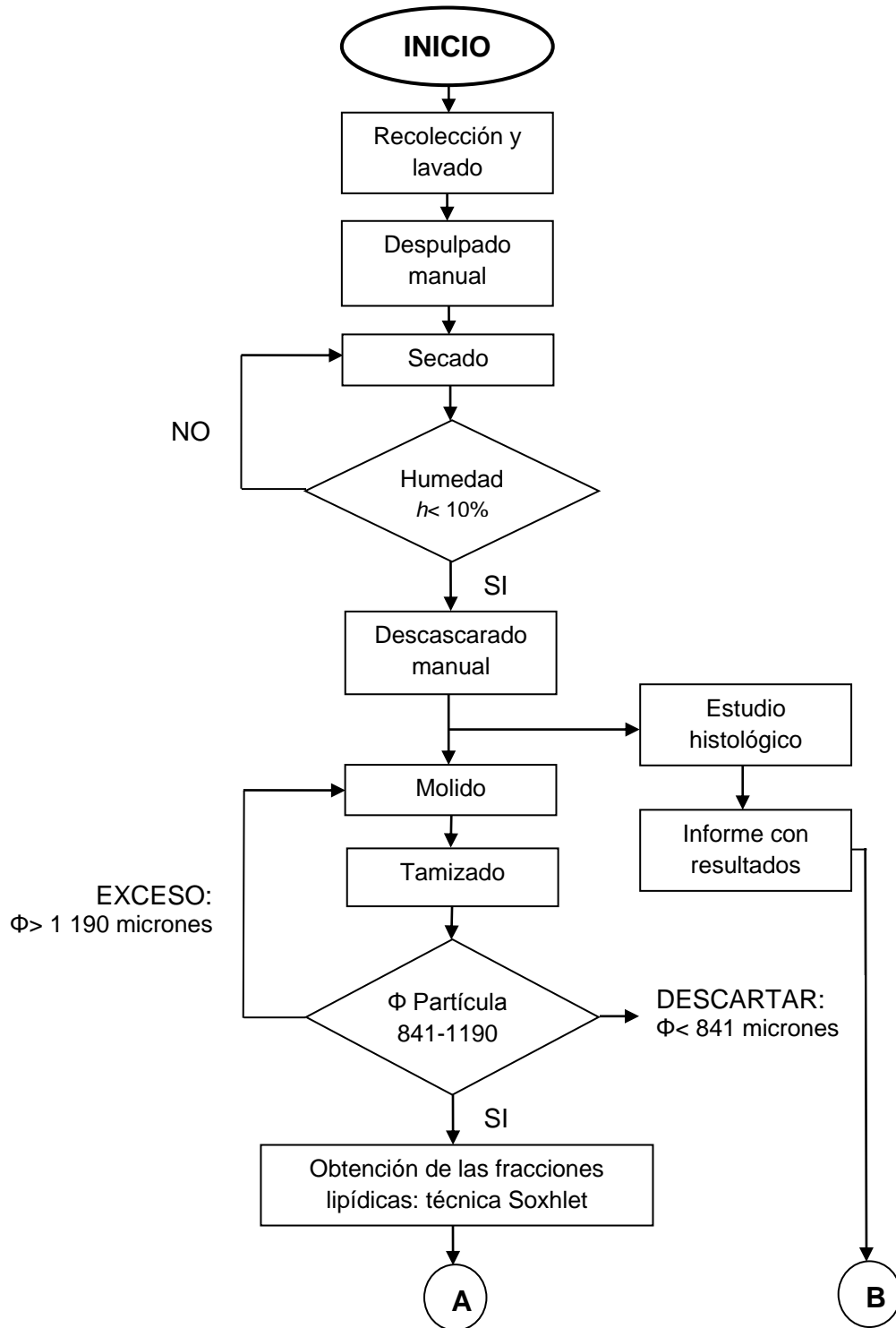
El análisis cuantitativo determina la cantidad de cada elemento que se encuentra en una sustancia o de una mezcla de sustancias.

La técnica cuantitativa utilizada en esta investigación es la gravimetría, la cual permite calcular mediante relaciones de pesos, que generalmente se hace por estequiometría, la cantidad original de analito en una muestra.

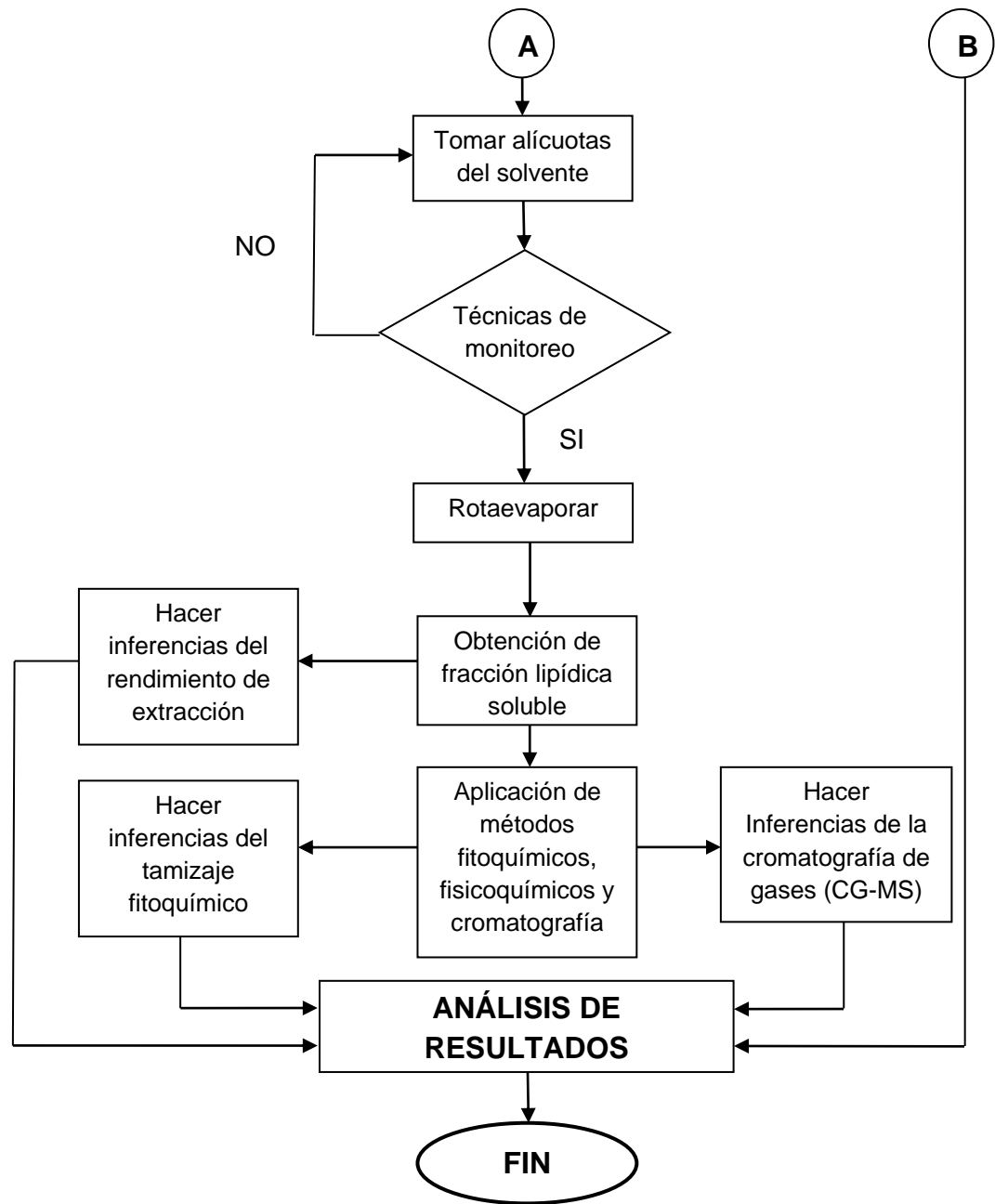
3.7. Recolección y ordenamiento de la información

La recolección de la información se llevó a cabo en tres etapas, primero se realizó el relevamiento de la información, luego el trabajo de laboratorio y finalmente el trabajo de escritorio, esto con el fin de llevar un orden y así obtener resultados satisfactorios.

Figura 21. Diagrama de flujo del proceso experimental

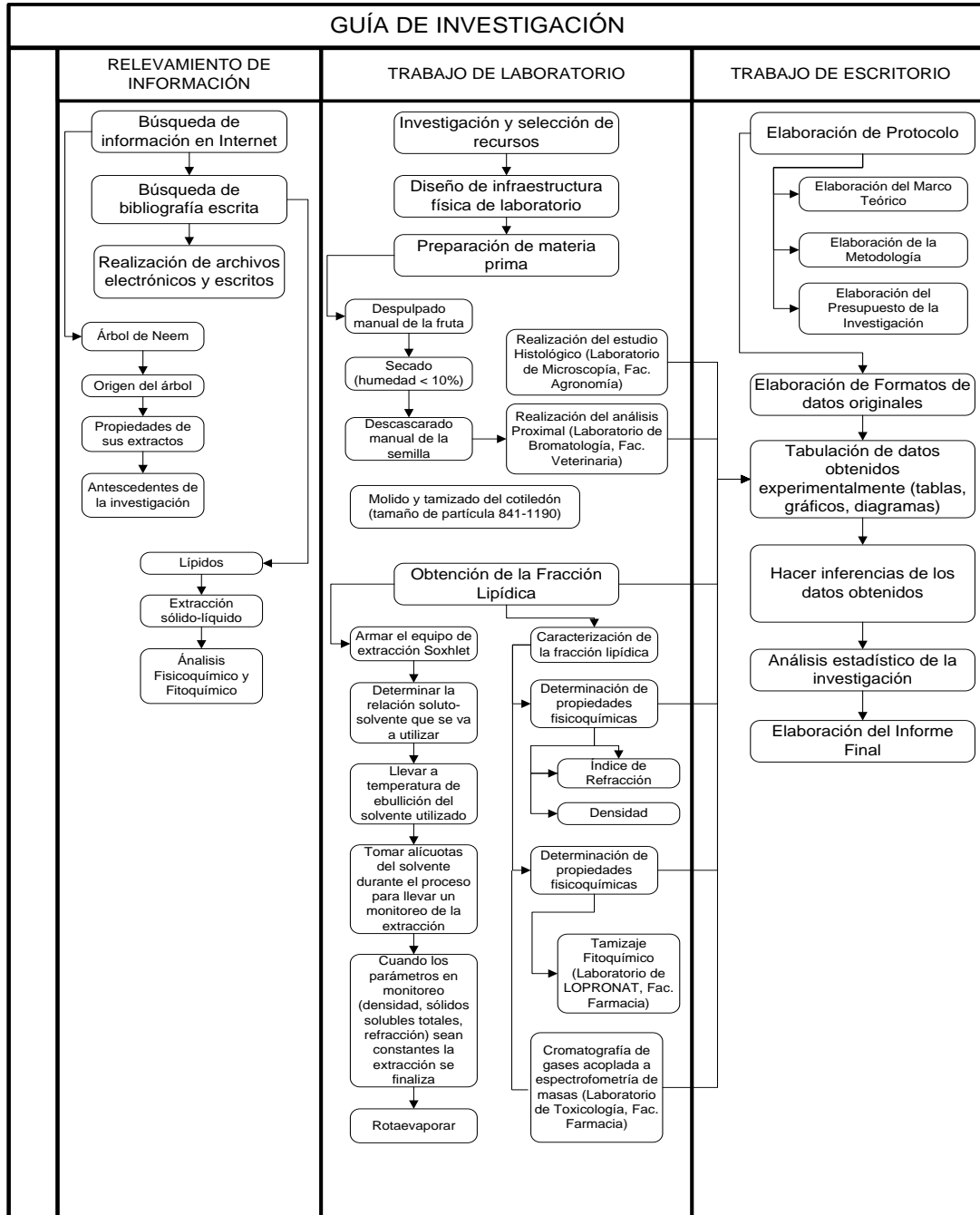


Continuación de la figura 21.



Fuente: elaboración propia.

Figura 22. **Flujograma de la metodología para un proceso de extracción sólido-líquido**



Fuente: elaboración propia.

3.8. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

Es importante describir los métodos que se utilizaron para una investigación experimental, debido a que con base en ellos se verificó la calidad de los resultados.

3.8.1. Métodos para monitorear

El monitoreo se llevó a cabo durante la extracción de la fracción lipídica de la semilla de Neem, mediante la técnica Soxhlet. Este monitoreo es importante porque da la pauta para terminar la extracción. Los parámetros que se monitorearon fueron la densidad y los sólidos solubles totales.

3.8.1.1. Densidad

- Medir la densidad del disolvente con un picnómetro, antes de iniciar el método de extracción Soxhlet, aproximadamente a 20 °C.
- Colocar una manguera dentro del equipo de extracción Soxhlet conectada a una jeringa de 10 ml para extraer alícuotas.
- Esperar a que la muestra se encuentre a una temperatura aproximadamente de 20 °C.
- Pesar el picnómetro con la muestra en la balanza y calcular la densidad

3.8.1.2. Sólidos solubles totales

- Pesar un platillo limpio
- Colocar una manguera dentro del equipo de extracción Soxhlet conectada a una jeringa de 10 ml para extraer alícuotas.
- Depositar una alícuota de 1 ml en el platillo
- Secar la muestra a 30 °C en un horno
- Pesar el platillo con la muestra seca
- Por diferencia de pesos se obtiene la cantidad de sólidos solubles totales

3.8.2. Métodos para determinar las propiedades físicas

Las propiedades físicas de la materia se caracterizan porque se pueden medir y observar en una sustancia sin que cambien su composición o identidad. Existen varias propiedades físicas y también métodos, sin embargo, para fines de esta investigación se midió el índice de refracción con un refractómetro y la densidad con un picnómetro de 1 ml.

3.8.2.1. Índice de refracción

- Limpiar el refractómetro Abbe con Xilol
- Colocar una gota de la muestra en el prisma
- Tomar nota de la lectura

3.8.2.2. Densidad

- Limpiar y pesar el picnómetro
- Llenar el picnómetro con la muestra hasta el aforo
- Pesar el picnómetro con la muestra
- Hacer la relación masa/volumen para calcular la densidad de la muestra a la temperatura de la misma.

3.8.3. Método para determinar las propiedades químicas por cromatografía (CG-MS)

Un sistema de cromatografía de gas acoplado a espectrometría de masas consta de un gas de arrastre, un puerto de inyección de la muestra, una columna, el horno que contiene a la columna y un sistema espectrofotométrico de masas (fuente de ionización, analizador de masas y un detector). La muestra se volatiliza en el puerto de inyección y se inyecta con exactitud y precisión en la cabeza de la columna cromatográfica.

3.8.4. Métodos para determinar las propiedades fitoquímicas

Los métodos para determinar las propiedades fitoquímicas de la materia son puramente cualitativos, pues sólo identifican los grupos de los metabolitos que hay en la muestra y no determina la cantidad que hay.

3.8.4.1. Tamizaje fitoquímico

Indica qué tipo de metabolitos secundarios se encuentran en el material. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. El método permite determinar la presencia de los principales grupos de compuestos químicos.

3.9. Análisis estadístico

Para la extracción de la fracción lipídica de la semilla de Neem se utilizaron 3 solventes diferentes: hexano al 99,90% v/v, isopropanol al 99,97% v/v y metanol al 99,80% v/v, como variables. A cada tratamiento se le realizaron 5 repeticiones para hacer un total de 15 unidades experimentales. Posteriormente, se les realizaron los análisis respectivos para determinar su calidad.

El análisis estadístico de los datos obtenidos del porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica de la semilla de Neem obtenida por extracción Soxhlet, se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) en una sola dirección y se confirmó por medio de una prueba de Tuckey.

El arreglo de los datos se determina de la siguiente manera:

Tabla VIII. **Datos requeridos para un experimento en una dirección, con k tratamientos y n repeticiones**

Tratamiento k (Solvente)	No. de repetición n (Rendimiento)					PROMEDIO
	1	2	3	4	5	
hexano	$Y_{1,1}$	$Y_{1,2}$	$Y_{1,3}$	$Y_{1,4}$	$Y_{1,5}$	$\bar{Y}_{1.}$
isopropanol	$Y_{2,1}$	$Y_{2,2}$	$Y_{2,3}$	$Y_{2,4}$	$Y_{2,5}$	$\bar{Y}_{2.}$
metanol	$Y_{3,1}$	$Y_{3,2}$	$Y_{3,3}$	$Y_{3,4}$	$Y_{3,5}$	$\bar{Y}_{3.}$
						\bar{Y}

Fuente: elaboración propia.

Tabla IX. **Organización de datos para el análisis de varianza (ANOVA)**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-valor
Tratamientos	$SCS = \sum Y^2 - \frac{Y_t}{n}$	$k - 1$	$CM_S^2 = \frac{SCS}{k - 1}$	$\frac{CM_S^2}{CM_E^2}$	< 0,0001
Error	$SCE = \sum \frac{Y^2}{k} - \frac{Y_t}{n}$	$k(n - 1)$	$CM_E^2 = \frac{SCE}{k(n - 1)}$		< 0,0001
Total	$SCT - SCS = SCE$	$kn - 1$			

Fuente: elaboración propia.

Este análisis presenta el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \Sigma_{ij} \quad [\text{Ec. 3}]$$

En donde:

Y_{ij} = rendimiento

S_i = efecto del solvente

μ = promedio general

Σ_{ij} = error experimental

4. RESULTADOS

Respecto a los objetivos planteados para este estudio, se obtuvieron varios datos que resaltan las distintas características del extracto de Neem obtenido con los diferentes solventes. Según cada aspecto evaluado, se muestran las siguientes tablas.

Tabla X. **Análisis proximal de la almendra de la semilla de Neem**

Muestra	BASE	Agua %	Materia total seca %	Extracto etéreo %	Fibra cruda %	Proteína cruda %	Cenizas %
Semilla de Neem	seca	8,51	91,49	37,66	16,97	39,54	4,31

Fuente: elaboración propia.

Tabla XI. **Características dimensionales de la semilla de Neem**

	SEMILLA			ALMENDRA		
	Masa	Largo	Ancho	Masa	Largo	Ancho
Promedio	0,14 g	1,37 cm	0,67 cm	0,10 g	1,16 cm	0,58 cm
Desviación estándar	0,03 g	0,08 cm	0,07 cm	0,02 g	0,07 cm	0,06 cm

Fuente: elaboración propia.

Tabla XII. **Porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica extraída de la semilla de Neem obtenida con hexano por la técnica de extracción Soxhlet**

Código	Corrida	% Rendimiento*	IR
SH 1	1	12,248	1,4160
SH 2	2	13,303	1,4450
SH 3	3	10,239	1,4375
SH 4	4	11,843	1,4395
SH 5	5	11,036	1,4455
	Promedio	11,734	1,4367
	Desviación estándar	1,168	0,0121

*Tiempo de extracción = 1,5 h

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIII. **Porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica extraída de la semilla de Neem obtenida con isopropanol por la técnica de extracción Soxhlet**

Código	Corrida	% Rendimiento*	IR
SI 1	1	7,756	1,4460
SI 2	2	5,758	1,4580
SI 3	3	8,329	1,4660
SI 4	4	8,024	1,4670
SI 5	5	8,281	1,4665
	Promedio	7,630	1,4607
	Desviación estándar	1,071	0,0090

*Tiempo de extracción = 2,0 h

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIV. **Porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica extraída de la semilla de Neem obtenida con metanol por la técnica de extracción Soxhlet**

Código	Corrida	% Rendimiento*	IR
SM 1	1	26,299	1,3950
SM 2	2	35,712	1,3840
SM 3	3	35,788	1,3675
SM 4	4	30,597	1,3920
SM 5	5	32,447	1,3745
	Promedio	32,168	1,3826
	Desviación estándar	3,958	0,0116

*Tiempo de extracción = 3,5 h

Fuente: elaboración propia.

Tabla XV. **Perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica extraída de la semilla de Neem, utilizando cromatografía de gases *fid* (GC)**

Ácido graso	Estructura	Clasificación	IPA	metanol	hexano	Ā	S
			%	%	%	%	%
Palmítico	C 16:0	saturado	18,27	19,47	18,81	18,85	0,60
Esteárico	C 18:0	saturado	18,85	13,39	17,69	16,64	2,88
Oleico	C 18:1 ⁹	monoinsaturado	40,47	39,97	40,80	40,41	0,42
Linoléico	C 18:2 ^{9, 12}	polinsaturado	20,09	25,68	21,19	22,32	2,96
Linolénico	C 18:3 ^{9, 12, 15}	polinsaturado	1,54	1,49	1,51	1,51	0,03
Araquídico	C 20:0	saturado	0,78	0,00	0,00	0,78	---

Fuente: elaboración propia.

Tabla XVI. **Metabolitos secundarios detectados en la fracción lipídica extraída de la semilla de Neem con diferente solvente, utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS)**

Solvente	Metabolito secundario	Estructura	Tiempo de retención	Área %	Qual
isopropanol	6-acetilmorfina	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	14,44	12,33	91
metanol	Ácido Palmítico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	14,63	9,14	94
	Ácido Petrosenílico	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	15,69	25,71	93
	Ácido Esteárico	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	15,81	6,85	87
	2-metoxi-3,8-dioxocefalotax-1-ene	C ₁₈ H ₁₇ NO ₅	14,45	2,61	93
hexano	Diociltalato (di-2-etilhexiltalato)	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	19,58	96,2	72

Fuente: elaboración propia.

Tabla XVII. **Presencia de metabolitos secundarios, tamizaje fitoquímico**

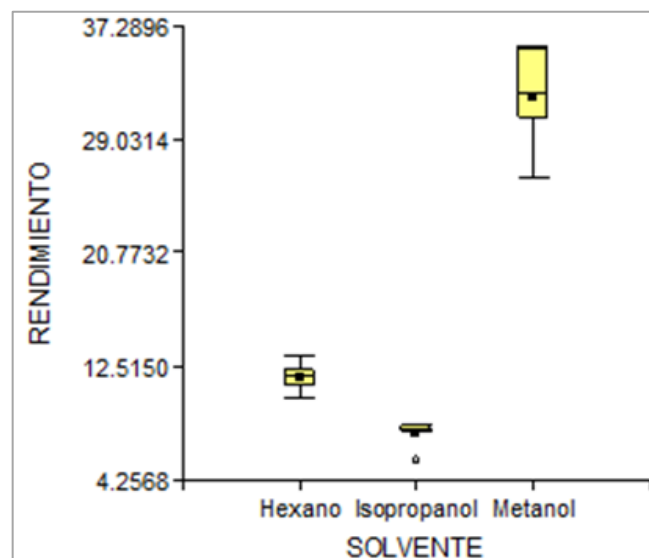
Metabolito secundario	Solvente		
	hexano	isopropanol	metanol
Taninos			
Flavonoides y Antocianinas		+	+
Esteroides Triterpenoides			
Sesquiterpenlactonas	+	+	+

Fuente: elaboración propia.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos del porcentaje de rendimiento y el índice de refracción de cada extracto obtenido con los diferentes solventes, se estudiaron por medio de un análisis estadístico de varianza, el cual evalúa la existencia de una diferencia significativa entre los datos. Por otro lado también se realizó una comparación de las medias mediante la prueba de Tuckey y finalmente el análisis total se confirmó por medio de la determinación de la validez estadística con diagramas de Schewart.

Figura 23. **Distribución de los resultados experimentales del porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica de Neem en función del solvente utilizado en la extracción**



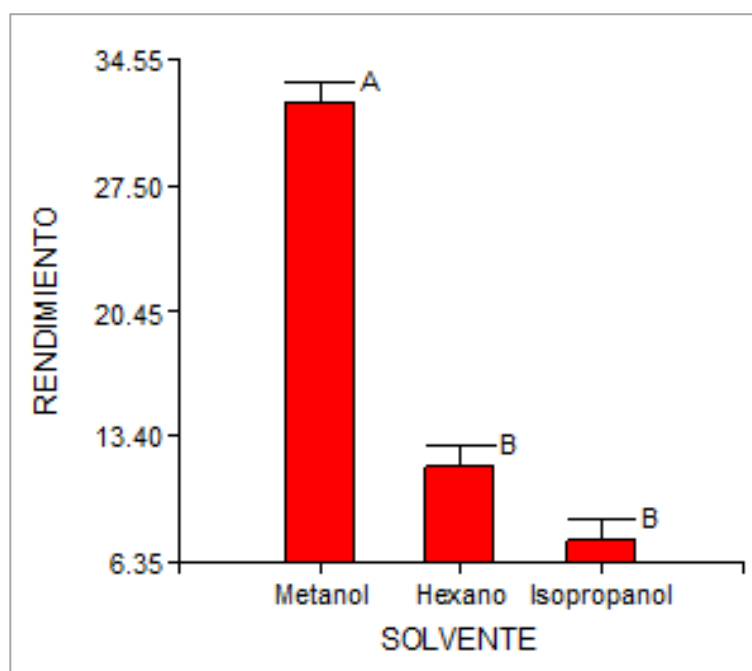
Fuente: elaboración propia.

Tabla XVIII. **Análisis de varianza para el porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica de la semilla de Neem**

FV	gl	SC	CM	F	p-valor
Solvente	2	1 727,63	863,82	142,57	<0,0001
Error	12	72,71	6,06		
Total	14	1800,34			

Fuente: elaboración propia.

Figura 24. **Comparación de la media del porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica de la semilla de Neem en función del solvente utilizado en la extracción**



Fuente: elaboración propia.

Tabla XIX. **Comparación de la media HDS de Tuckey (porcentaje de rendimiento)**

Solvente	Media	n	Letra	
metanol	32,17	5	A	
hexano	11,73	5		B
isopropanol	7,63	5		B

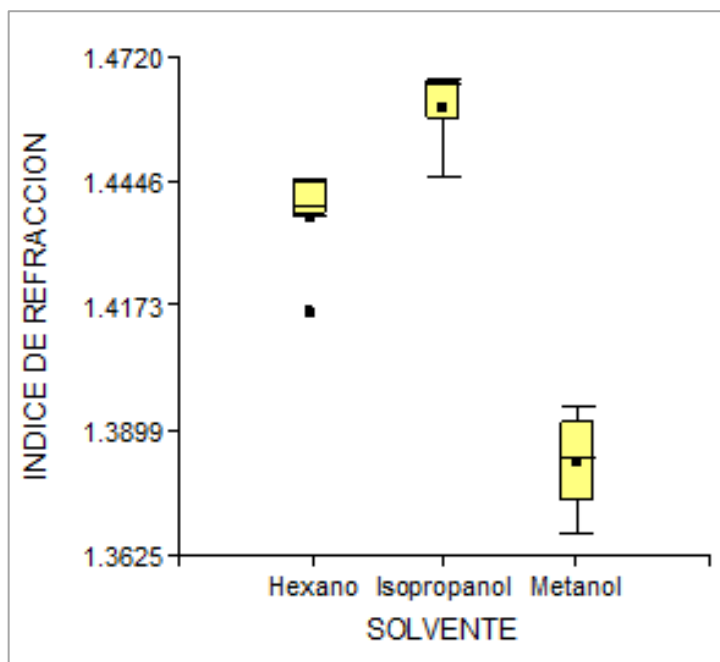
Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

$\alpha = 0,05$ DMS = 4,15331

Error: 6,0588 gl = 12

Fuente: elaboración propia.

Figura 25. **Distribución de los resultados experimentales del índice de refracción de la fracción lipídica de la semilla de Neem en función del solvente utilizado en la extracción**



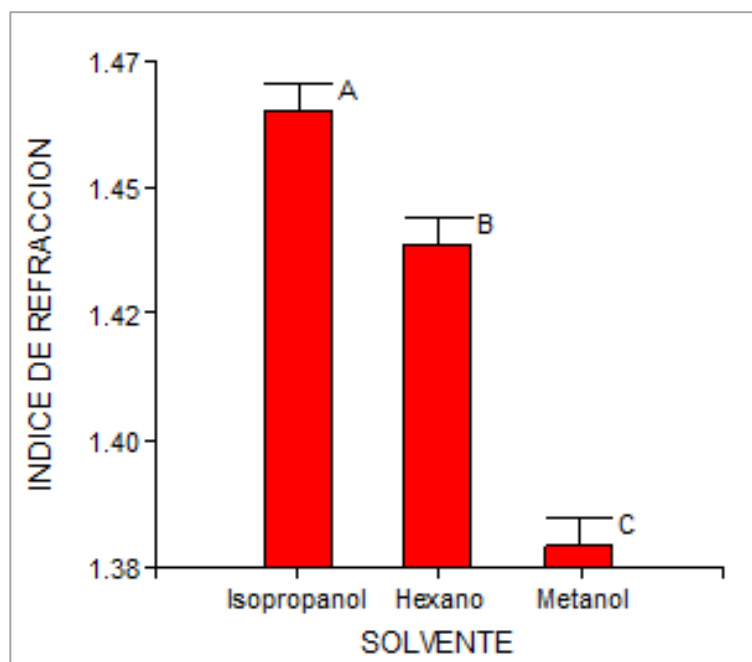
Fuente: elaboración propia.

Tabla XX. **Análisis de varianza para el índice de refracción de la fracción lipídica de la semilla de Neem**

FV	gl	SC	CM	F	p-valor
Solvente	2	0,0200	0,0100	66,42	<0,0001
Error	12	0,0014	0,0012		
Total	14	0,0200			

Fuente: elaboración propia.

Figura 26. **Comparación de la media del índice de refracción de la fracción lipídica de la semilla de Neem en función del solvente utilizado en la extracción**



Fuente: elaboración propia.

Tabla XXI. **Comparación de la media HDS de Tuckey (índice de refracción)**

Solvente	Medias	n	Letra		
isopropanol	1,46	5	A		
hexano	1,44	5		B	
metanol	1,38	5			C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

$\alpha = 0,05$ DMS = 0,01852

Error: 0,0001 gl = 12

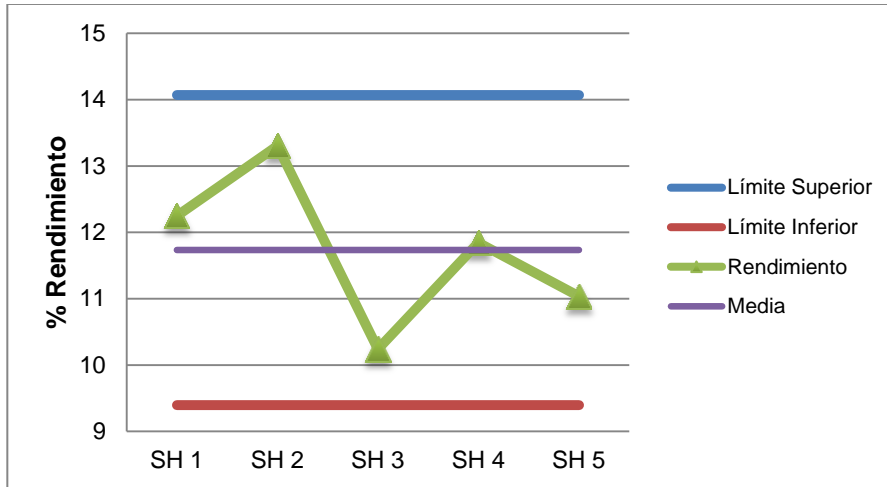
Fuente: elaboración propia.

Tabla XXII. **Límites de confianza al 95% de la variable dependiente: Rendimiento**

Solvente	Límite de confianza al 95%	
	Inferior	Superior
hexano	6,42	17,04
isopropanol	2,32	12,94
metanol	26,86	37,48

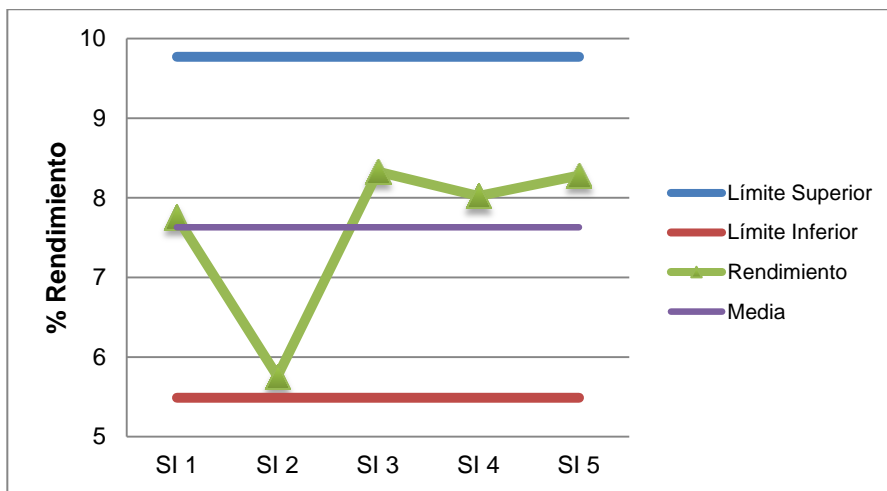
Fuente: elaboración propia.

Figura 27. **Diagrama de los rendimientos obtenidos con el equipo Soxhlet utilizando hexano con una confianza de 95%**



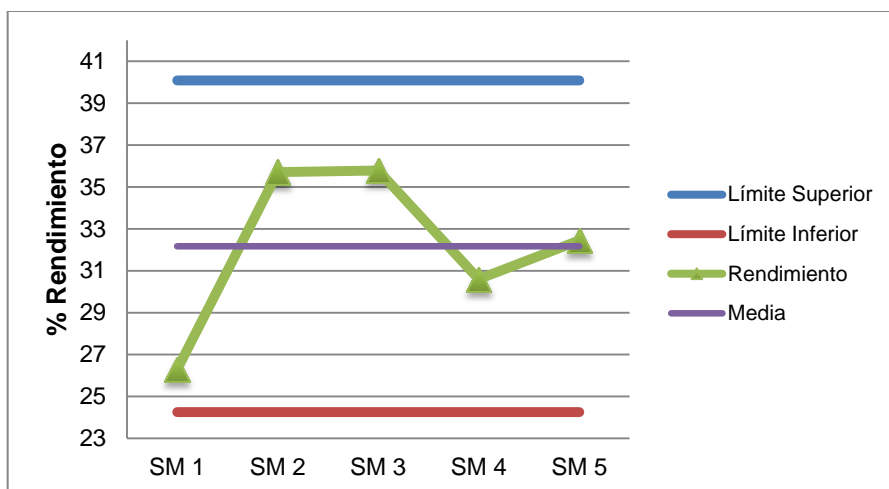
Fuente: elaboración propia.

Figura 28. **Diagrama de rendimientos obtenidos con el equipo Soxhlet utilizando isopropanol con una confianza de 95%**



Fuente: elaboración propia.

Figura 29. **Diagrama de los rendimientos obtenidos con el equipo Soxhlet utilizando metanol con una confianza de 95%**



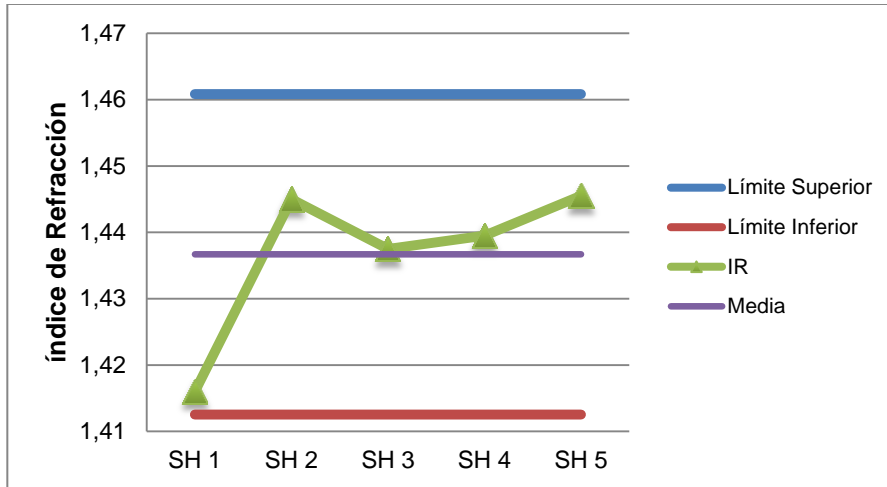
Fuente: elaboración propia.

Tabla XXIII. **Límites de confianza al 95% de la variable dependiente: Índice de refracción**

Solvente	Límite de confianza al 95%	
	Inferior	Superior
hexano	1,436595	1,436805
isopropanol	1,460595	1,460805
metanol	1,382495	1,382705

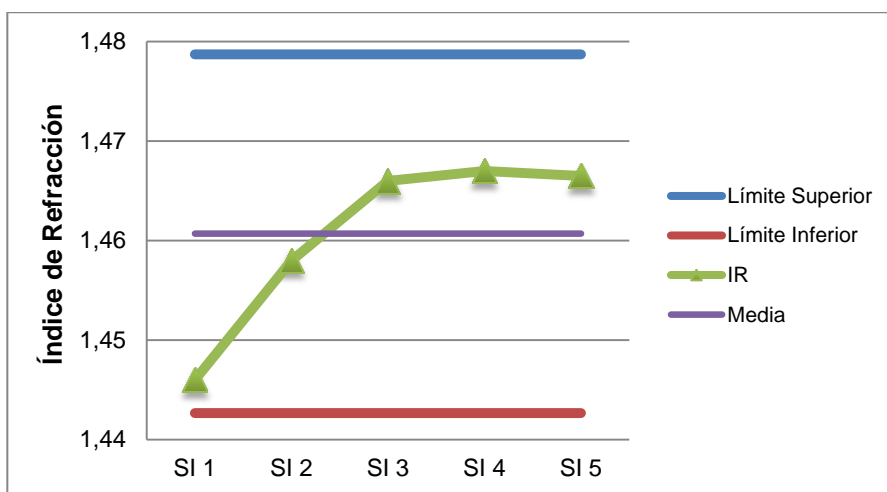
Fuente: elaboración propia.

Figura 30. **Diagrama de los índices de refracción de la fracción lipídica obtenida con hexano, con una confianza de 95%**



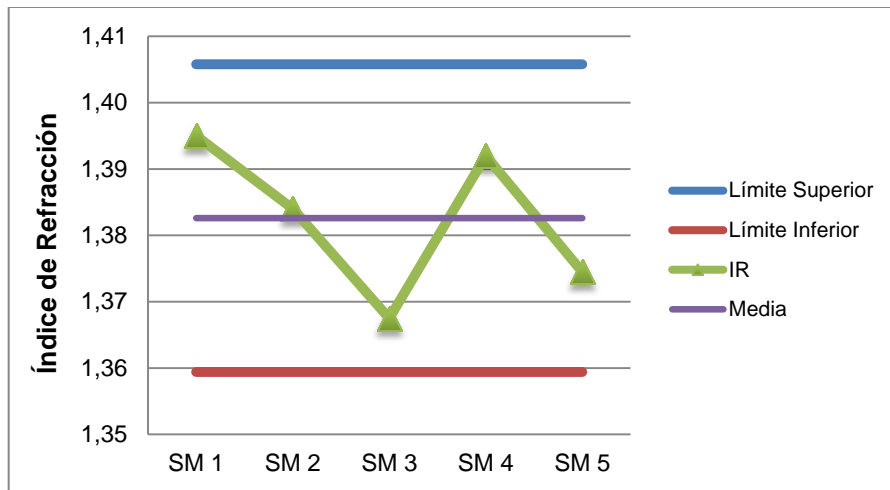
Fuente: elaboración propia.

Figura 31. **Diagrama de los índices de refracción de la fracción lipídica obtenida con isopropanol, con una confianza de 95%**



Fuente: elaboración propia.

Figura 32. **Diagrama de los índices de refracción de la fracción lipídica obtenida con metanol, con una confianza de 95%**



Fuente: elaboración propia.

6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo de graduación se llevó a cabo una separación sólido-líquido con la finalidad de obtener la fracción lipídica extractable de la semilla de Neem, evaluando los posibles efectos del solvente en la extracción.

Se utilizaron tres diferentes solventes: hexano al 99,9% v/v, alcohol isopropílico al 99,97% v/v y alcohol metílico al 99,8% v/v. La materia prima fue recolectada en un bosque silvestre de carácter privado en la aldea Mayuelas, Gualán del departamento de Zacapa, Guatemala.

Las semillas de Neem se obtuvieron al despulpar el fruto de este árbol. Una vez secas y descascaradas, se procedió a comprobar que la humedad de las mismas se encontrara en el rango especificado (menor al 10% w/w). Las semillas ya secas fueron sometidas a un proceso de molienda en un molino de cuchillas escala laboratorio, para luego ser tamizadas hasta obtener partículas en un intervalo de 841 y 1190 micrones, lo cual permitió que el contacto con el solvente optimizara la extracción.

Previo a la molienda de la semilla, se realizó la caracterización proximal de la misma. Las características dimensionales de la semilla y la almendra se muestran en la tabla XI, donde se observa que aproximadamente el 70 por ciento de la masa de la semilla, corresponde a la almendra; la proporción largo ancho de la semilla es de 2,04 (1,37 cm / 0,67 cm).

En la tabla X se reporta la composición proximal de la semilla de Neem. Uno de los principales componentes de la almendra es el extracto etéreo (37,66%), lo cual muestra que la almendra contiene una alta concentración de lípidos y puede ser una potencial fuente de biomasa como recurso energético o como materia prima para biocombustibles.

Este porcentaje de extracto etéreo contenido en la almendra de la semilla de Neem se determinó con extracción inmersión-percolación utilizando como solvente bencina de petróleo, el cual es un solvente selectivo para la extracción de grasas específicamente. Las condiciones bajo las cuales se realizó esta extracción fueron las siguientes: 2 gramos de muestra con tamaño de partícula de 1000 micrones, la cual se dejó en inmersión con el solvente durante 1 hora a 100°C (punto de ebullición de la bencina de petróleo) y luego 30 minutos en lavado.

El resultado final fue el porcentaje de rendimiento o extracto etéreo reportado, el cual para fines de esta investigación dio la pauta para llevar a cabo el presente estudio y así poder evaluar el porcentaje de rendimiento con otros solventes selectivos, aunque el método utilizado es parecido, el tiempo y la temperatura de extracción varía, así como el proceso, pues en el caso presente no se realiza la inmersión previa, solamente la percolación por lixiviación, utilizando únicamente la técnica de extracción Soxhlet.

Por otro lado, también se observa en el análisis proximal realizado que la almendra posee un alto porcentaje de proteína cruda (39,54%) y fibra cruda (16,97%) lo cual indica que tiene potencial para ser utilizada como producto nutritivo.

En contraste con otras investigaciones se encuentra que los niveles de extracto etéreo y proteína cruda son muy superiores en comparación con los datos reportados por Romero C. y Vargas M. en Venezuela (2005) y los de Oñate L. y Quintero L. en Colombia (2008), lo que se atribuye a factores relacionados con las condiciones del bosque estudiado (clima suelo, hidrografía, etcétera) de la región de Zacapa, Guatemala. La cantidad de cenizas encontrada (4,51%) indica la mineralización que contiene la semilla.

Además de la caracterización proximal de la semilla, también se le realizó un estudio histológico con el fin de encontrar la ubicación de los sacos en donde se concentran los lípidos. Para lo cual se realizó un corte transversal en el cotiledón de la semilla (previamente preparada con alcohol etílico al 75% v/v y en estado de congelación) y se tiñó con Sudan IV, para poder detectar los lípidos dentro del tejido celular, ya que estos sacos normalmente son transparentes.

Se encontraron varios grupos de eliooplastos (plastidios esféricos de doble membrana especializados en el almacenamiento de aceites que se encuentran dentro de las células) los cuales se pueden observar en las figuras del apéndice 10, donde se puede ver que estos están teñidos de una coloración que va de rojo a amarillo. Por lo tanto, se determina que la semilla es una semilla oleaginoso (alta en la concentración de lípidos) y da la otra pauta para seguir con la investigación.

El porcentaje de humedad al cual se trabajó durante el desarrollo de la investigación fue de 8,5% w/w (menor del diez por ciento) para obtener una mejor condición de trabajo durante el proceso y en el almacenamiento de la semilla de Neem.

Ya teniendo la materia prima totalmente tratada se procedió a realizar el proceso extractivo de la fracción lipídica de la semilla, para el cual se estableció el método de lixiviación utilizando la técnica Soxhlet, por ser teóricamente la técnica más adecuada para este proceso extractivo.

Para definir los parámetros de control se realizaron pruebas preliminares en donde se fijó el tiempo de extracción y la relación sólido-solvente. Para determinar esta última, se realizó el aforo de la unidad extractora Soxhlet y se midió la cantidad de materia en el dedal, de aquí se estableció que la relación soluto-solvente para el sistema Soxhlet trabajado fue de 1 g: 13,33 ml.

Al analizar el comportamiento de la densidad, los sólidos disueltos totales y el índice de refracción del extracto dentro de la unidad de extracción Soxhlet (como se puede observar en las tablas del apéndice 1), se determinó que el número de ciclos óptimos para trabajar en la extracción con cada solvente se establecía cuando los parámetros analizados llegaban a la misma magnitud que el solvente en estado puro. Por lo tanto, se estableció para el hexano 8 ciclos (1,5 h), para el isopropanol 10 ciclos (2,0 h) y para el metanol 15 ciclos (3,5 h).

El período de tiempo de extracción que se utilizó para la extracción con hexano e isopropanol en comparación con el metanol se ve reflejado en el rendimiento obtenido, ya que extrajeron poco, como se puede ver en la sección de resultados, tablas XI-XIII.

El objetivo primordial de hacer un monitoreo en cada corrida durante la extracción se debe a que por medio de este se puede hacer un análisis del comportamiento de la extracción para poder determinar la calidad del método y respaldar los resultados del porcentaje del rendimiento obtenido.

Los parámetros monitoreados fueron, la densidad, el índice de refracción y los sólidos disueltos totales. Para profundizar en el monitoreo de los sólidos disueltos totales y su comportamiento durante el proceso extractivo se desarrollaron tres diferentes gráficos según el solvente utilizado, que conjuntamente son una herramienta muy útil para el fin de este estudio.

Los sólidos disueltos totales son un parámetro que da un panorama desde el punto de vista del soluto, que en este caso es la fracción lipídica de la semilla de Neem. En las figuras No. 2, 8 y 14 del apéndice 2, se puede observar el comportamiento de este parámetro durante la extracción y se pueden apreciar cuatro etapas que sobresalen a lo largo del proceso extractivo con cada solvente utilizado. Estas cuatro etapas se describen de la siguiente manera: etapa de imbibición o etapa inicial, etapa mayor extractiva o donde se realiza el trabajo extractivo efectivo y etapas residuales; las cuales se delimitan por los óvalos trazados en las gráficas.

En las figuras anteriormente mencionadas, se encuentra el desarrollo real de cada corrida a lo largo del proceso y se puede observar que inicialmente(A) se marca la etapa de imbibición en la cual el sólido se comienza a reblandecer y el solvente inicia a romper la barrera de difusión, por lo tanto, se empieza a permear dentro del sólido y rápidamente alcanza la difusión máxima, a la que se puede llamar etapa mayor extractiva (B), en la cual el sólido ha sido totalmente mojado y ha cedido ante el solvente selectivo la mayor cantidad de fracción lipídica extractable.

Poco a poco se va viendo que el sólido se va agotando, sin embargo, la extracción sigue en la etapa que llamo, primera etapa residual (C), en la cual todavía existen fluctuaciones pero cada vez en menor cantidad hasta llegar a la etapa residual final (D) en donde la extracción va declinando de una forma fluctuante pero definitiva hasta llegar al agotamiento total del sólido. Las etapas A, B, C y D mencionadas anteriormente se pueden apreciar de mejor manera en las gráficas del promedio del monitoreo de los sólidos disueltos (figuras 4, 10 y 16 del apéndice 2), ya que las etapas se marcan de mejor manera por ser valores promedio de las corridas.

Sin embargo, esto también se puede apreciar en los gráficos de acumulación, en donde la acumulación en las tres figuras (5, 11 y 17 del Apéndice 2) va en un ascenso rápido en las primeras corridas, donde la pendiente es bastante inclinada y conforme la extracción se desarrolla, la pendiente de cada tramo tiende a cero, lo cual determina que el sistema va encontrando su etapa final y la acumulación máxima de sólidos disueltos totales se ve reflejada en el agotamiento del sólido.

Al comparar los tiempos de extracción entre los solventes se puede observar que en todas las gráficas de sólidos disueltos totales, anteriormente mencionadas, el hexano y el metanol comenzaron la etapa de imbibición en la primera media hora mientras que el isopropanol hasta la segunda media hora. Pero esta segunda media hora es crítica tanto para el isopropanol como para el hexano y el metanol debido a que aquí se marcan los picos más altos de la extracción es decir, el trabajo máximo efectivo del proceso.

Si bien es cierto, que la primera hora de extracción para todos los solventes es la más eficiente y por lo tanto, crítica, lo cual no significa que la extracción esté por terminar para todos los solventes, claro ejemplo de ello es la extracción con metanol, solvente que más ha extraído en este tiempo y que aún le queda por extraer, al contrario con el hexano, que ya en la primera hora la extracción se está estabilizando y la tendencia es casi cero sólidos disueltos. Datos que se ven reflejados en el rendimiento de cada solvente.

En cuestiones del tiempo de extracción, cabe mencionar también que, para los tres solventes utilizados, se determinaron diferentes tiempos de extracción y que no con todas las corridas se llegó al agotamiento total por las variaciones de temperatura en los diversos ciclos, por lo que a través de una tendencia polinomial de grado dos se llegó a obtener el número de ciclos óptimos que en este caso para el metanol fue de 18,5 ciclos, con el isopropanol fue de 10,4 ciclos y con el hexano de 8,6 ciclos. Que corresponden aproximadamente a 1,5 h, 2,0 h y 3,5 h respectivamente, tiempos que se utilizaron durante la experimentación.

Entonces queda claro que el monitoreo de los sólidos disueltos totales determina la cantidad de sólido extraído de la semilla y al ver la evolución de la cantidad de sólidos disueltos durante el proceso de extracción, se puede observar que son similares a las del monitoreo de la densidad. Sin embargo, aquí se marca la heterogeneidad de la muestra, por medio de la barrera inicial que se observa en todas las gráficas, pero conforme va evolucionando se va homogenizando la extracción y la tendencia va siendo similar entre todas las corridas.

Desde el punto de vista del solvente, la densidad es un parámetro con el cual se trabajó y esta es el reflejo del trabajo extractivo del solvente. La densidad del solvente para un valor promedio es la concentración de la solución que se adquiere en el primer ciclo porque refiere masa del sólido y solvente por volumen de solución. En la segunda etapa se alcanzan las mayores concentraciones de sólido en la solución, sin embargo, conforme el proceso evoluciona el procedimiento Soxhlet va drenando y renueva constantemente el solvente, entonces gradualmente va decayendo la concentración de sólidos en la solución y la densidad va disminuyendo en valor, hasta llegar a valores de la densidad inicial del solvente en estado puro.

Analizando detenidamente el monitoreo de la densidad en la extracción con hexano (apéndice 2) se puede observar que inicialmente existe una barrera. Esta resistencia a la difusión se puede determinar en el primer ciclo ya que en lo que a densidad se refiere, el solvente no aumenta mucho su densidad respecto a la inicial y por lo tanto, se concluye que en este ciclo la extracción de fracción lipídica es baja y al mismo tiempo se deduce que esta es la parte de imbibición, en la cual el solvente comienza a permear el tejido vegetal pero no del todo. Aquí la densidad del solvente aumenta porque cada vez hay más sólidos disueltos en él.

Conforme avanza la extracción ya totalmente mojado el material con el solvente, en el segundo ciclo se hace efectivo, porque aquí en esta imbibición existe una difusión del solvente principalmente y reblandece el tejido de la semilla, es a partir de este ciclo en donde se comienzan a drenar estos solutos solubles (fracción lipídica) y la densidad del solvente aumenta de manera significativa, lo cual se observa en la gráfica.

En el tercer ciclo se nota que sigue extrayendo pero en menor cantidad debido a que conforme la extracción va evolucionando, el sólido se va agotando. Luego el solvente vuelve a reblandecer el material, lo cual da pauta para extraer un poco más de soluto soluble, en unos casos entre el quinto ciclo y otros en sexto ciclo y comienza a declinar otra vez y de ahí vuelve a encontrar tejido donde vuelve a extraer pero cada vez las cantidades son menores hasta llegar a un punto en donde la densidad del solvente vuelve ser la misma con la que se inició el proceso y se da por terminado el proceso de extracción.

En el monitoreo de la densidad con isopropanol y metanol, la tendencia a extraer es parecida a la del hexano, el principio es el mismo sin embargo, con isopropanol las etapas de extracción son más pulsadas y van declinando más suavemente que con el hexano. Ahora con el metanol existe siempre una extracción máxima bien marcada que se da principalmente en el ciclo dos, pero, la tendencia declinante en algún momento se vuelve constante entre los ciclos del 8 al 15, hasta llegar a un agotamiento.

Este parámetro refleja el agotamiento debido a que cada vez el solvente extractivo disminuye su efecto en el incremento de su densidad, al igual que el índice de refracción.

Los resultados de la extracción de la fracción lipídica por el método de lixiviación Soxhlet, para los distintos solventes orgánicos utilizados se muestran en las tablas XII-XIV. El porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica de Neem sigue un orden decreciente: metanol ($32,17\% \pm 3,958$), hexano ($11,73\% \pm 1,168$) e isopropanol ($7,63\% \pm 1,071$). En estos resultados se puede observar la selectividad de los solventes.

En el apéndice 4, se ve que el porcentaje de rendimiento obtenido para el hexano e isopropanol no es directamente proporcional al compararlo con la constante dieléctrica de cada solvente. Sin embargo, por medio del análisis estadístico, que se describe a continuación, se determinó que los rendimientos obtenidos con estos no son significativos, por lo tanto, para solventes con constantes dieléctricas bajas no existe variación significativa.

Según el método propuesto, se realizaron cinco extracciones para cada una de las variaciones indicadas, lo que da 15 extracciones diferentes. Estadísticamente se evaluó si existe diferencia significativa en el rendimiento de cada uno de los métodos, por medio de un análisis de varianza (ANDEVA o ANOVA).

De este análisis se puede observar claramente que la media de los cuadrados entre tratamientos (863,82) es mucho mayor que la media de cuadrados dentro de los tratamientos (6,06), lo que indica que es improbable que las medias de tratamientos sean iguales, por tal razón al calcular F_o y compararla con las F de tabla, esto es $142,57 > 0,0001$ al 5%, lo que hace concluir que existen diferencias significativas entre las medias de las variables al 95% de confiabilidad.

Para determinar exactamente cuál de ellas es diferente, se realizó una comparación entre las medias de los tratamientos por el método HDS de Tuckey, ya que es una prueba muy eficiente para detectar diferencias significativas en las medias. Según la prueba de Tukey el resultado obtenido para el metanol-hexano > 0 y para el metanol-isopropanol > 0 , lo cual indica que si existe una diferencia significativa entre ellos, sin embargo, dice específicamente que no hay diferencia significativa entre hexano-isopropanol debido a que esta diferencia es igual a cero.

Este análisis se puede confirmar por medio de la determinación de la validez estadística de los datos obtenidos por medio de los diagramas de Schewart, que se pueden observar en las figuras de 27 a la 29, las cuales demuestran la confiabilidad estadística de los datos al 95%.

Para los tres niveles de confianza se observa que el intervalo para el rendimiento obtenido con hexano se traslapa con el de isopropanol lo que significa que entre ellos las diferencias no son significativas, que es lo mismo que se obtuvo con el ANDEVA y la prueba de Tukey. Mientras que los intervalos de confianza para el metanol no se traslapan con ninguna y son los mayores, esto quiere decir, que el rendimiento será significativamente mayor con este solvente en comparación con los otros dos.

Para la caracterización física del extracto, se realizaron mediciones del índice de refracción, los cuales se ordenan decrecientemente según el solvente utilizado en la extracción: isopropanol (1,4607 con una $S=0,0090$), hexano (1,4367 con una $S=0,0121$), metanol (1,3826 con una $S=0,0116$).

Al igual que con el porcentaje de rendimiento, se realizó un análisis estadístico ANDEVA y la prueba de Tukey con una confiabilidad del 95%, las cuales aseguran que existe una diferencia significativa entre isopropanol-metanol-hexano, y que isopropanol>hexano>metanol. Estas pruebas se confirman con los diagramas de Schewart que se observan en las figuras 30 – 32, las cuales muestran que para los tres niveles de confianza los intervalos para el índice de refracción obtenido con los tres solventes, no se traslapan en ningún caso, que significa que entre ellos las diferencias son significativas.

En el caso de la medición de la densidad según la metodología, no se pudo realizar debido a que el extracto que se obtuvo era de carácter homogéneo.

A la par del análisis estadístico de los rendimientos obtenidos se llevó a cabo la evaluación fitoquímica, la cual se efectuó mediante tamizaje preliminar, y luego pruebas más específicas mediante cromatografía en capa fina con el objetivo de determinar la presencia de ciertas familias de metabolitos. También se analizó si el tipo de metabolitos varía según el solvente utilizado para su extracción.

Según la bibliografía consultada los metabolito presentes en la fracción lipídica de Neem son: taninos (compuestos polifenólicos no nitrogenados muy astringentes), flavonoides (pigmentos vegetales no nitrogenados), antocianinas (flavonoides de color azulado, rojo oscuro o morado), esteroides, triterpenoides y sesquiterpenlactonas (esteres cíclicos que se describen como una clase de sesquiterpenoides, terpenoides C:15, con un anillo lactónico).

A partir de lo anterior, se tomaron muestras al azar que fueron analizadas por este método y cuyos resultados se encuentran en la tabla XVII. Al observar esta tabla se puede ver que en ninguno de los extractos analizados se encontró presencia de taninos así como tampoco de esteroides y triterpenoides.

Sin embargo, se evidencia en los extractos isopropanólicos y metanólicos la presencia de flavonoides (que en este caso pueden ser desde chalconas, quercitina que es un flavonol amarillo, flavonoles en general, flavonas, flavandioles) y antocianinas, lo cual era de esperarse debido a la coloración del extracto, que, en el caso del isopropanólico era de tonalidad amarilla y en el caso del metanólico era de coloración verde-amarilla y posiblemente la cantidad de flavonoides y antocianinas que se extrajo con el metanol contribuyo en general al alto porcentaje de rendimiento que se obtuvo con este ya que se podía ver una coloración bastante concentrada.

Se puede observar también en todos los extractos la presencia de sesquiterpenlactonas, las cuales dan el característico olor de la semilla. Aunque existen varios grupos clasificados de sesquiterpenlactonas, la detección aquí es general. Estos componentes le dan un potencial uso al extracto debido a que la acción biológica demostrada en la literatura ha sido analgésica, antibiótica, citotóxica, antitumoral, inhibidoras de crecimiento de bacterias, entre otras.

A continuación se realizó una cuantificación de los metabolitos ya que la prueba anterior es puramente presuntiva, por lo tanto, se utilizó el método de cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (GC-MS) cuyos resultados se muestran en la tabla XV.

De esta prueba se obtuvieron cromatogramas para cada una de las muestras seleccionadas de nuevo al azar, sin embargo, ninguno de estos cromatogramas confirma la prueba anterior, a excepción de la del metanol en la cual se encontró un sesquiterpeno en muy poca proporción, seguramente no se encontraron más metabolitos porque estos se encuentran fuera de los límites de la sensibilidad del detector de masas, que, para este caso es de 50 g/mol a 300 g/mol.

Por otro lado, se realizó un perfil de ácidos grasos en el cual se encontró que la mayor cantidad es ácido oleico (40,41%), siguiéndole el ácido linoléico (22,32%), palmítico (18,85%) y esteárico (16,64%); siendo la mayor parte insaturados. Aproximadamente el 80% de las cadenas son de 18 carbonos.

Cuando se hace una cromatografía de gases con un detector *fid*, previamente se realiza una esterificación de la muestra (específicamente del metil), es decir, se transforman los ácidos grasos en metil ésteres y entonces son estos últimos los que son inyectados en el cromatógrafo; en contraposición con la cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS), la muestra se inyecta en la forma química original extraída y es por ello, que la cuantificación de los ácidos grasos se vuelve más difícil de detectar. En el caso presente por esta razón se realizaron las dos cromatografías previamente discutidas para enriquecer la investigación.

CONCLUSIONES

1. La evaluación proximal de la almendra de la semilla proyectó como principales componentes: proteína cruda, aceite y fibra cruda.
2. El mayor rendimiento de fracción extractable se obtuvo con metanol, $32,17\% \pm 3,958$.
3. No existe diferencia significativa en los rendimientos obtenidos con isopropanol y hexano.
4. La diferencia significativa del rendimiento porcentual obtenido con los distintos solventes existe entre el metanol-hexano y metanol-isopropanol, más no entre el hexano-isopropanol.
5. Existe diferencia significativa en el índice de refracción que caracteriza cada extracto obtenido con los distintos solventes.
6. No existe relación entre el índice de refracción y el porcentaje de rendimiento.
7. El tamizaje fitoquímico confirmó la presencia de sesquiterpenlactonas en todos los extractos y la presencia de flavonoides y antocianinas en los extractos metanólicos e isopropanólicos.

8. El tamizaje fitoquímico mostro la ausencia de triterpenoides en los extractos referidos en la literatura: azadiractina, salannina, meliantriol, nimbina y nimbidina, entre otros.
9. El aceite obtenido presenta abundantes ácidos grasos insaturados (62 a 67%) y aproximadamente el 80% son cadenas de 18 carbonos. Entre ellos, la mayor proporción es de ácido oleico (monoinsaturado).
10. En la composición de ácidos grasos contenidos en las fracciones lipídicas obtenidas con metanol, isopropanol y hexano, no se encontró mayor diferencia, exceptuando la obtenida con isopropanol en donde además se obtuvo un pequeño porcentaje de ácido araquídico.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar la eficiencia de la metodología tratada en este estudio con diferentes solventes extractores.
2. Continuar con los estudios de extracción de metabolitos secundarios de la fracción lipídica de la semilla de Neem, ya que tienen propiedades insecticidas y fitoterapéuticas.
3. Estudiar las propiedades de otras partes del árbol de Neem, para enriquecer la investigación.
4. Evaluar los metabolitos que la literatura refiere para el Neem mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
5. Utilizar otros sistemas en los que la cantidad de muestra no esté en contacto con el solvente (anhídrido carbónico (CO₂) con presión) para evitar la contaminación del extracto por residuos de solvente.
6. Continuar con la búsqueda de los compuestos químicos en extractos de las semillas de árbol del Neem (*Azadirachta indica*), con el fin de potencializar el uso de este árbol en el país.
7. Utilizar un método de extracción por extrusión o prensado mecánico utilizando un prensa-tornillo (*expeller*) o una prensa-hidráulica respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANGULO, Miguel A., et al. "Contenido de azadiractina A en semillas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) colectadas en Sinaloa, México". [en línea]. *Artículo Científico: Revista Fitotecnia Mexicana*, Octubre-Diciembre 2004. vol. 27, núm. 004, p. 305-311. <<http://www.revistafitotecniamexicana.org/documento/274/2.pdf>>. [Consulta: mayo de 2010].
2. ARIAS BARRIOS, René Filberto. *Preparación y acondicionamiento de semillas oleaginosas*. En: Manual del curso de preparación y acondicionamiento de semillas oleaginosos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Centro Universitario del Sur Escuintla. Guatemala: USAC, 1997. 31 p.
3. Biblioteca Universea. *Análisis de Alimentos, fundamentos y técnicas* [en línea]. <http://dspace.universia.net/bitstream/2024/1067/1/ManualdeFundamentosyTécnicasdeAnálisisdeAlimentos_6501.pdf>. [Consulta: mayo de 2010].
4. CORTES, Ruth. *Bioquímica 109* [en línea]. <bioquimicauabc109.blogspot.com/2010_04_01_archive.html>. [Consulta: mayo de 2010].

5. CROTEAU, R., et al. "Natural products (secondary metabolites)". En: Buchanan B.; Grissem W.; Jones R. (ed). American Society of Plant Physiologists. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland: John Wiley & Sons, 2000. p. 1250-1314. ISBN: 0943088399.
6. Instituto Geográfico Nacional. *Atlas Nacional de Guatemala*. Guatemala: IGN, 1972. 52 p.
7. KOUL, O.; WAHAB, S. *Neem: today and in the new millennium* [en línea]. Estados Unidos de Norteamérica: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 1-15, 229-230. <<http://es.scribd.com/doc/6442200/NeemToday-and-in-the-New-Millennium>>. [Consulta: mayo de 2010]. ISBN: 1-4020-2596-3.
8. MACARULLA, J.M.; GOÑI, F.M. *Biomoléculas: lecciones de bioquímica estructural*. España: Reverté, 1978. 294 p. ISBN: 9788429191844.
9. MOLIST G., Pilar, et al. *Técnicas histológicas: atlas de la historia vegetal y animal* [en línea]. <<http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/1-introduccion.php>>. [Consulta: mayo de 2010].
10. National Research Council. *Neem: a tree for solving global problems: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development National Research Council*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992. 152p. ISBN 0-309-04686-6.

11. NUÑEZ, Carlos. *Extracciones con equipo Soxhlet* [en línea]. <<http://es.scribd.com/doc/51751551/Extraccion-con-equipo-Soxhlet>>. [Consulta: mayo de 2010].
12. OLAMS. *Neem fruits* [en línea]. <www.africanmarketsquare.ca>. [Consulta: febrero de 2012].
13. OÑATE, R.J.; QUINTERO, L.A. *Caracterización fisicoquímica de los extractos de la semilla del árbol de Neem (Azadirachta Indica) en el Departamento del Cesar*. Trabajo de graduación de Ing. Agroindustrial. Facultad de Ingeniería y Tecnología, Universidad Popular del Cesar. Colombia, 2008. 110 p.
14. PERRY, Robert H. *Manual del Ingeniero Químico*. 7a ed. España: McGraw- Hill, 2001. cap. 18-19. ISBN: 84-481-3008-1.
15. *Plant extracts Neem* [en línea]. <www.infonet-biovision.org>. [Consulta: febrero de 2012].
16. PURI, H.S. "Neem: the divine tree (*Azadirachta Indica*)". En: Hardman, Roland (ed). *Medicinal and Aromatic Plants*. Amsterdam, Holanda: Harwood Academic Publishers, 1999. p. 23-27, 81-82, 121. ISBN: 0203344006.

17. RAMOS, C., *et al.* "Variación en contenido de azadiractina en frutos de margosa durante su desarrollo" [en línea]. *Artículo Científico: Revista Fitotecnia Mexicana*, Septiembre 2004. vol. 27, núm. especial 1, p. 81-85. <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=61009917>>. [Consulta: mayo de 2010].
18. SANTIZO RODAS, Ivo Mahelly. *Identificación de familias de metabolitos secundarios en Myrica cerifera L.* Trabajo de graduación de Lic. Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2003. 100 p.
19. SHARAPIN, Nikolai. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos.* Colombia: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, 2000. 248 p. ISBN: 958-698-001-4.
20. SOBERANIS, Adrián Antonio. *Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la oleorresina de cardamomo (elletteria cardamomum, l. Matton) obtenida a nivel laboratorio utilizando dos métodos de lixiviación a tres diferentes temperaturas.* Trabajo de graduación de Ing. Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009. 166 p.
21. STONEY, Carol. *Azadirachta indica - Neem, a versatile tree for the tropics and subtropics: a quick guide to multipurpose trees from around the world* [en línea]. Hoja Informativa FACT 1997-05. Morrilton, Arkansas: Forest, Farm and Community Tree Network, Winrock International. Septiembre, 1997. <www.winrock.org/forestry/factnet>. [Consulta: mayo de 2010].

22. _____; HUGHES, Erin. *Use of Neem as a biological pest control agent: a quick guide to multipurpose trees from around the world* [en línea]. Hoja Informativa FACT 1998-01. Morrilton, Arkansas: Forest, Farm, and Community Tree Network, Winrock International, Enero 1998. <www.winrock.org/forestry/factnet.htm>. [Consulta: mayo de 2010].

APÉNDICES

Apéndice 1. **Pruebas preliminares**

Monitoreo de la prueba preliminar de extracción con hexano

No. ciclo	SH P		
	ρ	SDT	IR
1	0,6436	0,0050	1,3755
2	0,6495	0,0220	1,3780
3	0,6456	0,0070	1,3770
4	0,6436	0,0070	1,3760
5	0,6436	0,0050	1,3760
6	0,6417	0,0030	1,3760
7	0,6417	0,0010	1,3750
8	0,6407	0,0000	1,3750

Fuente: elaboración propia.

Monitoreo de la prueba preliminar de extracción con isopropanol

No. ciclo	SI P		
	ρ	SDT	IR
1	0,7877	0,0040	1,3785
2	0,7945	0,0190	1,3820
3	0,7926	0,0120	1,3795
4	0,7868	0,0060	1,3790
5	0,7809	0,0010	1,3785
6	0,7741	0,0010	1,3780
7	0,7760	0,0000	1,3780
8	0,7731	0,0020	1,3775
9	0,7683	0,0000	1,3775
10	0,7663	0,0000	1,3775

Fuente: elaboración propia.

Monitoreo de la prueba preliminar de extracción con metanol

No. ciclo	SM P		
	ρ	SDT	IR
1	0,7897	0,0090	1,3310
2	0,8111	0,0200	1,3425
3	0,7975	0,0180	1,3395
4	0,7907	0,0080	1,3375
5	0,7887	0,0060	1,3375
6	0,7877	0,0040	1,3360
7	0,7907	0,0040	1,3340
8	0,7838	0,0040	1,3365
9	0,7848	0,0040	1,3335
10	0,7877	0,0040	1,3330
11	0,7819	0,0050	1,3335
12	0,7887	0,0020	1,3330
13	0,7907	0,0010	1,3335
14	0,7848	0,0040	1,3335
15	0,7897	0,0030	1,3330

Fuente: elaboración propia.

Porcentaje de rendimiento e índice de refracción de las pruebas preliminares

Código	Materia prima (g)	Materia seca (g)	Fracción lipídica (g)	% Rendimiento	IR
SH P	15,0000	11,3282	2,2076	14,7173	1,4490
SI P	15,0010	11,3189	1,4935	9,9560	1,4550
SM P	15,0000	8,3582	6,3981	42,6540	1,3875

Fuente: elaboración propia.

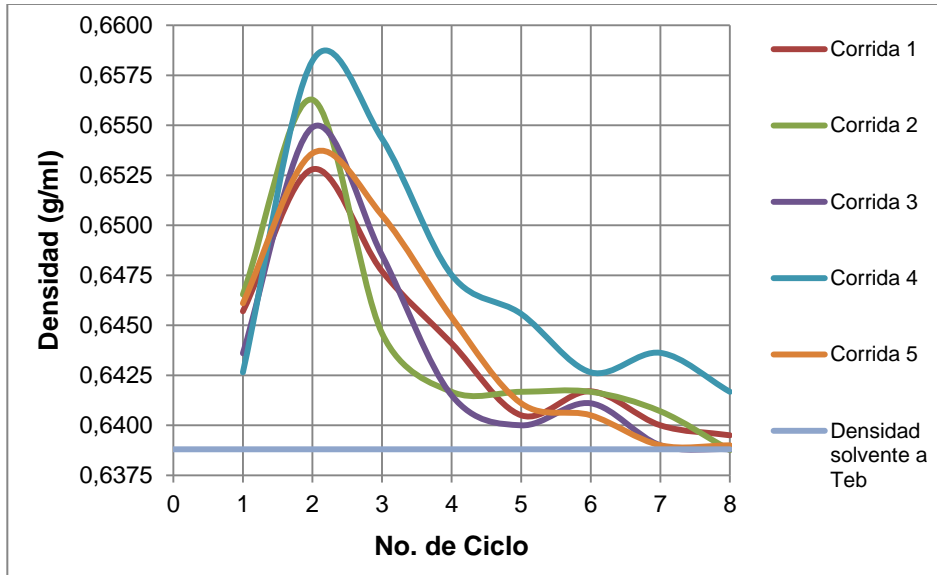
Apéndice 2. Monitoreo

Monitoreo de la densidad en cada ciclo de extracción utilizando hexano

Corrida	No. de ciclo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,6457	0,6528	0,6477	0,6441	0,6405	0,6417	0,6400	0,6395
2	0,6465	0,6563	0,6446	0,6417	0,6417	0,6417	0,6407	0,6388
3	0,6436	0,6549	0,6485	0,6415	0,6400	0,6415	0,6388	0,6388
4	0,6426	0,6582	0,6543	0,6475	0,6456	0,6426	0,6436	0,6417
5	0,6461	0,6536	0,6505	0,6454	0,6411	0,6405	0,6390	0,6390

Fuente: elaboración propia con datos de ecuación 3.

**Gráfica del monitoreo de la densidad en cada ciclo de extracción
utilizando hexano ($\rho = 0,6388 \text{ g/ml}$ a 65°C)**



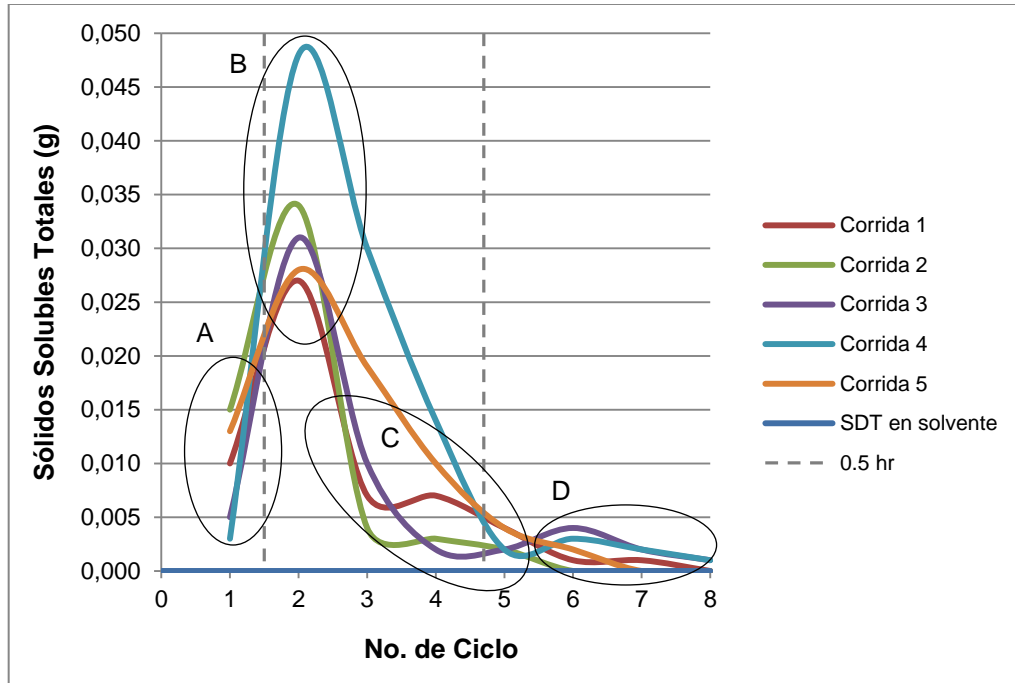
Fuente: elaboración propia.

**Monitoreo de los sólidos disueltos totales en cada ciclo de extracción
utilizando hexano**

Corrida	No. de ciclo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,010	0,027	0,007	0,007	0,004	0,001	0,001	0,000
2	0,015	0,034	0,004	0,003	0,002	0,000	0,000	0,000
3	0,005	0,031	0,010	0,002	0,002	0,004	0,002	0,001
4	0,003	0,048	0,030	0,014	0,002	0,003	0,002	0,001
5	0,013	0,028	0,019	0,010	0,004	0,002	0,000	0,000
X̄	0,009	0,034	0,014	0,007	0,003	0,002	0,001	0,000
S	0,005	0,009	0,011	0,005	0,001	0,002	0,001	0,001
ACUM	0,009	0,043	0,057	0,064	0,067	0,069	0,070	0,070

Fuente: elaboración propia.

Gráfica del monitoreo de los sólidos disueltos totales en cada ciclo de extracción utilizando hexano



Donde: A = etapa imbibición, B = etapa mayor extracción, C = etapa residual, D = etapa residual

Fuente: elaboración propia.

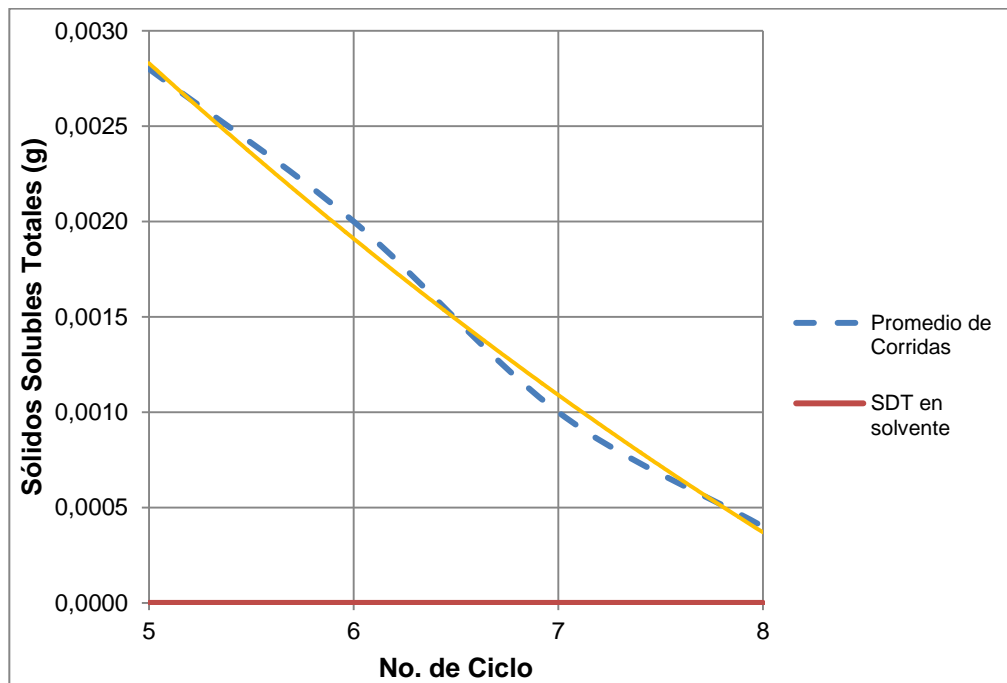
Análisis de la ecuación polinomial de la tendencia del promedio del monitoreo de los SDT en la extracción con hexano

Modelo	$y = -5E-05x^2 - 0,0015x + 0,0089$
R	0,9947
$y = 0$	
$x = 8,1443 \approx 8$	

Donde: x = No. de ciclo, y = sólidos disueltos totales

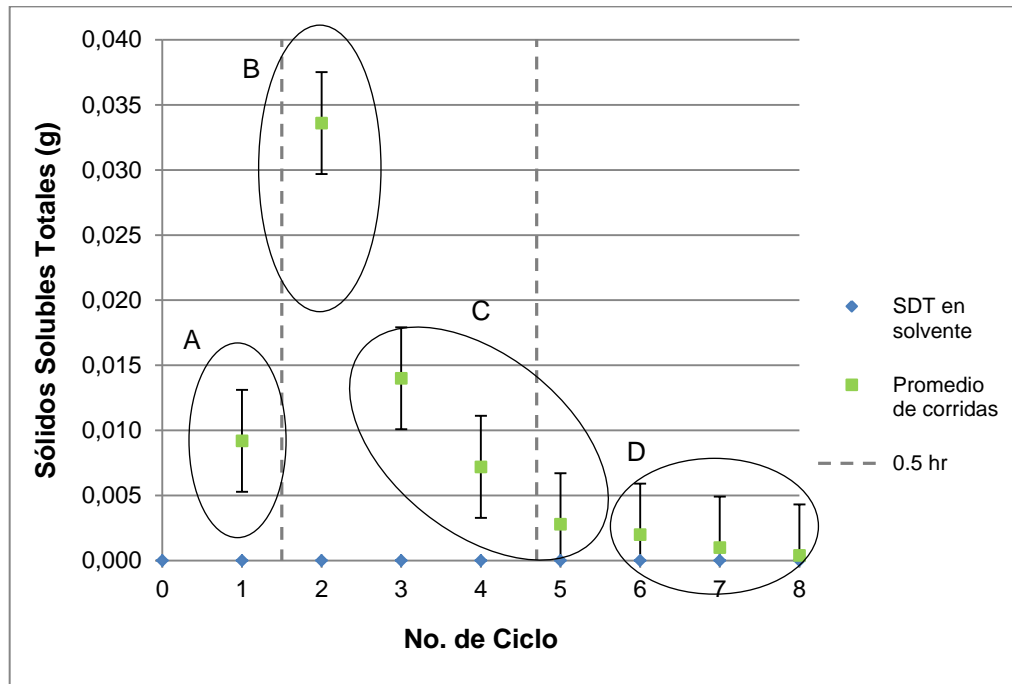
Fuente: elaboración propia.

Gráfica de la tendencia del promedio del monitoreo de los sólidos disueltos totales en la extracción con hexano



Fuente: elaboración propia.

Gráfica del promedio del monitoreo de los sólidos disueltos totales en la extracción con hexano



Donde:

A = etapa imbibición

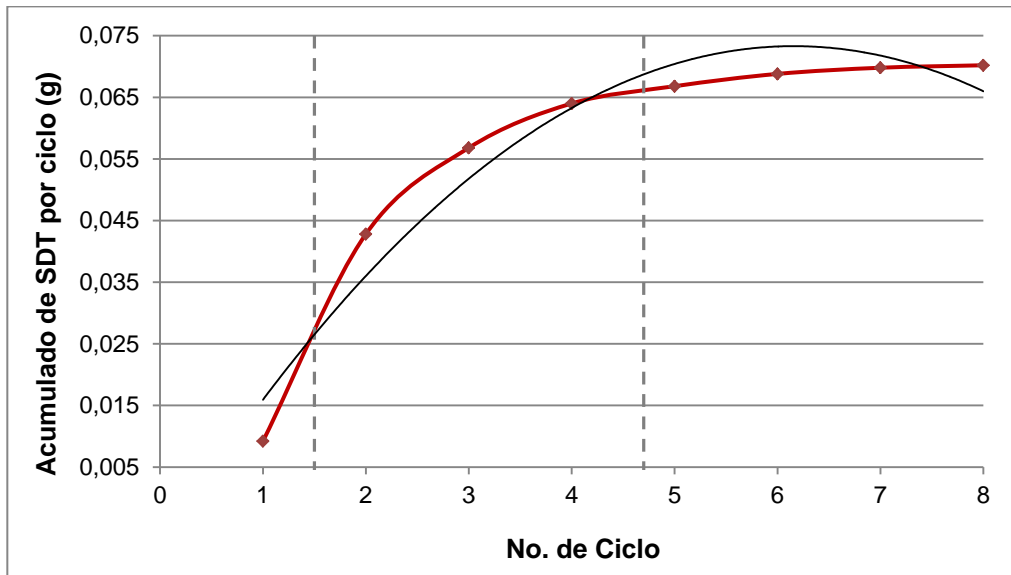
B = etapa mayor extracción

C = etapa residual

D = etapa residual

Fuente: elaboración propia.

Gráfica de la acumulación del promedio del monitoreo de los sólidos disueltos totales en la extracción con hexano



Fuente: elaboración propia.

Análisis de la ecuación polinomial de la tendencia de la acumulación del monitoreo de los SDT en la extracción con hexano

Modelo	$y = -0,0022x^2 + 0,0266x - 0,0085$
R	0,9448
<i>Derivando respecto de x</i>	
$\frac{dy}{dx} = 0,0266 - 0,0044x = 0$	
$x = 6,0454$	
<i>Sustituyendo x en modelo para obtener el valor máximo extractable de SDT (y)</i>	
y = 0,0719 g	

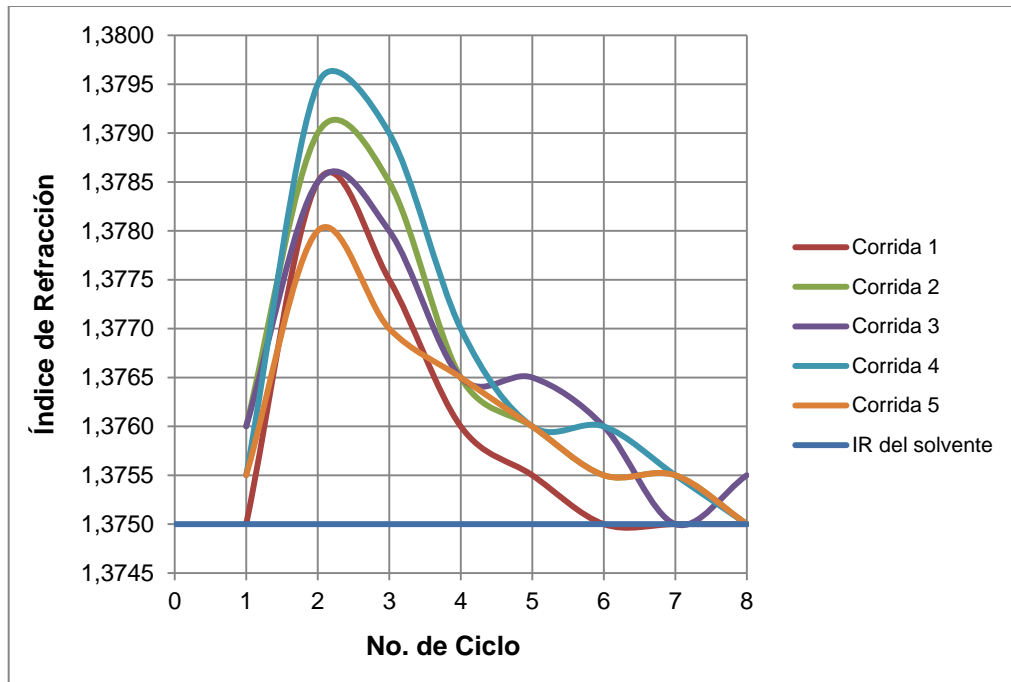
Fuente: elaboración propia.

Monitoreo del índice de refracción en cada ciclo de extracción utilizando hexano

Corrida	No. de ciclo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,3750	1,3785	1,3775	1,3760	1,3755	1,3750	1,3750	1,3750
2	1,3760	1,3790	1,3785	1,3765	1,3760	1,3755	1,3755	1,3750
3	1,3760	1,3785	1,3780	1,3765	1,3765	1,3760	1,3750	1,3755
4	1,3755	1,3795	1,3790	1,3770	1,3760	1,3760	1,3755	1,3750
5	1,3755	1,3780	1,3770	1,3765	1,3760	1,3755	1,3755	1,3750

Fuente: elaboración propia.

Gráfica del monitoreo del índice de refracción en cada ciclo de extracción utilizando hexano (IR = 1,3750 a 25°C)



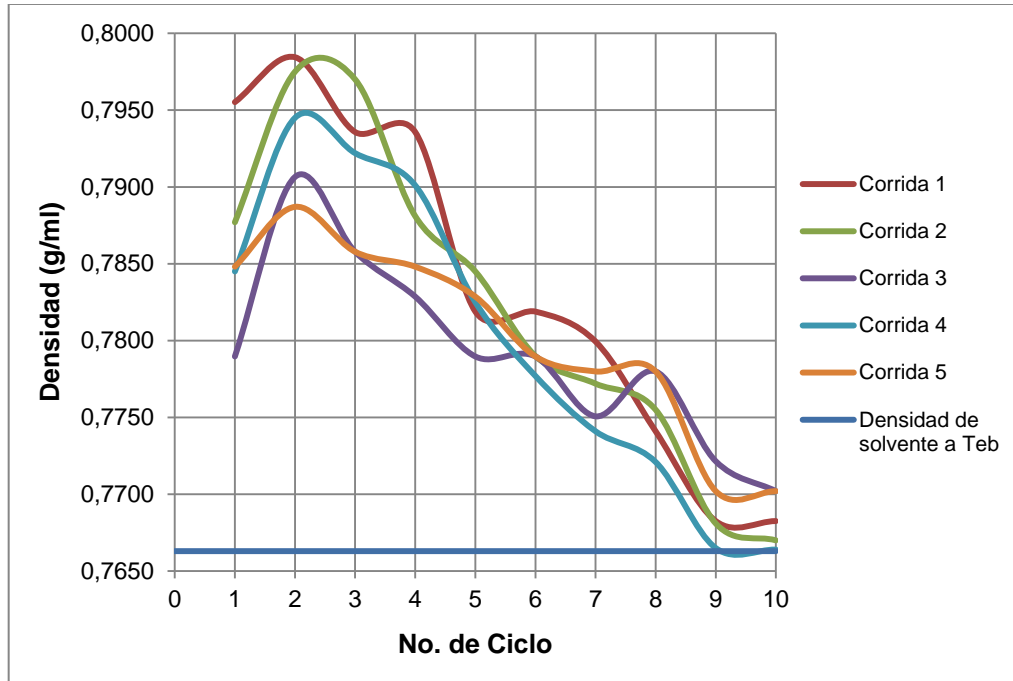
Fuente: elaboración propia.

Monitoreo de la densidad en cada ciclo de extracción utilizando isopropanol

	No. de ciclo				
Corrida	1	2	3	4	5
1	0,7955	0,7984	0,7936	0,7936	0,7819
2	0,7877	0,7975	0,7970	0,7881	0,7845
3	0,7790	0,7907	0,7858	0,7829	0,7790
4	0,7845	0,7945	0,7922	0,7901	0,7825
5	0,7848	0,7887	0,7858	0,7848	0,7829
Corrida	6	7	8	9	10
1	0,7819	0,7799	0,7741	0,7683	0,7683
2	0,7790	0,7772	0,7755	0,7681	0,7670
3	0,7790	0,7751	0,7780	0,7722	0,7702
4	0,7777	0,7741	0,7721	0,7665	0,7664
5	0,7790	0,7780	0,7780	0,7702	0,7702

Fuente: elaboración propia con datos de ecuación 3.

**Gráfica del monitoreo de la densidad en cada ciclo de extracción
utilizando isopropanol ($\rho = 0,7663 \text{ g/ml}$ a $77 \text{ }^\circ\text{C}$)**



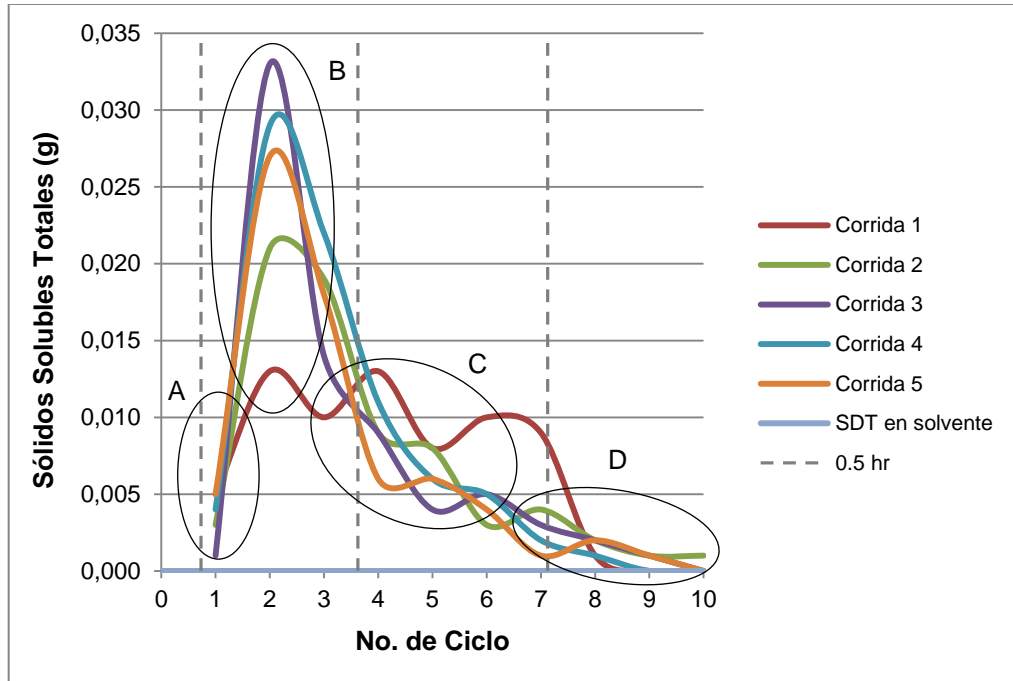
Fuente: elaboración propia.

**Monitoreo de los sólidos disueltos totales en cada ciclo de extracción
utilizando isopropanol**

Corrida	No. de ciclo									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,005	0,013	0,010	0,013	0,008	0,010	0,009	0,001	0,000	0,000
2	0,003	0,021	0,019	0,009	0,008	0,003	0,004	0,002	0,001	0,001
3	0,001	0,033	0,014	0,009	0,004	0,005	0,003	0,002	0,001	0,000
4	0,004	0,029	0,022	0,011	0,006	0,005	0,002	0,001	0,000	0,000
5	0,005	0,027	0,018	0,006	0,006	0,004	0,001	0,002	0,001	0,000
Ā	0,004	0,025	0,017	0,010	0,006	0,005	0,004	0,002	0,001	0,000
S	0,002	0,008	0,005	0,003	0,002	0,003	0,003	0,001	0,001	0,000
ACUM	0,004	0,028	0,045	0,054	0,061	0,066	0,070	0,072	0,072	0,072

Fuente: elaboración propia.

Gráfica del monitoreo de los sólidos disueltos totales en cada ciclo de extracción utilizando isopropanol



Donde: A = etapa imbibición, B = etapa mayor extracción, C = etapa residual, D = etapa residual

Fuente: elaboración propia.

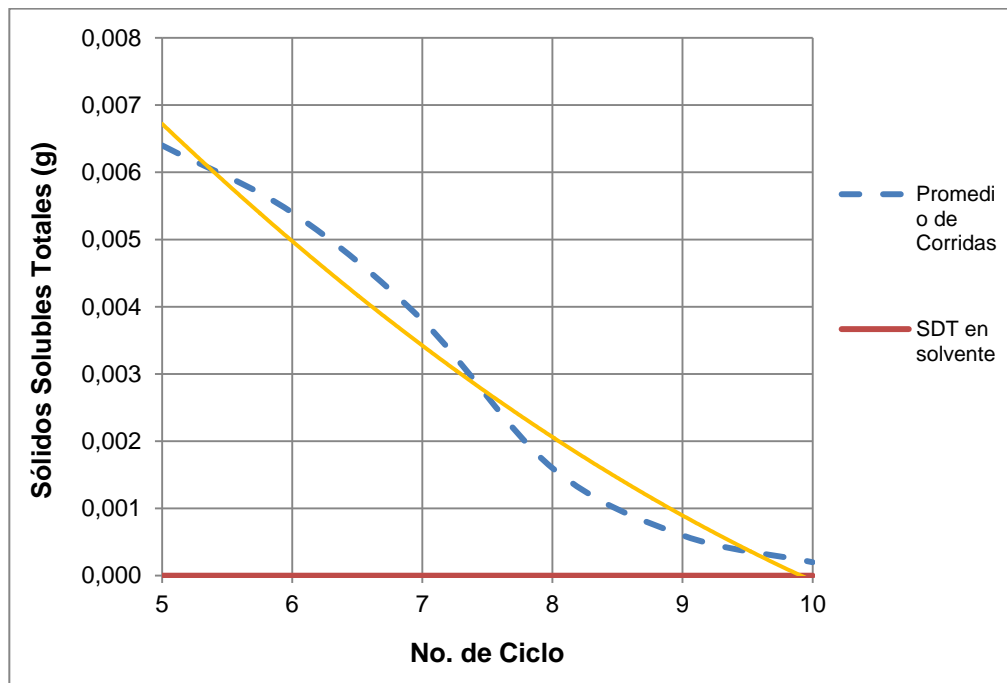
Análisis de la ecuación polinomial de la tendencia del promedio del monitoreo de los SDT en la extracción con isopropanol

Modelo	$y = 1E-4x^2 - 0,0028x + 0,0183$
R	0,976
$y = 0$	
$x = 10,3945 \approx 10$	

Donde: x = No. de ciclo, y = sólidos disueltos totales

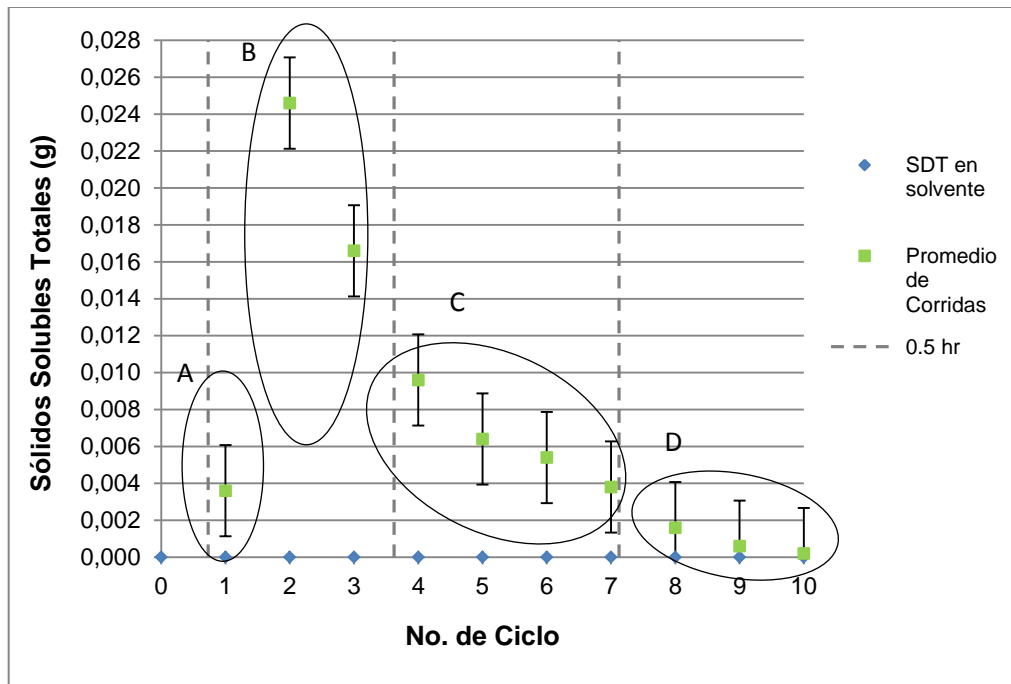
Fuente: elaboración propia.

Gráfica de la tendencia del promedio del monitoreo de los sólidos disueltos totales en la extracción con isopropanol



Fuente: elaboración propia.

Gráfica del promedio del monitoreo de los sólidos disueltos totales en la extracción con isopropanol



Dónde:

A = etapa imbibición,

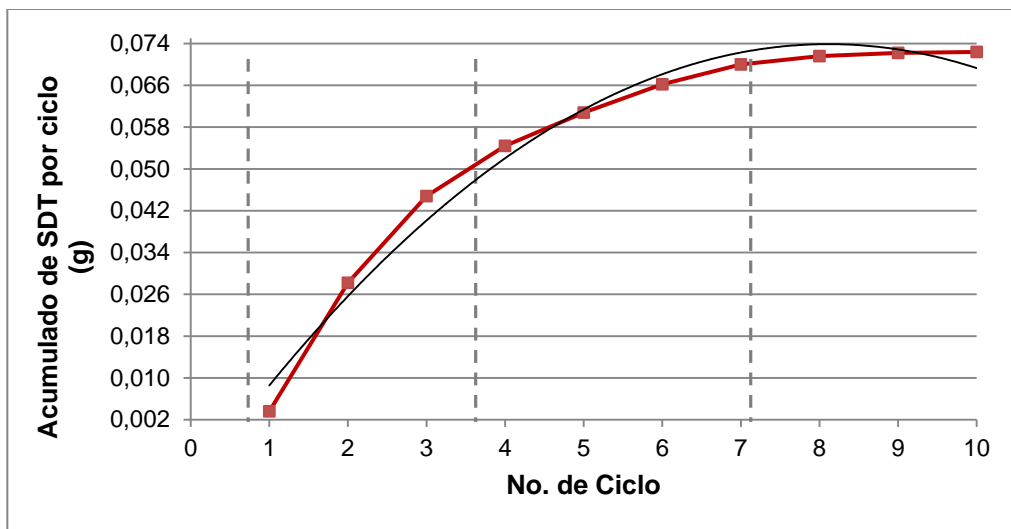
B = etapa mayor extracción,

C = etapa residual,

D = etapa residual

Fuente: elaboración propia.

Gráfica de la acumulación del promedio del monitoreo de los sólidos disueltos totales en la extracción con isopropanol



Fuente: elaboración propia.

Análisis de la ecuación polinomial de la tendencia de la acumulación del monitoreo de los SDT en la extracción con isopropanol

Modelo	$y = -0,0013x^2 + 0,0209x - 0,0111$
R	0,9824
<i>Derivando respecto de x</i>	
$\frac{dy}{dx} = 0,0209 - 0,0026x = 0$	
$x = 8,0385$	
<i>Sustituyendo x en modelo para obtener el valor máximo extractable de SDT (y)</i>	
y = 0,0729 g	

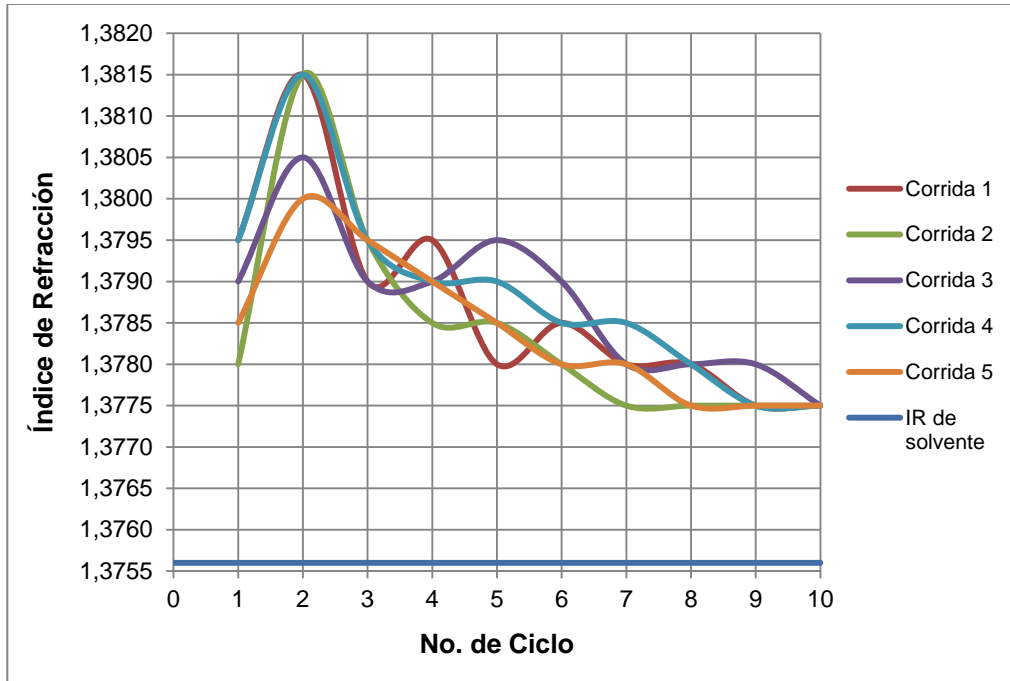
Fuente: elaboración propia.

Monitoreo del índice de refracción en cada ciclo de extracción utilizando isopropanol

	No. de ciclo				
Corrida	1	2	3	4	5
1	1,3795	1,3815	1,3790	1,3795	1,3780
2	1,3780	1,3815	1,3795	1,3785	1,3785
3	1,3790	1,3805	1,3790	1,3790	1,3795
4	1,3795	1,3815	1,3795	1,3790	1,3790
5	1,3785	1,3800	1,3795	1,3790	1,3785
Corrida	6	7	8	9	10
1	1,3785	1,3780	1,3780	1,3775	1,3775
2	1,3780	1,3775	1,3775	1,3775	1,3775
3	1,3790	1,3780	1,3780	1,3780	1,3775
4	1,3785	1,3785	1,3780	1,3775	1,3775
5	1,3780	1,3780	1,3775	1,3775	1,3775

Fuente: elaboración propia.

**Gráfica del monitoreo del índice de refracción en cada ciclo de extracción
utilizando isopropanol (IR = 1,3756 a 25 °C)**



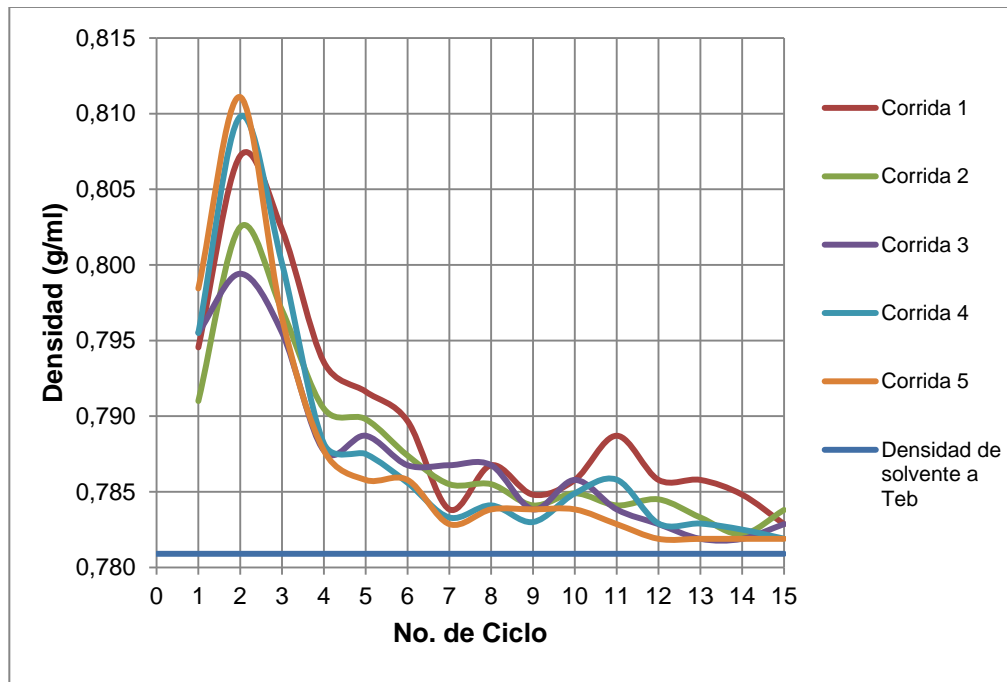
Fuente: elaboración propia.

Monitoreo de la densidad en cada ciclo de extracción utilizando metanol

	No. de ciclo							
Corrida	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,7945	0,8072	0,8023	0,7936	0,7916	0,7897	0,7838	0,7868
2	0,7910	0,8025	0,7970	0,7905	0,7898	0,7874	0,7855	0,7855
3	0,7955	0,7994	0,7955	0,7877	0,7887	0,7868	0,7868	0,7868
4	0,7955	0,8098	0,8001	0,7882	0,7875	0,7856	0,7833	0,7841
5	0,7984	0,8111	0,7965	0,7877	0,7858	0,7858	0,7829	0,7838
Corrida	9	10	11	12	13	14	15	
1	0,7848	0,7858	0,7887	0,7858	0,7858	0,7848	0,7829	
2	0,7841	0,7849	0,7841	0,7845	0,7833	0,7822	0,7838	
3	0,7838	0,7858	0,7838	0,7829	0,7819	0,7819	0,7829	
4	0,7830	0,7849	0,7858	0,7829	0,7829	0,7825	0,7819	
5	0,7838	0,7838	0,7829	0,7819	0,7819	0,7819	0,7819	

Fuente: elaboración propia con datos de ecuación 3.

**Gráfica del monitoreo de la densidad en cada ciclo de extracción
utilizando metanol ($\rho = 0,7809 \text{ g/ml}$ a $60 \text{ }^\circ\text{C}$)**



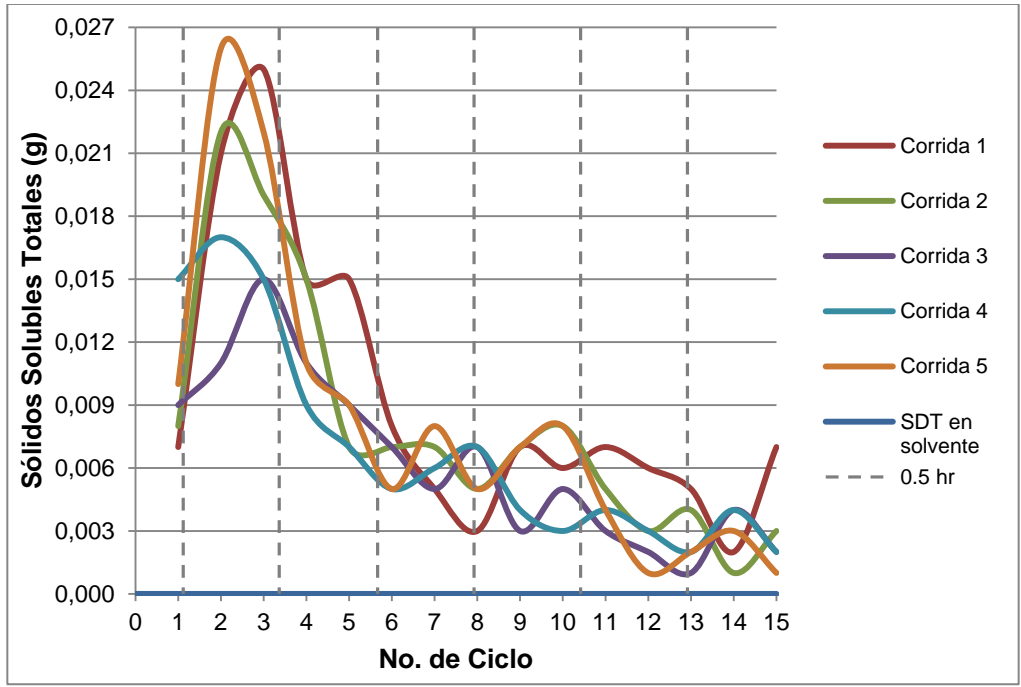
Fuente: elaboración propia.

**Monitoreo de los sólidos disueltos totales en cada ciclo de extracción
utilizando metanol**

	No. de ciclo							
Corrida	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,007	0,021	0,025	0,015	0,015	0,008	0,005	0,003
2	0,008	0,022	0,019	0,015	0,007	0,007	0,007	0,005
3	0,009	0,011	0,015	0,011	0,009	0,007	0,005	0,007
4	0,015	0,017	0,015	0,009	0,007	0,005	0,006	0,007
5	0,010	0,026	0,022	0,011	0,009	0,005	0,008	0,005
Ā	0,010	0,019	0,019	0,012	0,009	0,006	0,006	0,005
S	0,003	0,006	0,004	0,003	0,003	0,001	0,001	0,002
ACUM	0,010	0,029	0,048	0,061	0,070	0,076	0,083	0,088
Corrida	9	10	11	12	13	14	15	
1	0,007	0,006	0,007	0,006	0,005	0,002	0,007	
2	0,007	0,008	0,005	0,003	0,004	0,001	0,003	
3	0,003	0,005	0,003	0,002	0,001	0,004	0,002	
4	0,004	0,003	0,004	0,003	0,002	0,004	0,002	
5	0,007	0,008	0,004	0,001	0,002	0,003	0,001	
Ā	0,006	0,006	0,005	0,003	0,003	0,003	0,003	
S	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	
ACUM	0,094	0,100	0,104	0,107	0,110	0,113	0,116	

Fuente: elaboración propia.

Gráfica del monitoreo de los sólidos disueltos totales en cada ciclo de extracción utilizando metanol



Fuente: elaboración propia.

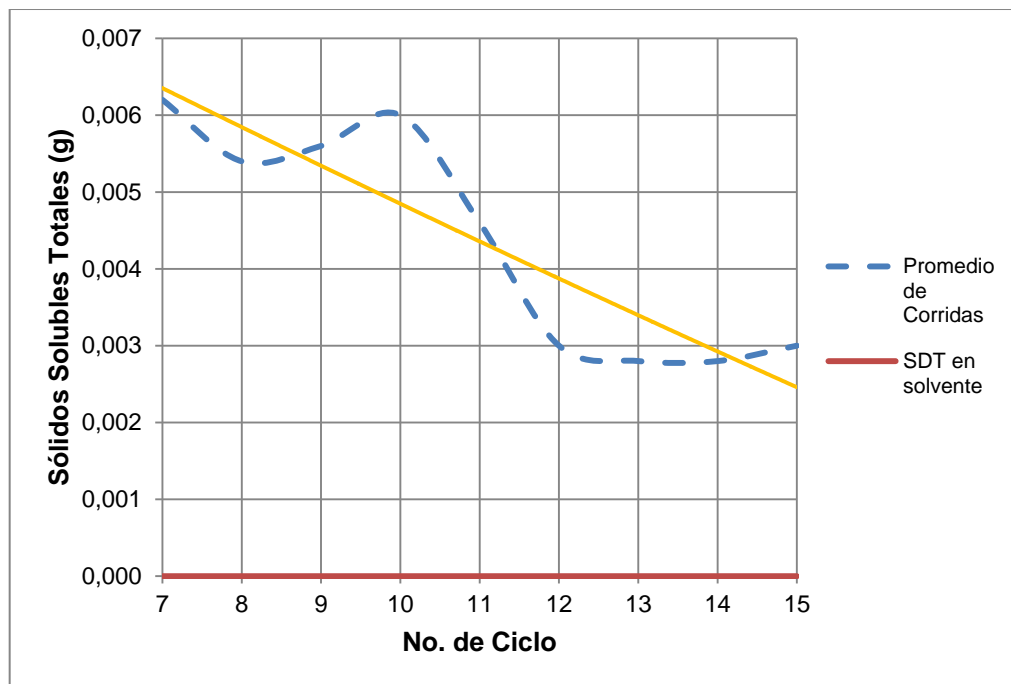
Análisis de la ecuación polinomial de la tendencia del promedio del monitoreo de los SDT en la extracción con metanol

Modelo	$y = 3E-5x^2 - 0,0006x + 0,0101$
R	0,8209
$y = 0$	
$x = 18,5547 \approx 19$	

Donde: x = No. de ciclo, y = solidos disueltos totales

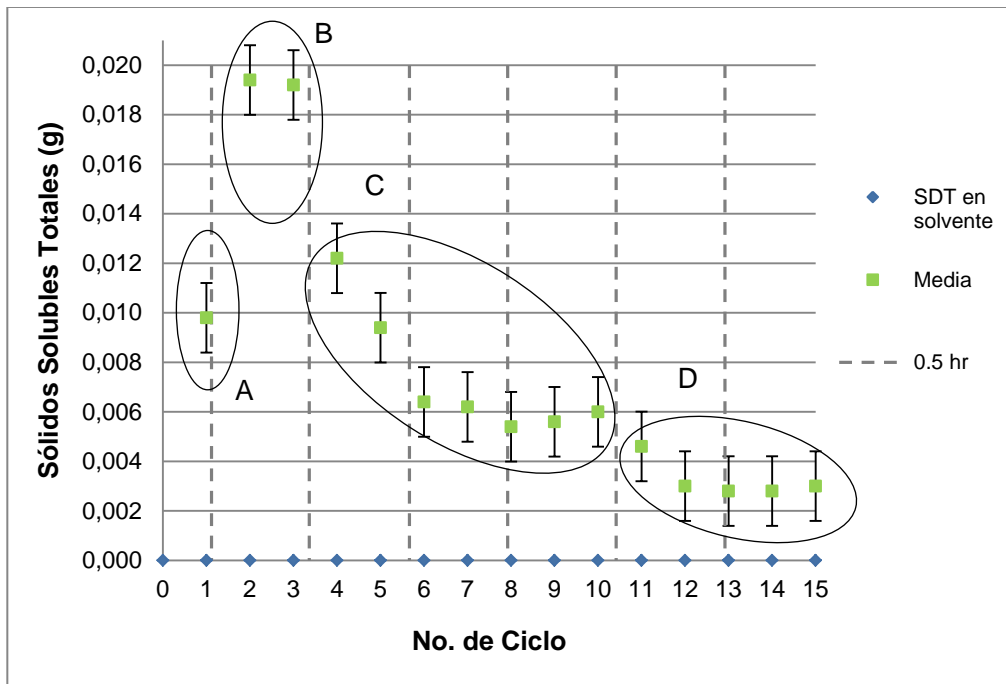
Fuente: elaboración propia.

Gráfica de la tendencia del promedio del monitoreo de los sólidos disueltos totales en la extracción con metanol



Fuente: elaboración propia.

Gráfica del promedio del monitoreo de los sólidos disueltos totales en la extracción con metanol



Donde:

A = etapa imbibición

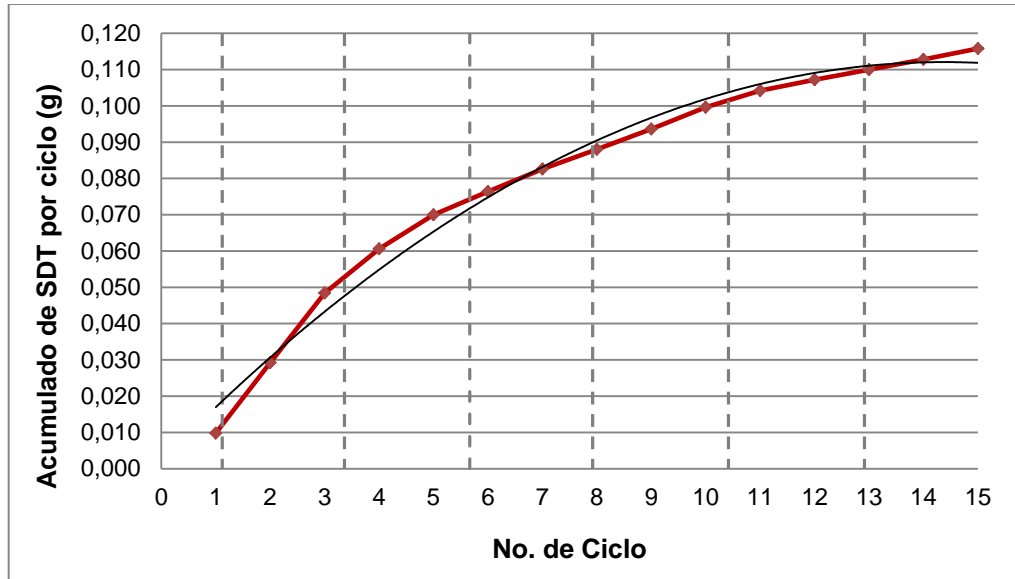
B = etapa mayor extracción

C = etapa residual

D = etapa residual

Fuente: elaboración propia.

Gráfica de la acumulación del promedio del monitoreo de los sólidos disueltos totales en la extracción con metanol



Fuente: elaboración propia.

Análisis de la ecuación polinomial de la tendencia de la acumulación del monitoreo de los SDT en la extracción con metanol

Modelo	$y = -0,0005x^2 + 0,0153x + 0,0022$
R	0,9872
<i>Derivando respecto de x</i>	
$\frac{dy}{dx} = 0,0153 - 0,001x = 0$	
$x = 15,30$	
<i>Sustituyendo x en modelo para obtener el valor máximo extractable de SDT (y)</i>	
y = 0,1192 g	

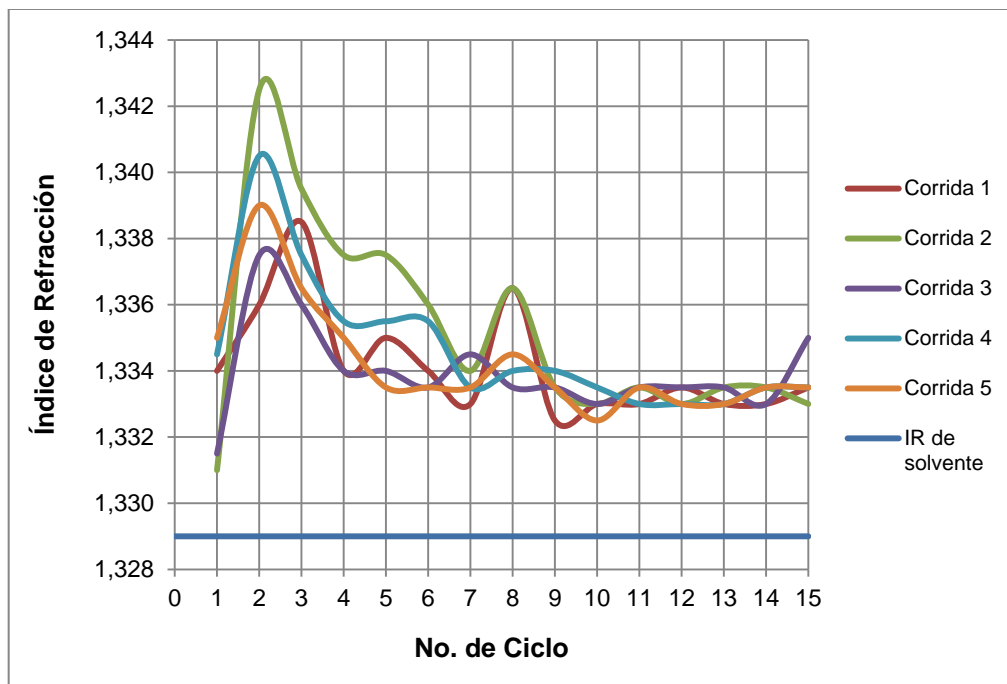
Fuente: elaboración propia.

Monitoreo del índice de refracción en cada ciclo de extracción utilizando metanol

	No. de ciclo							
Corrida	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,3340	1,3360	1,3385	1,3340	1,3350	1,3340	1,3330	1,3365
2	1,3310	1,3425	1,3395	1,3375	1,3375	1,3360	1,3340	1,3365
3	1,3315	1,3375	1,3360	1,3340	1,3340	1,3335	1,3345	1,3335
4	1,3345	1,3405	1,3375	1,3355	1,3355	1,3355	1,3335	1,3340
5	1,3350	1,3390	1,3365	1,3350	1,3335	1,3335	1,3335	1,3345
Corrida	9	10	11	12	13	14	15	
1	1,3325	1,3330	1,3330	1,3335	1,3330	1,3330	1,3335	
2	1,3335	1,3330	1,3335	1,3330	1,3335	1,3335	1,3330	
3	1,3335	1,3330	1,3335	1,3335	1,3335	1,3330	1,3350	
4	1,3340	1,3335	1,3330	1,3330	1,3330	1,3335	1,3335	
5	1,3335	1,3325	1,3335	1,3330	1,3330	1,3335	1,3335	

Fuente: elaboración propia.

**Gráfica del monitoreo del índice de refracción en cada ciclo de extracción
utilizando metanol (IR = 1,329 a 25 °C)**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 3. Muestra de cálculo

Cálculo de la densidad del extracto etanólico:

Para determinar la densidad del extracto etanólico es necesario tomar medición de masa y volumen utilizando un picnómetro. Se utiliza la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{\text{Masa Total (g)} - \text{Masa Picnómetro (g)}}{\text{Volumen (ml)}}$$

[Ec. 3]

Ejemplo:

Datos obtenidos para la medición de la densidad del extracto etanólico obtenido en el monitoreo de un proceso de extracción utilizando el equipo Soxhlet con hexano (Corrida 1, Ciclo 1).

Masa total = 4,909 g

Masa picnómetro = 4,245 g

Volumen = 1,027 ml

Utilizando la ecuación 3:

$$\rho = \frac{4,909 - 4,245}{1,027} = 0,6465$$

Cálculo del porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica obtenida de la semilla de Neem:

Para determinar el porcentaje de rendimiento se requieren dos datos específicos, el primero es la masa de materia prima utilizada en el proceso extractivo y el segundo es la masa de la fracción lipídica extraída, luego se aplica la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Masa de Fracción Lipídica}}{\text{Masa de Materia Prima}} * 100$$

[Ec. 4]

Ejemplo:

Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de rendimiento de obtenido de la extracción Soxhlet con hexano (corrida 1).

Masa de materia prima = 15,0000 g

Masa de fracción lipídica = 1,8372 g

Utilizando la ecuación 4:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{1,8372}{15,0000} * 100 = 12,2480\%$$

Apéndice 4. **Datos calculados**

Porcentaje de rendimiento de la fracción lipídica de la semilla de Neem

Código	Materia prima (g)	Materia seca (g)	Fracción lipídica (g)	% R	Media (%)	Desviación estándar (%)
SH 1	15,0000	11,6012	1,8372	12,2480	11,7339	1,1684
SH 2	15,0070	10,4461	1,9964	13,3031		
SH 3	15,0100	11,1660	1,5369	10,2392		
SH 4	15,0000	12,1248	1,7765	11,8433		
SH 5	15,0150	12,2820	1,6570	11,0356		
SI 1	15,0150	11,6762	1,1646	7,7562	7,6295	1,0707
SI 2	15,0010	12,7890	0,8638	5,7583		
SI 3	15,0110	11,2823	1,2502	8,3286		
SI 4	15,0080	11,2848	1,2042	8,0237		
SI 5	15,0010	11,2481	1,2422	8,2808		
SM 1	15,0030	9,9998	3,9456	26,2987	32,1685	3,9579
SM 2	15,0130	9,1111	5,3614	35,7117		
SM 3	15,0050	9,0080	5,3700	35,7881		
SM 4	15,0040	9,8875	4,5907	30,5965		
SM 5	15,0160	9,9861	4,8723	32,4474		

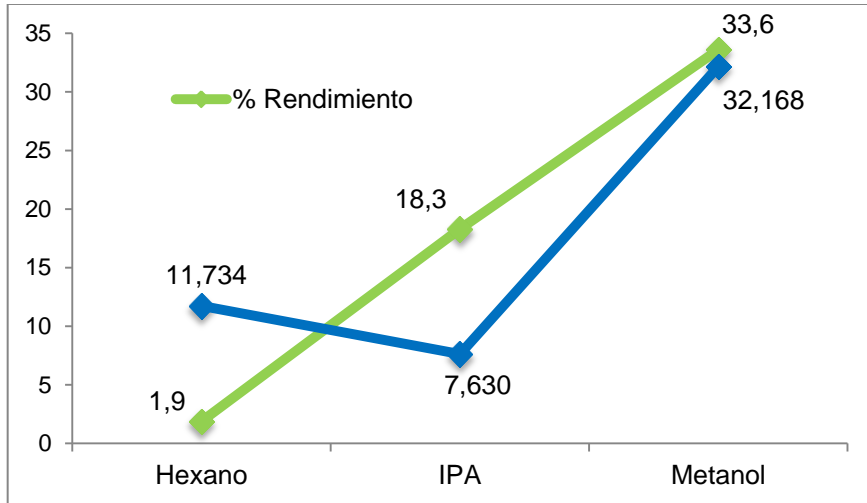
Fuente: elaboración propia con datos de ecuación 4.

Índice de refracción de la fracción lipídica de la semilla de Neem

Código	IR	Media	Desviación estándar
SH1	1,4160	1,4367	0,0121
SH2	1,4450		
SH3	1,4375		
SH4	1,4395		
SH5	1,4455		
SI1	1,4460	1,4607	0,0090
SI2	1,4580		
SI3	1,4660		
SI4	1,4670		
SI5	1,4665		
SM1	1,3950	1,3826	0,0116
SM2	1,3840		
SM3	1,3675		
SM4	1,3920		
SM5	1,3745		

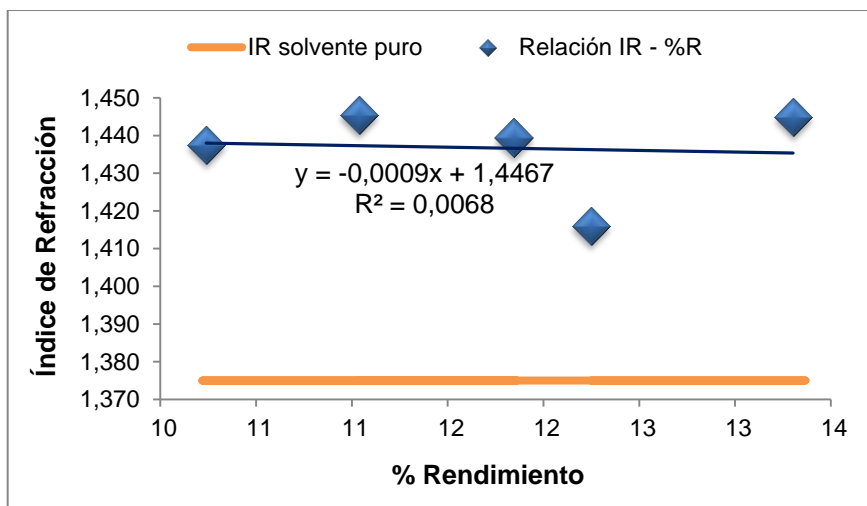
Fuente: elaboración propia.

Relación entre el porcentaje de rendimiento y la constante dieléctrica de cada solvente



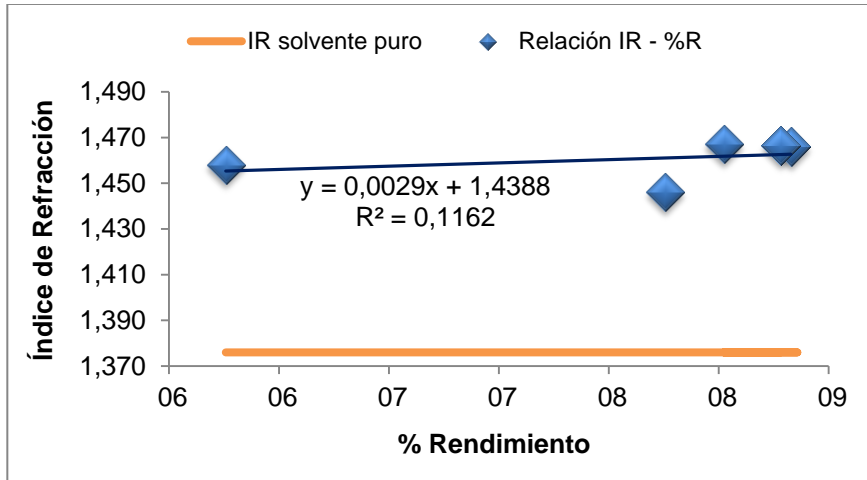
Fuente: elaboración propia.

Relación entre el índice de refracción y el porcentaje de rendimiento que se obtuvo con hexano



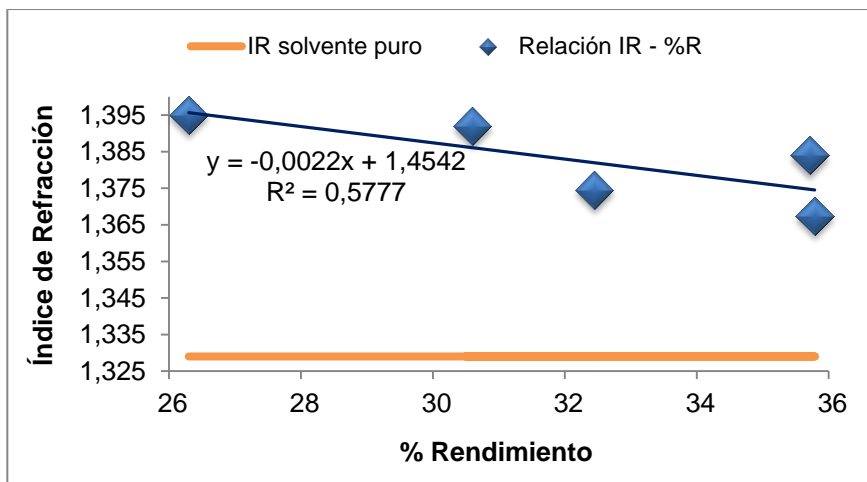
Fuente: elaboración propia.

Relación entre el índice de refracción y el porcentaje de rendimiento que se obtuvo con isopropanol



Fuente: elaboración propia.

Relación entre el índice de refracción y el porcentaje de rendimiento que se obtuvo con metanol



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 5. **Características físicas de la semilla de Neem**

**Características dimensionales de la semilla de Neem
(Corridas de la 1 – 25)**

No. Muestra	Semilla			Almendra		
	Largo (mm)	Ancho (mm)	Masa (mg)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Masa (mg)
1	14,47	8,38	210	11,63	5,45	108
2	13,30	6,72	174	11,01	5,01	99
3	13,57	6,71	148	12,60	7,35	92
4	12,66	6,88	161	11,08	6,09	117
5	13,73	6,10	143	11,85	5,96	115
6	14,68	8,10	169	13,47	5,92	144
7	15,38	8,10	154	11,49	5,17	87
8	13,33	6,53	102	13,36	6,93	71
9	13,06	6,47	125	12,02	7,40	126
10	13,57	6,44	169	12,71	7,44	103
11	13,99	6,44	105	12,17	5,63	91
12	14,86	8,29	192	10,53	4,95	58
13	13,64	6,79	99	12,02	5,66	116
14	12,05	6,06	119	11,81	5,59	79
15	15,65	6,72	185	11,22	5,63	69
16	15,11	8,49	192	11,42	5,71	92
17	14,00	6,70	157	11,23	5,05	133
18	14,05	6,02	159	12,04	6,13	106
19	12,43	6,08	141	11,46	5,79	105
20	13,63	6,50	112	11,45	6,06	95
21	13,26	6,55	167	11,66	5,88	92
22	13,57	6,64	201	12,26	5,73	114
23	12,31	6,38	168	11,58	5,48	78
24	12,61	6,36	119	11,18	5,20	103
25	13,19	6,77	91	10,58	6,00	102

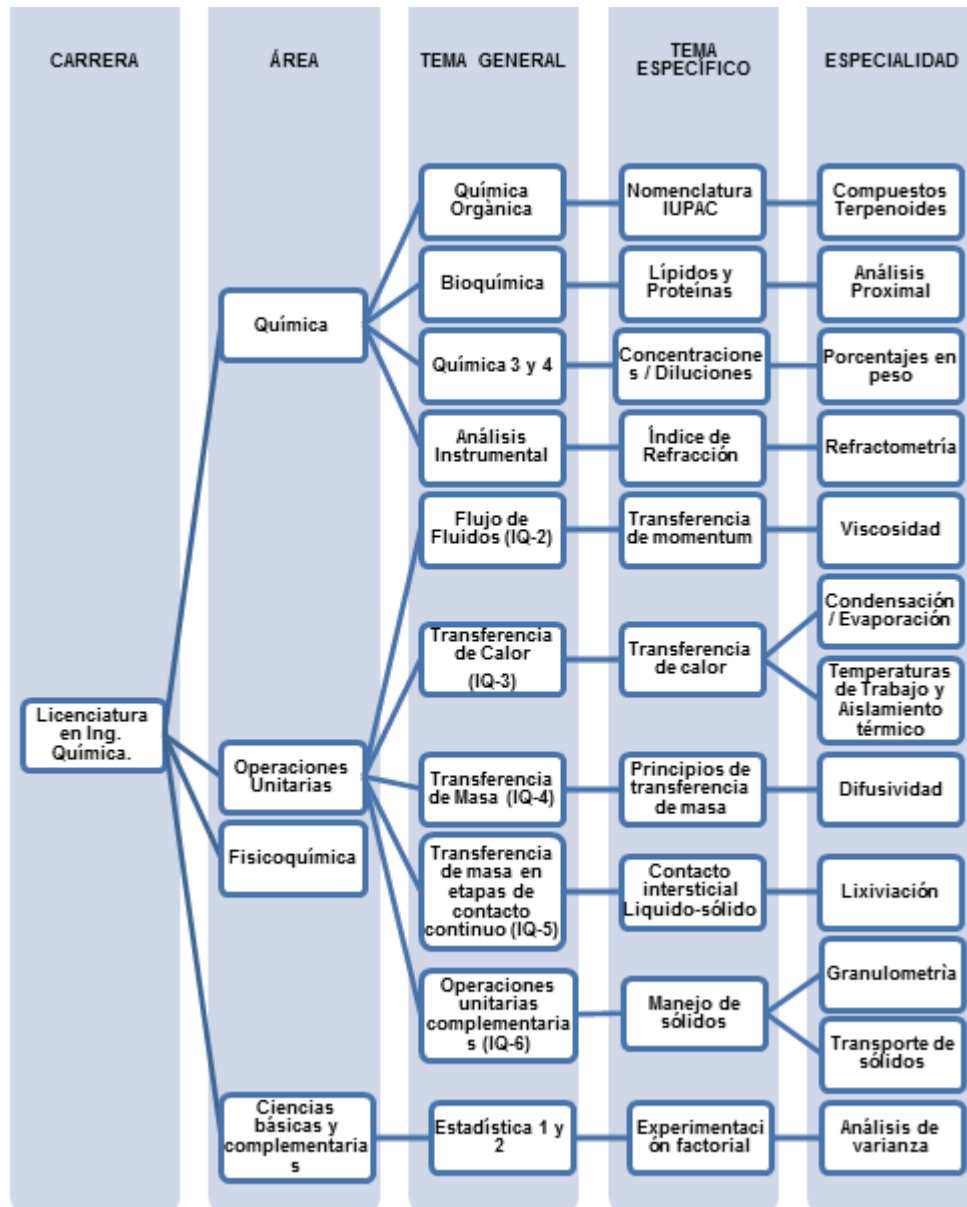
Fuente: elaboración propia.

Características dimensionales de la semilla de Neem
(Corridas de la 26 – 40)

No. Muestra	Semilla			Almendra		
	Largo (mm)	Ancho (mm)	Masa (mg)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Masa (mg)
26	13,37	6,49	173	11,49	5,76	105
27	13,31	6,25	120	12,05	5,70	82
28	14,86	7,27	137	12,39	5,64	119
29	14,07	6,42	135	10,76	5,36	97
30	12,87	6,54	129	11,32	5,88	119
31	12,82	6,59	69	11,57	5,12	112
32	14,04	6,67	148	11,39	5,52	88
33	13,44	6,11	125	11,43	5,60	110
34	13,62	6,41	127	11,92	5,84	135
35	13,42	6,46	169	11,35	5,80	108
36	14,31	6,81	174	11,52	5,60	98
37	12,66	7,12	94	10,64	5,39	122
38	13,20	6,66	135	10,67	5,50	105
39	14,62	6,40	107	11,29	5,41	89
40	14,21	6,57	180	12,32	7,19	85
Media	13,67	6,7498	145	11,6485	5,8130	102
Desviación estándar	0,85	0,6546	33	0,6815	0,6021	19

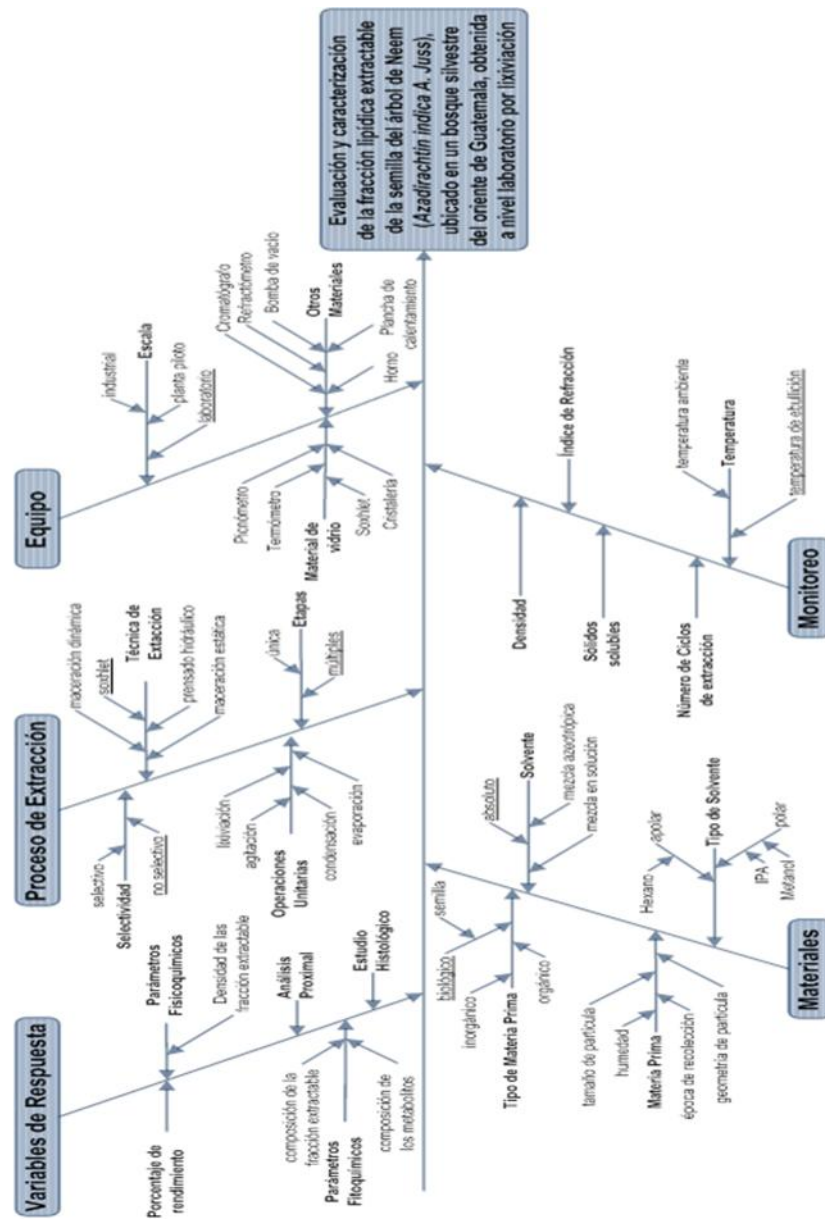
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 6. Diagrama de cursos



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 7. Diagrama de causa y efecto de un proceso de extracción sólido-líquido



Fuente: elaboración propia.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis proximal



Elaborado por: Aura Marina de Marroquín
Autorizado por: Lic. Miguel Ángel Rodenas

FORMULARIO BROMATO 7

INFORME DE RESULTADO DE ANÁLISIS



Edificio M8, 2° Nivel, Ciudad Universitaria zona 13
Ciudad de Guatemala
Teléfono: 24183307. Teléfono: 24183307 ext. 1676
E-mail: bromat2000@usac.gm

Solicitado por: **MARGARITA MARIA LÓPEZ GOMAR** Dirección: **KM. 26.5 CARRETERA AMATITLAN, No.159**

Fecha de recepción de la muestra: **01-03-2011** Fecha de realización: **01-03-2011**

Reg.	Descripción de la muestra	Agua %	M.S.T. %	E.E. %	F.C. %	Proteína Cruda %	Cenizas %	E.L.N. %	Calcio %	Fosforo %	F.A.D. %	F.N.O. %	Lipídica %	Dig. Pepsina %	Dig. K.O.H. %	Dig. Hail/kg	P.H. Hail/kg	E.O. Hail/kg	
182	SEMIJA DE NEM	8.51	91.49	37.68	16.97	39.54	4.31	1.52	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	COMO ALIMENTO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	SECA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	COMO ALIMENTO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	SECA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	COMO ALIMENTO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	SECA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	COMO ALIMENTO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	SECA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	COMO ALIMENTO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
TOTAL DE MUESTRAS REPUBLICANAS DE TIPO PASTA 1																			

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Escuela de Zootecnia
Resolución 2011/159
11/03/11


Jefe Laboratorio de Bromatología

LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA
Jefe Laboratorio de Bromatología

OBSERVACIONES:
Todos resultados fueron calculados en base materia seca total y seco físico. Se publicó la reproducción de este informe en enero de 2011

Fuente: Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Veterinaria, USAC.

Anexo 2. Perfil de ácidos grasos

	FORMATO ANALISIS DE MUESTRA PRODUCTO CODIGO: IDC-F-023	INVESTIGACION Y DESARROLLO	
Fecha de Emisión: 03/08/2011	No. De Edición: 01	Fecha de Edición: 03/08/2011	Página 1 de 1

ANALISIS No.

NOMBRE DE LA MUESTRA:	Muestra Fracción Lipídica de la semilla de Neem
CLIENTE:	Universidad de San Carlos de Guatemala
FECHA DE INGRESO:	01/08/2011
FECHA DE REPORTE:	03/08/2011
PRESENTACION DE LA MUESTRA:	En Viales de Vidrio

RESULTADOS:

Parámetro analizados	I = Extracción con isopropanol	M = Extracción con Metanol	H = Extracción con Hexano
Perfil de ácidos grasos			
% ácido graso palmítico	18.27	19.47	18.81
% ácido graso esteárico	18.85	13.39	17.69
% ácido graso oleico	40.47	39.97	40.80
% ácido graso Linoleico	20.09	25.68	21.19
% ácido graso Linolénico	1.54	1.49	1.51
% ácido graso Araquídico	0.78		

OBSERVACIONES:

Detector FID 220°C

Cantidad de muestra 0.10 gr en Balón de 25 ml

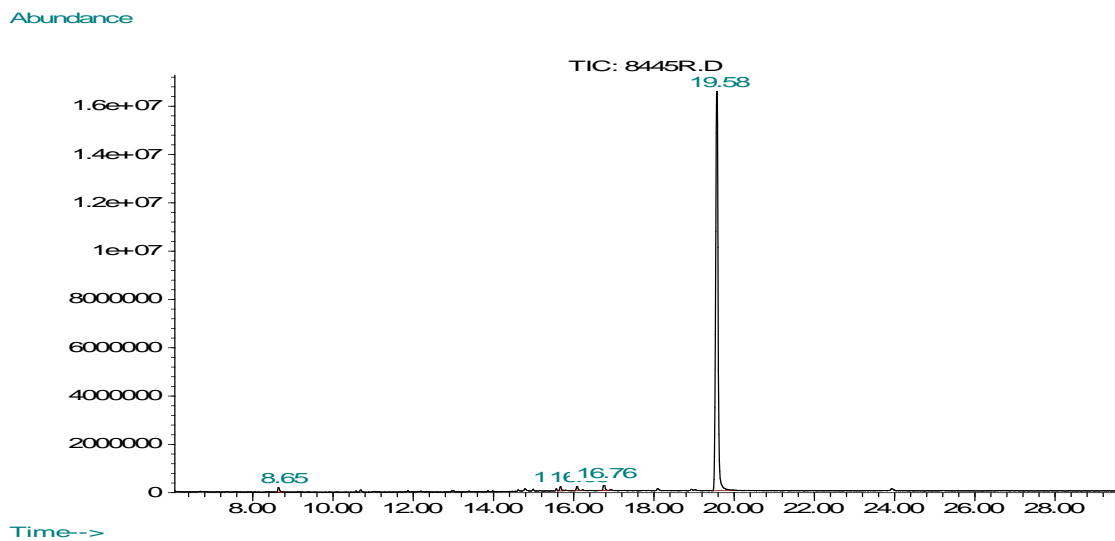
Agrega 2.5 ml de NaOH
 Agrega 1.75 ml trifluoruro de boro
 Agregar 2 ml Heptano
 Aforar con solución NaCl
 Agregar 0.5 gr de sulfato de sodio anhidro como absorbente de la humedad dentro del vial listo para inyectar

Ing. Alexander Gómez

Fuente: Laboratorio de Gestión de Calidad, Grupo HAME.

Anexo 3. Cromatogramas

Cromatograma de la fracción lipídica de la semilla de Neem obtenida con hexano



Fuente: Laboratorio de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Information from Data File:

File: C:\HPCHEM\1\DATA\8445R.D

Operator: MCS

Date Acquired: 15 Mar 11 7:11

Method File: RAFAEL

Sample Name: 8445/1ul+1ml CHCl3

Misc. Info:

Vial Number: 1

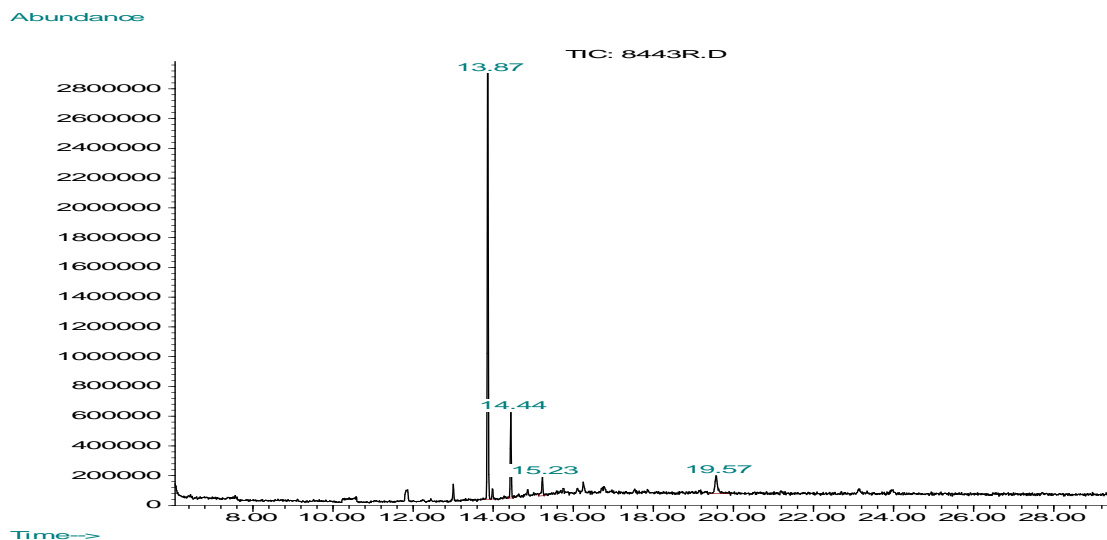
Search Libraries: C:\DATABASEWILEY275.L

Minimum Quality: 0

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	8.65	0.85	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			Ethane, hexachloro- (CAS) \$\$ Hexac	118981	000067-72-1	58
			BROMOPENTACHLOROETHANE	159451	000000-00-0	46
			Propane, 1,2,3-tribromo- \$\$ s-Trib	159463	000096-11-7	37
2	15.68	0.72	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			2,4-Cyclohexadien-1-one, 3,5-bis(1	107918	054965-43-4	43
			1,3-dimethyl-4-azaphenanthrene	92616	000000-00-0	42
			THYMOL-TMS	107840	000000-00-0	38
3	16.09	0.85	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			3,4-DIHYDRO-5,7-DIMETHOXY-4-METHYL			
				107394	062995-14-6	53
			3,3,6,9,9,10-Hexamethyl-2,10-diaza	108075	000000-00-0	50
			1,4-Benzenediol, 2,5-bis(1,1-dimet	107905	000088-58-4	41
4	16.77	1.38	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			ISOLONGIFOL-8-OL	108259	000000-00-0	44
			3-(1-hydroxyiminoethyl)phenanthro[148774	133088-00-3	30
			3-(2-Hydroxyphenyl)iminomethylchro	148781	081590-81-0	27
5	19.58	96.20	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(230975	000117-81-7	72
			1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(230983	000117-81-7	72
			1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(230979	000117-81-7	72

Wed Mar 16 10:11:46 2011

Cromatograma de la fracción lipídica de la semilla de Neem obtenida con isopropanol



Fuente: Laboratorio de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Information from Data File:

File: C:\HPCHEM\1\DATA\8443R.D

Operator: MCS/FPM

Date Acquired: 14 Mar 11 9:33

Method File: RAFAEL

Sample Name: 8443rep

Misc Info:

Vial Number: 1

Search Libraries: C:\DATABASEWILEY275.L

Minimum Quality: 0

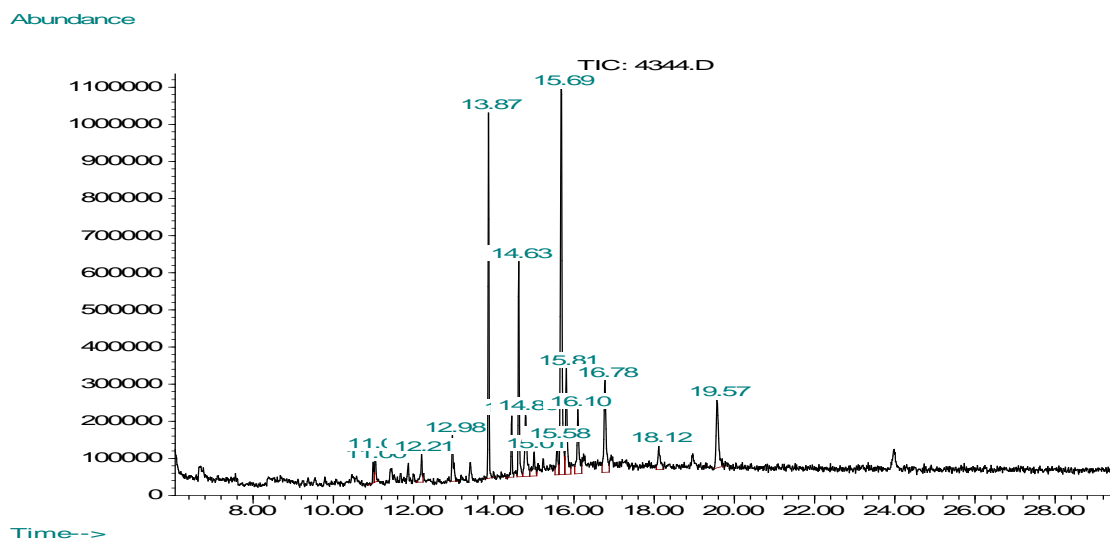
Unknown Spectrum: Apex

Integration Events: Chemstation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	13.01	3.10	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			TETRACOSAMETHYLCYCLODODECASILOXANE			
				275053	018919-94-3	47
			1,3,5,7,9-Pentaethyl-1-butoxycyclo	248082	073420-31-2	27
			1,3,5,7-Tetraethyl-1-ethylbutoxysi	248081	073420-30-1	27
2	13.87	72.77	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			8-,ETHYL-N-(O-TOLYL)(6)(2,4)PYRROL	138203	033880-39-6	55
			2-(dimethylamino)-3-phenylbenzo[b]	138129	111359-33-2	50
			1,3-DIPHENYL-1,3,5,5-TETRAMETHYL-C	208936	000000-00-0	45
3	14.44	12.33	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			Morphinan-3,6-.alpha.-diol, 7,8-di	197582	002784-73-8	91
			2-(3-Benzyl-5-trimethylsilyl-2-fur	197587	128608-94-6	35
			6,7-bis(trimethylsilyl)-1-methoxy-	197485	096246-05-8	22
4	15.23	4.01	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			2-ethoxycarbonylbenzothiazole \$\$ 2	92170	032137-76-1	38
			Valine, N-[N-(1-adamantylcarbonyl)	218915	028417-03-0	38
			5-(diethylamino)-1,2,3,4,5-pentame	92593	138902-05-3	38
5	19.58	7.78	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(230981	000117-81-7	40
			1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(230976	000117-81-7	40
			1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(230971	000117-81-7	40

Wed Mar 16 10:07:08 2011

Cromatograma de la fracción lipídica de la semilla de Neem obtenida con metanol



Fuente: Laboratorio de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Information from Data File:

File: C:\HPCHEM\1\DATA\4344.D

Operator: MCS/FPM

Date Acquired: 14 Mar 11 13:42

Method File: RAFAEL

Sample Name: 4344 5ul+1ml CHCl3

Misc Info:

Vial Number: 1

Search Libraries: C:\DATABASEWILEY275.L

Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex

Integration Events: Chemstation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	10.99	0.80	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			2-Methyl-4,5-dimethoxybenzaldehyde	64428	007721-62-2	59
			1,2,4-Trithiolane, 3,5-diethyl- (C	63835	054644-28-9	53
			6H-Purine-6-thione, 3,7-dihydro-3,	63922	005759-60-4	47
2	11.05	1.49	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			O-Trimethylsilyl, N-trifluoroacety	264776	081608-74-4	38
			Benzene, 1,2,4-trichloro- (CAS) \$\$	63740	000120-82-1	38
			1,4-Benzenediamine, 2,3,5,6-tetra	63760	001198-64-7	28
4	12.98	2.98	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			9H-Thioxanthen-9-one (CAS) \$\$ Thia	97755	000492-22-8	27
			2(3H)-Benzothiazolethione, 6-nitro	96965	004845-58-3	22
			3,4,5-Trimethoxybenzyl methyl ethe	97396	075921-68-5	17
5	13.42	1.44	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			N-(Pyrimidin-2-yl)alanine Methyl E	81555	000000-00-0	18
			2,3-Dimethylhydroquinone \$\$ o-Xyle	26217	000608-43-5	18
			1-(p-Fluorophenyl)piperazine \$\$ 1-	64479	002252-63-3	14
6	13.88	13.67	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			8-,ETHYL-N-(O-TOLYL)(6)(2,4)PYRROL	138203	033880-39-6	60
			2(3H)-Oxazolethione, 4,5-diphenyl-	137994	006670-13-9	52
			2-(dimethylamino)-3-phenylbenzo[b]	138129	111359-33-2	50

7	14.45	2.61	C:\DATABASE\WILEY275.L		
			2-methoxy-3,8-dioxocephalotax-1-en	197461	114942-83-5 93
			2-(4-(Dimethylamino)-1-naphthyl)na	197690	000000-00-0 25
			4H-1-Benzopyran-4-one, 5,6,7-trime	206806	001168-42-9 22
8	14.63	9.14	C:\DATABASE\WILEY275.L		
			Hexadecanoic acid, methyl ester (C	153612	000112-39-0 87
			Hexadecanoic acid, methyl ester (C	153627	000112-39-0 87
			Hexadecanoic acid, methyl ester (C	153608	000112-39-0 87
9	14.80	5.31	C:\DATABASE\WILEY275.L		
			2,1,3-Benzothiadiazole, 1,3-dihydr	54529	001615-06-1 23
			5-methyl-1,2,3,4-tetrathia-cyclohe	54461	116664-30-3 12
			Benzenamine, 4-propyl- \$\$ Aniline,	23784	002696-84-6 10
10	15.01	2.29	C:\DATABASE\WILEY275.L		
			Hexadecanoicacid, ethylester (CA	165479	000628-97-7 46
			Hexadecanoicacid, ethylester (CA	165473	000628-97-7 46
			3,3-Diethoxy-1,1,1,5,5,5-hexamethy	174413	000000-00-0 22
11	15.58	2.07	C:\DATABASE\WILEY275.L		
			5-NITROBENZOFURAN-2-CARBOXYLIC ACI		
				92132	0000-00-0 42
			pyrrolo[3,2-b]dibenzofuran	92573	000000-00-0 30
			Acetic acid, [4-(1,1-dimethylethyl	107693	088530-52-3 27

12	15.69	25.71	C:\DATABASE\WILEY275.L	
			6-Octadecenoic acid, methyl ester	175218 052355-31-4 93
			6-Octadecenoic acid, methyl ester,	175214 002777-58-4 93
			9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl e	175226 000112-62-9 91
13	15.81	6.85	C:\DATABASE\WILEY275.L	
			Octadecanoic acid, methyl ester (C	176787 000112-61-8 94
			Octadecanoicacid, methylester (C	176808 000112-61-8 93
			Octadecanoicacid, methylester (C	176792 000112-61-8 93
14	16.11	5.15	C:\DATABASE\WILEY275.L	
			1,2-Bis(trimethylsilyl)benzene	107559 017151-09-6 50
			THYMOL-TMS	107840 000000-00-0 41
			Acetic acid, [4-(1,1-dimethylethyl	107693 088530-52-3 38
15	16.78	7.66	C:\DATABASE\WILEY275.L	
			1,4-Benzenediol, 2,5-bis(1,1-dimet	107905 000088-58-4 55
			9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-hydrox	214838 003443-84-3 46
			1,4-Benzenediol, 2,6-bis(1,1-dimet	107906 002444-28-2 42
16	18.12	2.17	C:\DATABASE\WILEY275.L	
			2,3-dimethyl-4-azaphenanthrene	92617 000000-00-0 53
			7-Acetoxy-7,8,9,10-tetramethyl-7,8	173740 000000-00-0 53
			6-(1-Methylhydrazino)isocytosine h	92120 000000-00-0 49
17	19.58	6.33	C:\DATABASE\WILEY275.L	
			1,2-Benzenedicarboxylic acid, decy	241561 000119-07-3 47
			BUTYL-2-ETHYLHEXYL PHTHALATE	199627 000000-00-0 43
			1,2-Benzenedicarboxylic acid, dipe	182808 000131-18-0 43

18 23.99 2.70 C:\DATABASE\WILEY275.L

1,3-dimethyl-4-azaphenanthrene 92616 000000-00-0 47

Cyclotrisiloxane, hexamethyl- (CAS 106848 000541-05-9 47

Cyclotrisiloxane, hexamethyl- (CAS 106845 000541-05-9 47

Wed Mar 16 10:19:15 2011

Anexo 4. Tamizaje fitoquímico

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT)

Análisis: Perfil fitoquímico de extractos por Cromatografía en Capa Fina (CCF) de Neem.

Solicitante: Margarita López, Ingeniería Química, USAC

Fecha: 18 de marzo de 2011.

1. Técnicas empleadas: Cromatografía en capa fina

2. Resultados:

En la siguiente tabla se muestra los resultados obtenidos en cada uno de los extractos evaluados en el cual se evidencia la presencia de metabolitos secundarios.

Resultados pruebas en tubo:

Clave Asignada	Taninos	Flavonoides y Antocianinas	Esteroides o triterpenoides
Ideal	Gelatina = precipitado gelatina-sal = precipitado o cambio color Cloruro férrico = gris-negro, negro-azulado.	cambios de color o precipitados	Liebermann Burchard (LB) = color verde, azul verdoso. Acido Tricloroacético (AT) = naranja, rojo, rojo oscuro. Carr-Price (CP)= azul.
H	TESTIGO: Incoloro gelatina: (-); gelatina-sal: (-); FeCl ₃ : (-) Resultado: Negativo	TESTIGO: Blanco pálido H ₂ SO ₄ : blanco fuerte (+); FeCl ₃ : amarillo (+); HCl: blanco (+); Mg ²⁺ : turbidez blanca (+) Álcali: blanco (+); Ac. Bórico: sin cambio (-) Resultado: Negativo	TESTIGO: Blanco turbio LB: cambio incoloro (-); AT: decoloración (-); CP: sin cambio (-). Resultado: Negativo
I	TESTIGO: amarillo pálido gelatina: (-); gelatina-sal: (-); FeCl ₃ : (-) Resultado: Negativo	TESTIGO: Blanco pálido H ₂ SO ₄ : blanco (+); FeCl ₃ : amarillo (+); HCl: blanco (+); Mg ²⁺ : turbidez blanca (+) Álcali: blanco (+); Ac. Bórico: cambio a incoloro (+) Resultado: Positivo	TESTIGO: Amarillo turbio LB: cambio cristalino (-); AT: decoloración (-); CP: sin cambio (-). Resultado: Negativo

M	TESTIGO: amarillo pálido gelatina: (-); gelatina-sal: (-); FeCl ₃ : (-) Resultado: Negativo	TESTIGO: Naranja pálido H ₂ SO ₄ : amarillo (+); FeCl ₃ : naranja (+); HCl: sin cambio (-); Mg ²⁺ : turbidez blanca (+) Alcali: sin cambio (-); Ac. Bórico: cambio a incoloro (+) Resultado: Positivo	TESTIGO: Naranja cristalino LB: sin cambio (-); AT: decoloración (-); CP: sin cambio (-). Resultado: Negativo
Observaciones	No se observan cambios en ninguno de los ensayos	Se observan cambios inmediatos de color característico de flavonas	Los cambios a cristalino y decoloraciones no corresponde a posibles esteroides o triterenos pentacíclicos

Resultados identificación por Cromatografía en Capa Fina:

FASE MOVIL	acetato de etilo-acido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27)	Cloroformo: éter etílico (5:1)
Muestra	Flavonoides y Antocianinas	Sesquiterpenlactonas
Std	Rutina 0.63 verde –amarillo a 365nm café en visible, Quercetina 0.72 verde, REVELADOR: Reactivo NP/PEG fluorescencia	Artemisina 0.52 azul a 365 REVELADOR: H ₂ SO ₄ Concentrado: manchas verdes, amarillas, marrones rojas o azules
H	0 bandas Resultado: Negativo	2 bandas: 0.79 azul a 365nm, 0.89 rojo a 254nm. Resultado: Positivo
I	1 banda: 0.54 azul a 365nm Resultado: Positivo	4 bandas: 0.14 amarillo en visible, 0.39 azul a 365nm, 0.77 azul a 365nm, 0.89 rojo a 254nm. Resultado: Positivo
M	1 banda: 0.76 azul a 365nm Resultado: Positivo	4 bandas: 0.22 amarillo en visible, 0.39 azul a 365nm, 0.77 azul a 365nm, 0.89 rojo a 254nm. Resultado: Positivo
Observaciones	Se observa fluorescencia azul a 365nm	Se observan manchas amarillas y marrones en visible. Fluorescencia azul a 365nm y manchas rojas a 254nm

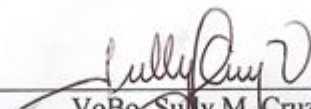
3. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se evidenció mediante las pruebas macrométricas y cromatografía en capa fina, en los extractos isopropanólicos y metanólicos la presencia de flavonoides y en todos los extractos la presencia de sesquiterpenlactonas.

En ninguno de los extractos evaluados se detectaron taninos, esteroides ni triterpenoides.



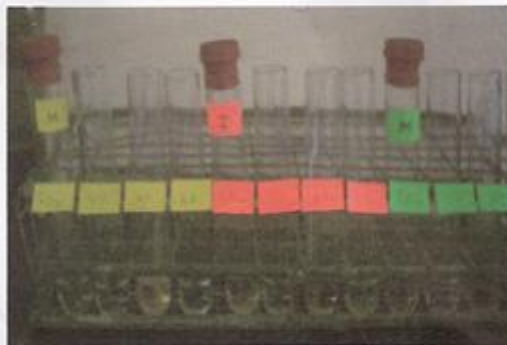
Carlos Palencia
Analista



VoBo. Sully M. Cruz
Coordinadora

Anexos:

Esteroides o triterpenoides



Taninos



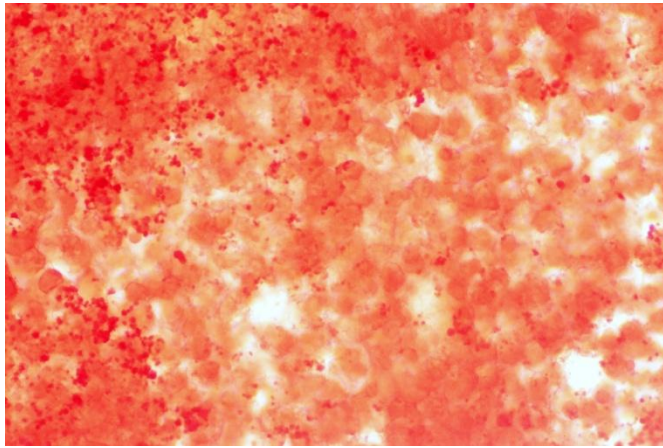
Flavonoides y antocianinas



Fuente: Laboratorio del LIPRONAT, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Anexo 5. Estudio histológico

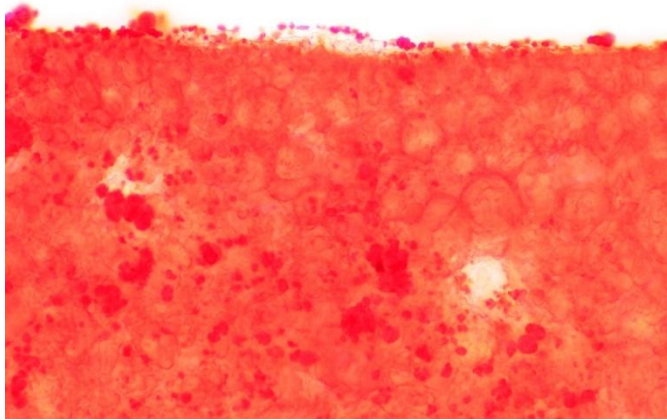
Figura 1. **Vista General del tejido cotiledonar teñido con Sudan IV (10X)**



Fuente: Laboratorio de Microscopía de la Facultad de Agronomía, USAC.

La presencia de lípidos se determina por la coloración anaranjada que ha tomado el tejido, que es normalmente transparente. (Aumentos: 100)

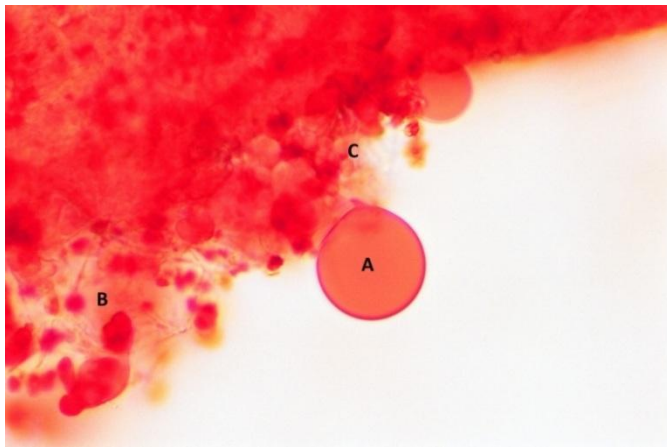
Figura 2. **Vista general del tejido cotiledonar de Neem teñido con Sudan IV (20X)**



Fuente: Laboratorio de Microscopía de la Facultad de Agronomía, USAC.

La coloración rojo naranja es indicativa de la presencia de lípidos.
Aumentos: 200.

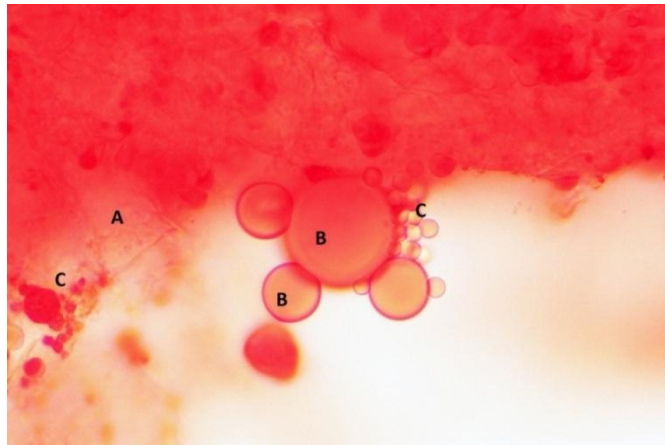
Figura 3. **Eleoplasto teñido con Sudan IV (40X)**



Fuente: Laboratorio de Microscopía de la Facultad de Agronomía, USAC.

El color anaranjado denota la presencia de lípidos. Se observa una gota grande de aceite (A), células (B) conteniendo eleoplastos en su interior. Los eleoplastos (C) son plastidios esféricos de doble membrana especializados en el almacenamiento de aceites; se encuentran normalmente en el interior de las células. Aumentos: 400.

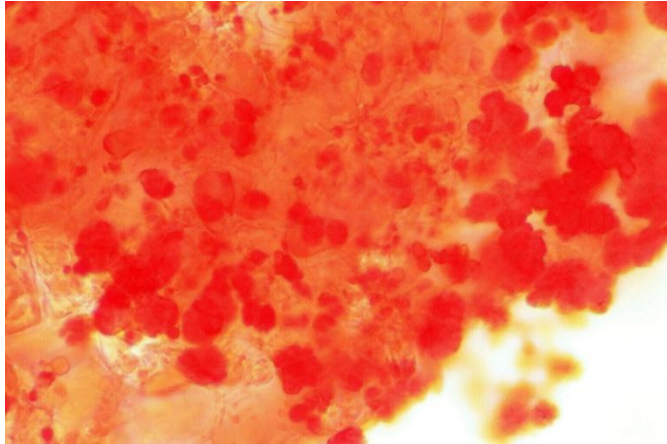
Figura 4. **Corte histológico en tejido cotiledonar de la semilla de Neem teñido con Sudán IV (40X)**



Fuente: Laboratorio de Microscopía de la Facultad de Agronomía, USAC.

Se observan células (A) que contienen eleoplastos en su interior (C). Los eleoplastos son transparentes normalmente pero se han teñido de color anaranjado o amarillo debido a la presencia de aceites. También se observan gotas de aceite (B) que se han formado debido al colapso de algunas células y eleoplastos como efecto del corte. Aumentos: 400.

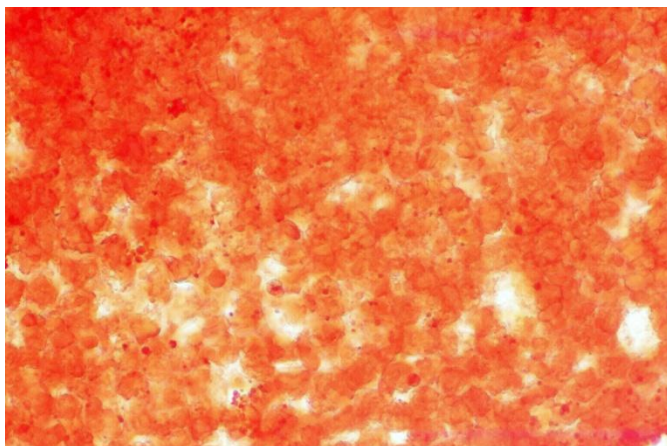
Figura 5. **Tejido cotiledonar teñido con sudan IV (40X)**



Fuente: Laboratorio de Microscopía de la Facultad de Agronomía, USAC.

La coloración del amarillo al rojizo denota la presencia de aceites.
Aumentos: 400.

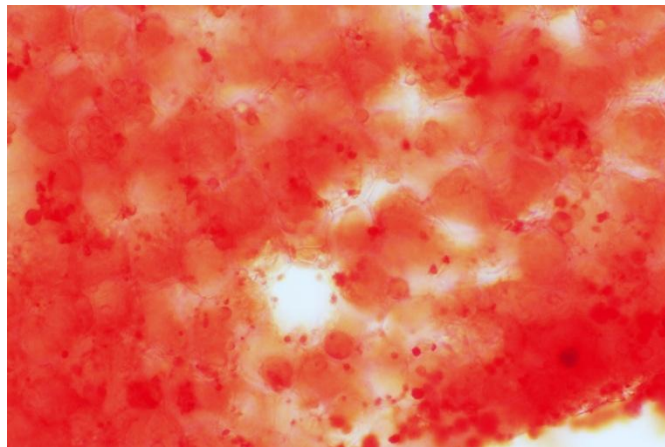
Figura 6. **Vista General del tejido cotiledonar teñido con sudan IV (4X)**



Fuente: Laboratorio de Microscopía de la Facultad de Agronomía, USAC.

El tejido es normalmente transparente; debido a la presencia de gran cantidad de eleoplastos, éste se observa teñido de color amarillo–naranja. Aumentos: 40.

Figura 7. **Tejido cotiledonar teñido con Sudán IV (20X)**



Fuente: Laboratorio de Microscopía de la Facultad de Agronomía, USAC.

Se observan las células conteniendo en su interior gran cantidad de eleoplastos (plastidios esféricos teñidos de anaranjado) en el interior de las células. Aumentos: 200.

