

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

Departamento de Farmacia

Trabajo de Diploma

En opción al título de
Licenciado en Ciencias Farmacéuticas

Título: Evaluación de la calidad del
extracto etanólico de la hoja de
Azadirachta indica A. Juss

Autor: Joan Manuel Alvarez Consuegra

Tutores: Dr.C. Ania Ochoa Pacheco (PT)
MSc. Yamilé Heredia Díaz (PA)

Curso 2019-2020
Santiago de Cuba

Pensamiento



*"Lo importante en la ciencia no es tanto
obtener nuevos datos sino descubrir
nuevas formas de pensar sobre ellos"*

William Lawrence Bragg

Dedicatoria

Dedicatoria

Dedico esta tesis con mucho cariño y amor a:

- A mi madre Rosa Idania Consuegra Gómez, a mis abuelos Emilio Consuegra Viguera y Zoila Gómez Gonzales y a mis tíos, que han resultado ser mis mejores guías en toda la vida, los que siempre han estado presente en toda mi existencia y me han apoyado en mi formación como profesional.
- A mis primos que los quiero con todo el amor de mi corazón.
- A mis amigos, colegas de grupo y a los profesores que no solo me han ayudado, sino que me han estimulado en este trabajo.
- A todas las personas del mundo que en estos momentos necesitan de mucha salud, amor y verdad.

Agradecimientos

Agradecimientos:

Agradezco a Dios por haber permitido lograr la licenciatura como farmacéutico después de lograr recuperarme de mi enfermedad, que tanto trabajo me ha ocasionado en toda la vida.

A mi madre que es lo que más quiero y he amado en toda mi vida, que siempre ha estado a mi lado en las buenas y en las malas, apoyándome en los estudios y en todas las dificultades por las que he tenido que transitar.

A toda mi familia por haberme apoyado tanto y tener la oportunidad de haber estudiado esta carrera, en especial mis abuelos, mis tíos, mis primos que son prácticamente mis hermanos y por último a una persona que por grandes dificultades no he podido tener a mi lado: mi padre.

De manera muy especial a mis tutores: Ania Ochoa Pacheco y Yamilé Heredia Díaz por su ayuda y apoyo en la elaboración de este diploma, por sus orientaciones y por brindarme toda su sabiduría.

A todos los profesores que me brindaron gran parte de sus conocimientos, con los que podré convertirme en un futuro profesional.

A Jorge Luis que ha sido un gran amigo y casi un padre para mí.

A todas mis amistades y compañeros de aula que nunca en la vida voy a olvidar: Isistania, Lili, Bárbara, Yasmina, Marilyn, Elisnay, Otniel, Leonardo, Karina, Karel, Víctor, Elisabet, Leidis, Beltis, Daylin, Rachel, Daniela y en especial a Naylan que desde un principio formó parte de mi corazón.

A toda la familia de Naylan que siempre me ayudaron mucho en el transcurso de todos mis estudios.

A todos, incluidos los que no menciono, los que me preguntaron en varias ocasiones cómo iba en la realización de la tesis, los que se interesaron en cuando acababa y los que me animaron a vivir este gran episodio de cimientos de mi vida.

Resumen

RESUMEN

La empresa LABIOFAM de Mayarí, Holguín, ha formulado un extracto en etanol a partir de la hoja de *Azadirachta indica* A. Juss (Árbol del neem), con vista a su aplicación como principio activo de un champú medicinal con uso pediculicida. Por lo que existe la necesidad de evaluar su calidad física, físico-química y química. Se parte de la elaboración de cuatro lotes y se determinan parámetros de control de la calidad de acuerdo a la Norma Ramal de Salud Pública 312. Además, se realizó la determinación cualitativa de los metabolitos; así como la cuantificación de flavonoides totales según el método de Kumazawa y la huella espectral en el ultravioleta-visible (UV-VIS). Los resultados arrojaron que los cuatro lotes mostraron un olor característico, color verde oscuro, transparencia, homogeneidad, valores de pH con características ácidas débiles (5,94-6,20), porcentaje de sólidos totales en un rango de 5,66-6,29 %, densidad relativa de 0,88-0,93 g/mL y el índice de refracción de 1,361-1,367. La imagen capilar se caracterizó por ser poco coloreada, alta y con sus cuatro zonas definidas. Se identificaron alcaloides, triterpenos y esteroides, cumarinas, saponinas, aceites esenciales, azúcares reductores, fenoles y taninos, flavonoides, aminoácidos y aminos libres. El contenido de flavonoides totales fue de 1,99-2,79 mg/g de droga seca y la huella espectral al UV-VIS permitió obtener varios máximos de absorción. Los indicadores de la calidad que se reportan constituyen un patrón de referencia para el control del extracto en etanol de la hoja como producto final y en el proceso tecnológico.

Palabras claves: *Azadirachta indica* A. Juss, calidad, extracto en etanol, flavonoides totales.

Abstract

ABSTRACT

The company LABIOFAM in Mayarí, Holguín, has formulated an extract in ethanol from the *Azadirachta indica* A. Juss leaf (Neem tree), with a view to its application as an active ingredient in a medicinal shampoo for pediculicide use. So there is a need to assess its physical, physical-chemical and chemical quality. It starts from the preparation of four batches and quality control parameters are determined according to the Public Health Branch Standard 312. In addition, the qualitative determination of metabolites was carried out; as well as the quantification of total flavonoids according to the Kumazawa method and the spectral fingerprint in the ultraviolet-visible (UV-VIS). The results showed that the four batches showed a characteristic odor, dark green color, transparency, homogeneity, pH values with weak acidic characteristics (5.94-6.20), percentage of total solids in a range of 5.66-6.29%, relative density of 0.88-0.93 g/mL and the refractive index of 1.361-1.367. The capillary image was characterized by being little colored, high and with its four defined areas. Alkaloids, triterpenes and steroids, coumarins, saponins, essential oils, reducing sugars, phenols and tannins, flavonoids, amino acids and free amines were identified. The total flavonoid content was 1.99-2.79 mg/g of dry drug and the UV-VIS spectral fingerprint allowed obtaining several absorption maximum. The quality indicators that are reported constitute a reference standard for the control of the ethanol extract of the leaf as a final product and in the technological process.

Key words: *Azadirachta indica* A. Juss, quality, ethanol extract, total flavonoids.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
I.1 Familia Meliaceae. Generalidades.....	5
I.1.1 Género <i>Azadirachta</i> . Características generales.....	6
I.1.1.1 <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	6
I.1.1.1.1 Descripción botánica.....	7
I.1.1.1.2 Hábitat y distribución.....	7
I.1.1.1.3 Composición química.....	8
I.1.1.1.4 Actividades biológicas.....	9
I.1.1.1.5 Antecedentes de estudios científicos con la especie.....	11
I.2 Estudios de calidad de extractos vegetales. Características e importancia.....	15
I.2.1 Parámetros de calidad de extractos vegetales.....	17
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
II.1 Características generales de la investigación.....	19
II.2 Recolección y procesamiento del material vegetal.....	19
II.3 Elaboración del extracto etanólico.....	19
II.3.1 Determinación de los parámetros de calidad.....	20
II.3.1.1 Determinación de parámetros físicos y físico- químicos.....	20
II.3.1.2 Determinación de los parámetros químicos.....	24
II.3.1.3 Determinación de la huella espectral en el ultravioleta (UV).....	25
II.4 Análisis estadístico y procesamiento de los resultados.....	25
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
III.1. Recolección y procesamiento del material vegetal.....	26
III.2 Elaboración del extracto en etanol.....	26
III.2.1 Determinación de los parámetros de calidad al extracto en etanol.....	27
III.2.1.1 Determinación de parámetros físicos y físico- químicos.....	27
III.2.1.2 Determinación de parámetros químicos.....	31
III.3 Determinación de la huella espectral en el ultravioleta.....	35
CONCLUSIONES.....	40
RECOMENDACIONES.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

Introducción

INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional está presente en todas las culturas del mundo. Se define como el conjunto de todos los conocimientos y prácticas usadas en la prevención, diagnóstico y eliminación de desequilibrios físicos, mentales o sociales, confiado exclusivamente en la experiencia práctica, observación y transmisión de generación en generación en forma oral o escrita. En 1977, la Organización Mundial de la Salud (OMS) adoptó una estrategia sobre esta, instando a los gobiernos miembros a priorizar y perfeccionar sus sistemas médicos tradicionales.¹

El uso de tales prácticas de salud es tan antiguo como la aparición de la especie humana, porque desde el principio de la civilización fueron parte de las estrategias de atención familiar y comunitaria. Entre las más utilizadas y difundidas a través de la cultura popular, las plantas medicinales ocupan un lugar destacado y durante mucho tiempo fueron el principal recurso terapéutico utilizado para tratar la salud de las personas y sus familias.² La medicina herbaria es apreciada por su costo bajo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis.³

En la actualidad existe gran interés por la medicina tradicional y dentro de esta, la medicina herbaria, que ha generado numerosos estudios divulgados en prestigiosas publicaciones, así como en los últimos tiempos se ha potenciado su uso con la investigación y desarrollo de productos fitoterapéuticos. No obstante, hay poca prescripción de medicamentos de origen vegetal por parte de los profesionales de la salud; los tratamientos están basados mayormente en fármacos sintéticos, incluso para los problemas de salud diagnosticados como enfermedad leve.⁴ Para el caso de las poblaciones rurales, el acceso a los medicamentos farmacológicos se torna restringido por múltiples razones, como el traslado a una farmacia, los costos altos, los aspectos culturales, el difícil acceso a centros de salud, entre otros, optando siempre por la medicina herbaria que está a su alcance.⁵

Se estima que alrededor del 80 % de la población mundial recurre a la medicina tradicional herbolaria para la atención primaria de la salud. En Asia, millones de personas mantienen su salud mediante el uso de hojas, raíces y cortezas de árboles. Según reconocidos investigadores, prácticamente todas estas plantas han sido

reveladas para su utilización en la medicina tradicional. De acuerdo a la capacidad científico-técnica predominante, las nuevas tecnologías de la información y las comunicaciones, así como la abundante diversidad biológica, el desarrollo de la salud de las sociedades se ve altamente favorecido.

En Cuba, los investigadores laboran con estos recursos que ofrece la naturaleza en el diseño de diversos proyectos científicos. El fin es conseguir productos con alta calidad, seguridad y eficacia que se extiendan de manera asequible y racional a la población y contribuyan a reducir los costos del país.⁶

El árbol del neem, nim o margosa, cuyo nombre científico es *Azadirachta indica* A. Juss, es una planta medicinal muy versátil perteneciente a la familia Meliaceae y se encuentra extensamente distribuida en Asia, África y otras partes tropicales del mundo. Posee un uso ancestral y ha sido utilizada en la medicina tradicional por su amplio espectro de propiedades medicinales. Sin embargo, las investigaciones científicas de sus propiedades terapéuticas se están realizando desde hace pocos años.⁷ En Cuba, se introdujo en la primera década del siglo XX, pero empezó a generalizarse su cultivo en el país en la década de los años 90.⁸

Desde los inicios de la historia humana se ha generado información cultural de los campesinos, en el cual se explica el aprovechamiento y beneficio de la *Azadirachta indica* por sus propiedades medicinales. En la Antigüedad, los herbolarios hindúes descubrieron las propiedades de esta planta y su uso se encuentra documentado desde hace 4000 años. Se sabe que lo emplearon para tratar muchas enfermedades y calmar dolencias. Dicha planta es conocida como la “farmacia de la aldea” o también como la “botica del pueblo”.⁹

Se han empleado la hoja, la flor, la corteza, el fruto, el aceite esencial y la raíz para tratar varias enfermedades.¹⁰ Muchos investigadores reportan la obtención de diferentes extractos y la purificación de distintas fracciones de estos, los cuales poseen significativas propiedades antioxidantes, hepatoprotectoras y quimiopreventivas contra el cáncer.^{11,12} Igualmente existe evidencia científica preliminar que demuestra que determinadas fracciones de diferentes extractos de esta planta poseen propiedades antidiabéticas, antiinflamatoria y antiulcerosa.^{13,14} Otros sugieren que

extractos de la planta poseen significativas propiedades antibacterianas, antivirales, antiparasitarias y antifúngicas.^{15,16}

Por otro lado, se reporta que el árbol del nim es probablemente la especie botánica más estudiada en la actualidad por su alta eficiencia como repelente, plaguicida y pesticida, con bajo efecto residual. La hoja, el fruto, la semilla y la corteza rinden azadiractina, salanina, meliantriol y varios triterpenoides relacionados (limonoides) con una acción pesticida comprobada contra una gran gama de plagas de insectos y nemátodos que afectan las cosechas de vegetales, granos y cítricos.¹⁷ Las propiedades insecticidas varían de acuerdo a las procedencias, dependiendo de la edad del árbol y de las condiciones climáticas locales.

Numerosos estudios de laboratorio y de campo usando extractos de la hoja, del meollo de las semillas y estas pulverizadas, aplicados a las cosechas como un rocío o polvo foliar, han demostrado la eficacia de sus agentes naturales pesticidas, repelentes y disuasivos del forrajeo por los insectos.¹⁸⁻²⁰ Se ha reportado la reducción de la fecundidad, la actividad ovicida, la mortalidad larval y las anomalías en el desarrollo de una variedad de plagas de coleópteros, dípteros, hemípteros, heterópteros, homópteros, himenópteros, lepidópteros, ortópteros y tisanópteros expuestos a los extractos de la margosa y la azadiractina en particular.^{20,21} Las hojas secas, al igual que sus extractos, se usan extensamente en Asia y África como una manera efectiva para proteger las cosechas almacenadas, en particular los cereales, las legumbres y el maíz contra el ataque por las plagas de insectos, incluyendo los insectos brúcidos y otras larvas de coleópteros y lepidópteros.²² También la hoja se usa para mantener los insectos fuera de los libros y las ropas, para la preparación de una loción antiséptica y para hacer cataplasmas en heridas y una gran variedad de enfermedades de la piel.²³

Teniendo en cuenta estos antecedentes sobre las propiedades plaguicidas y pesticidas de la *Azadirachta indica* A. Juss,¹⁷⁻²³ la empresa Laboratorio Biológico-Farmacéutico (LABIOFAM) de Mayarí, Holguín, ha formulado un extracto en etanol elaborado a partir de la hoja con vista a su aplicación como principio activo de un champú medicinal con uso pediculicida. Por tanto, existe la necesidad de evaluar la calidad física, físico-

química y química de este extracto con vista a su aplicación farmacéutica, por lo que se diseña esta investigación como parte de la política establecida en nuestro país para el vínculo Universidad-Empresa, respondiendo al siguiente **problema científico**.

PROBLEMA CIENTÍFICO.

El extracto en etanol de la hoja de *Azadirachta indica* A. Juss, proporcionado por la empresa LABIOFAM Mayarí-Holguín, no posee evidencias de su calidad física, físico-química y química para su utilización farmacéutica.

Como **Hipótesis** de la investigación se propone:

Si el extracto en etanol de la hoja de *Azadirachta indica* A. Juss posee calidad física, físico-química y química, entonces podrá ser utilizado como principio activo de un champú medicinal para uso pediculicida.

La investigación responde al siguiente **Objetivo general**:

1. Evaluar la calidad física, físico-química y química del extracto en etanol de la hoja de *Azadirachta indica* A. Juss.

Objetivos específicos:

1. Elaborar cuatro lotes del extracto en etanol de la hoja de la especie.
2. Determinar parámetros de calidad físicos, físico-químico y químicos del extracto en etanol de la hoja de la especie.

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 Familia Meliaceae. Generalidades

Esta familia está representada por árboles leñosos de diferentes grados de desarrollo. Posee 54 géneros y unas 1250 especies distribuidas especialmente en las regiones cálidas de todo el mundo y también con algunos representantes en las zonas templadas.²⁴ Ocupa gran variedad de hábitats, que van desde bosques lluviosos hasta áreas semidesérticas. Descrita por Ventenat en 1799, se incluye dentro del orden Sapindales. Se encuentra dividida en cuatro grandes subfamilias: Melioideae, Swietenioideae, Quivisianthoideae y Capuronianthoideae. Posee similitudes con las familias Anacardiaceae, Burseraceae, Rutaceae, Sapindaceae, Simaroubaceae y Zygophyllaceae.²⁵

Entre los géneros que la componen se pueden citar: *Cabralea*, *Carapa*, *Cedrela*, *Guarea*, *Ruagea*, *Schmardea*, *Swietenia*, *Trichilia*, *Melia*, *Swietenia*, *Toona*, *Entandrophragma* y *Azadirachta*.

En América tropical hay ocho géneros y alrededor de 130 especies. Los géneros *Melia* y *Azadirachta*, nativos de Asia, también se cultivan ampliamente en América, donde existen varios centros de diversificación, entre ellos los de la Amazonia (en Brasil, Perú y Ecuador), el sur de México y norte de Guatemala y las Antillas. Sus ejemplares se distinguen por el fuerte olor de su corteza.²⁶

Varios de estos géneros son de importancia económica en la industria maderera a nivel mundial. Por ejemplo, la madera de la caoba (*Swietenia* spp.) y el cedro (*Cedrela* spp.) son codiciadas en el mundo por su resistencia a las plagas, su bello color y su dureza. Otros, como la *Cabralea canjerana* (cancharana) posee madera resistente utilizada en la elaboración de postes y en la fabricación de imágenes religiosas y *Melia azederach* L. (paraíso), cuya madera es de buena calidad, vistosa y fácil de trabajar, tanto para aserrar como para la fabricación de muebles, puertas, ventanas, usos en ebanistería, enchapados y terciados. De las semillas de *Carapa guianensis* se extrae un aceite usado en la manufactura del jabón, con propiedades insecticidas; así como del neem (*Azadirachta indica*) se obtiene un insecticida poderoso. Además, se destacan las propiedades medicinales para muchas de estas especies.^{26,27}

En el Archipiélago cubano, las especies de esta familia, habitan en diferentes formaciones vegetales, en llanuras o pequeñas elevaciones, aunque pueden encontrarse individuos aislados hasta los 600 metros sobre el nivel del mar.²⁸

I.1.1 Género *Azadirachta*. Características generales

Este género fue descrito por Adrien-Henri de Jussieu y publicado en Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle 1830.²⁹ La palabra *Azadirachta* es derivada del persa azaddhirakt que significa "árbol noble".³⁰

Es un género de árboles siempre verdes, con dos especies aceptadas hasta enero de 2013: *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs y *Azadirachta indica* A. Juss.³¹ Esta última es de origen asiático, introducida en el Nuevo Mundo y posee una importancia potencial relevante. En los últimos años, se ha incrementado el interés de la ciencia por esta especie, ya que dos decenios de investigación revelan resultados prometedores en tantos campos, que pudiera aportar enormes beneficios a la humanidad. En la India, desde hace siglos se recurre a este árbol para aliviar el dolor, la fiebre y las infecciones.³² Es una planta increíble que ha sido declarada por las Naciones Unidas como el "Árbol del siglo (XXI)". La Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América, publicó en 1992 un informe titulado: "Neem: Un árbol para resolver problemas globales".³³⁻³⁵

I.1.1.1 *Azadirachta indica* A. Juss.

Nombre científico: *Azadirachta Indica* A. Juss

Nombres comunes: Neem en inglés e hindú, margosa y paraíso de la india en español,³⁶ azad-darakth-E-hind en Persia, india lilac,³⁷ nim, cinamomo, acederaque, planta milagrosa.³⁸

Clasificación taxonómica

Reino: Vegetal

División: Embriofitas

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledóneas

Orden: Rutales

Suborden: Rutinae

Familia: Meliaceae

Subfamilia: Melioideae

Género: *Azadirachta*

Especie: *Azadirachta indica* A. Juss^{30,39-41}

I.1.1.1.1 Descripción botánica

Es un árbol de tamaño mediano a grande (Figura 1), de hoja perenne tropical de rápido crecimiento (hasta veinte pies en tres años) relacionado con la caoba. Se caracteriza por tener un tronco recto y corto. Posee una corteza gris, o gris oscura, áspera y café rojiza en su interior. Esta varía mucho en grosor según la edad y las partes del árbol de donde se extrae; la superficie externa es rugosa y fisurada; la superficie interior laminada amarillenta y foliácea, fractura, fibrosa; olor característico y sabor amargo. Las hojas compuestas (Figura 2) imparipinadas alternas de 20 a 38 cm de largo y provistas de 8 a 19 foliolos alternados u opuestos, ovalo-lanceolados, oblicuos o subfalciformes, falciforme-lanceolados y brillantes, de 7-8,5 cm de largo y 1,0-1,7 cm de ancho. Raquis de 15-25 cm de largo y 0,1 cm de grosor. El árbol a menudo está cubierto de delicadas flores a principios del verano. Estas son blancas o amarillo-pálido, fragantes, pequeñas, olorosas, numerosas en largas panículas axiales, hermafroditas y miden de 5 a 15 cm de largo (Figura 3). Florece entre marzo y mayo. El fruto es una drupa pequeña, semidulce, indehiscente en forma de nuececilla y tamaño de una aceituna, verdes, amarillas cuando maduran, aromático, oblongo u ovoide-oblongo, de 1,3 a 1,8 cm de largo (Figura 4), con una sola semilla exalbuminosa y maduran de junio a agosto.^{36,40} El aroma que presenta las semillas es muy parecido al que caracteriza el ajo, en el interior es rica en aceite con numerosas propiedades medicinales y botánicas. El árbol logra su máxima producción de frutos a los 10 años y llegan a vivir hasta 200 años.^{37,42}

I.1.1.1.2 Hábitat y distribución

El neem se adapta a un extenso rango de climas y condiciones de suelos, en elevaciones entre el nivel del mar y los 700 m. Sin embargo, puede crecer en altitudes de hasta 1500 m, en tanto las temperaturas permanezcan moderadas, ya que no soporta el frío o la congelación. Tolera las temperaturas extremadamente altas, pero

su rango normal está cerca de los 9,5 a 37 °C. También es altamente tolerante a la sequía y una vez establecido, puede sobrevivir a estaciones secas de 7 a 8 meses. Requiere tan poco como 150 mm de lluvia por año 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 al año.⁴³

Prefiere los suelos profundos, permeables y arenosos, 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, poco profundos e infértiles, pero no se recomienda para ciénagas barrosas o fangosas, suelos barrosos, salinos, o donde la superficie sea dura o se hallen capas de laterita. Tampoco debe sembrarse donde los suelos se vuelvan empapados o temporalmente inundados. Se desarrolla en suelos de pH en el rango de 5,2 a 7,0, pero puede crecer dentro de un rango de pH de 5,0 a 8,0. Los árboles maduros demandan mucha luz, pero las plántulas toleran la sombra moderada durante su primera temporada de crecimiento en sitios secos.⁴³

Actualmente se encuentra distribuido en más de 78 países, en el continente Asiático, Africano, Oceanía, Centro y Sur de América. Se tiene una probabilidad que en la actualidad en el mundo existe un aproximado de 200 millones de árboles, gran parte de estos se encuentran en Asia, donde se desarrollan bajo cultivo y de manera silvestre.^{44,45}

I.1.1.1.3 Composición química

En los últimos años, se han aislado más de 25 principios activos diferentes de esta especie vegetal, mostrando una variada composición química como se describe a continuación:

- **Azadiractina** (AZA) (Figura 5): Del grupo de los tetranortriterpenoides conocidos como limonoides. Es una amalgama de siete compuestos isoméricos etiquetados como azadiractina A-G y la E es más eficaz.⁴⁶ La semilla contiene las concentraciones más altas de este compuesto, pero también se puede encontrar en la corteza, hoja y fruto. A partir de los tres-cuatro años de edad un árbol produce alrededor de 50 kg al año, lo que da una idea de su potencial como fuente de sustancias biocidas.⁴⁷



Figura 1. Árbol de *Azadirachta indica*³⁷



Figura 2. Hojas³⁷



Figura 3. Flores³⁷



Figura 4. Frutos³⁷

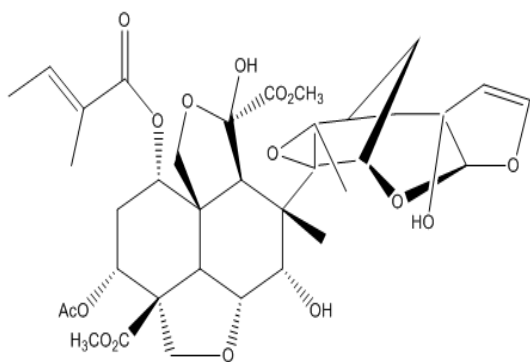
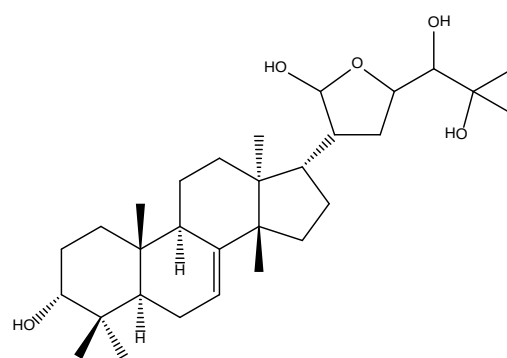
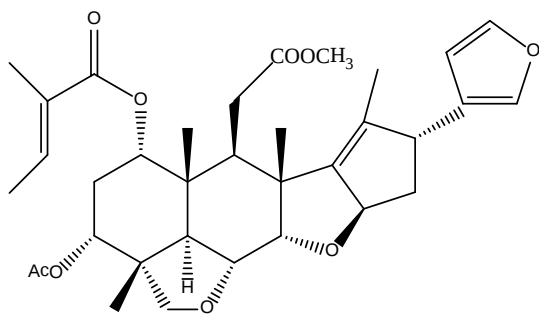
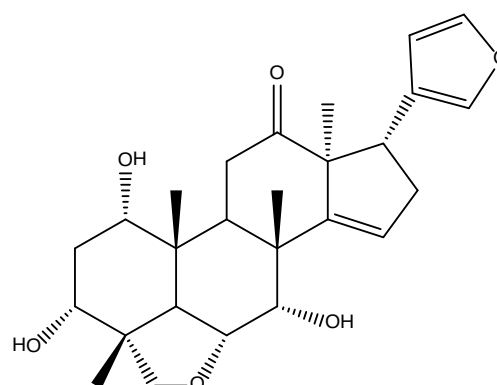
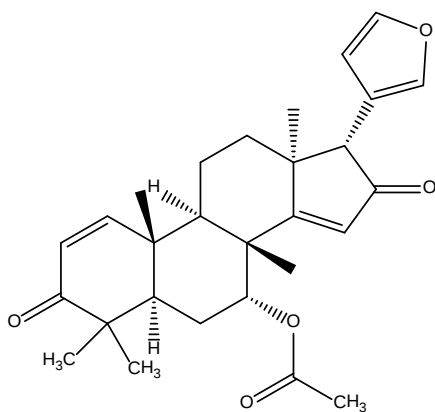
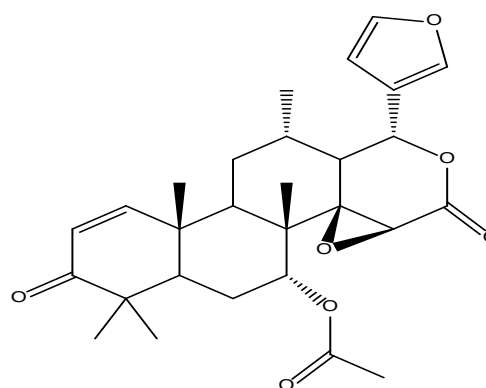
**azadiractina**⁴⁶**meliantriol**⁴⁸**salanina**⁴⁸**nimbina**⁴⁸**azadiradiona**⁴⁹**gedunina**⁵⁰

Figura 5. Estructuras químicas de constituyentes aislados de *Azadirachta indica* A. Juss

- **Salanina**, meliantriol, nimbina (Figura 5), nimbidina, nimocinolida e isonimocinolida: Se han identificado en la semilla, con probable actividad antialimentaria, de inhibición del crecimiento y de la oviposición. También se encuentran en la hoja.⁴⁸
- **Azadiradiona** (semillas y frutos) (Figura 5),⁴⁹ gedunina (Aceite de la semilla y corteza) (Figura 5),⁵⁰ vepinina (Aceite de la semilla), amorastaitina (Hoja), vilasinina (Hoja), nimbolina (Semilla).⁴⁷
- **Ácido margósico**, nimbolida (Hoja), meliacina, esteroides (Hoja y fruto) (sitosterol), alcaloides, flavonoides (quercetina) (Hoja), glicósidos cardíacos, saponinas, compuestos fenólicos, taninos, antraquinonas, carotenoides, cetonas y minerales (zinc, hierro, cobre, sodio, manganeso, calcio, magnesio, potasio y fósforo) (Hoja).^{36,46,51,52}
- **Tetrasulfuro cíclico** y trisulfuro (Tallo).⁵³
- **Nimbaneno**, 6-desacetilnimbineno, nimbandiol, ácido ascórbico, n-hexacosanol, 7-desacetil-7-benzoilazadiradiona, nimbiol, 7-desacetil-7-benzoilgedunina, 17-hidroxi azadiradiona, nimbolinina, nimbinato de sodio (Hoja).⁵⁴
- **Epoxiazadiradiona**, deacetilnimbina, nimocina, nimocinol, nimbocinona, isoazadirolida, margosinolida, nimbandiol.⁵⁵

I.1.1.1.4 Actividades biológicas

Han sido evaluadas diversas propiedades farmacológicas de esta especie vegetal con resultados muy alentadores para su utilización en la terapéutica clínica, entre las que se destacan: antiinflamatoria (Hoja, corteza, fruto y aceite de la semilla),^{49,56-58} antipirético (Hoja y aceite esencial),⁴¹ antidiabético y antihiperlipidémico (Semilla y hoja),^{52,59,60} antibacteriana (Hoja, semilla, ramas y aceite de la hoja, semilla y corteza),⁶¹⁻⁶³ antifúngica (Hoja, semilla y aceite de la semilla),^{50,53,64} anticarcinogénica (Hoja),⁶⁵ antimalárica (Hoja y corteza),⁶⁶ antiulcerosa (Hoja)⁶⁷ y cicatrizante (corteza del tallo).⁶⁸ También posee propiedades como insecticida, larvicida, garrapaticida (semilla, hoja, fruto maduro, aceite de la semilla y corteza)^{37,48} y ha sido utilizado como cosmético herbal (Eficaz en infecciones de la piel, erupciones cutáneas y espinillas, refuerzo de la inmunidad y antiobesidad).⁶⁹

Han sido estudiados la mayoría de sus órganos vegetales y el aceite esencial extraído de varios de estos, mostrando las mayores potencialidades la hoja, la semilla y el aceite esencial extraído de esta última.

Un gran número de los componentes químicos aislados también han sido evaluados desde el punto de vista biológico, demostrándose sus propiedades, entre las que se pueden citar:

- **AZA:** Se considera un fitotóxico de amplio espectro, de bajo efecto residual, sin toxicidad para los seres humanos y al medio ambiente. Es uno de los dos principios biocidas más estudiados y de mayor concentración en esta especie. Es un 90 % efectivo sobre la mayoría de los parásitos y cerca de doscientas especies de insectos nocivos para las plantas.⁴⁷ Se ha reportado su acción antimalárica.⁷⁰ Interfiere en la metamorfosis de las larvas de los insectos interrumpiendo su desarrollo.⁷¹ Su poder insecticida se ha confirmado en 500 especies de insectos plaga y su baja toxicidad en campo para vertebrados e insectos benéficos (parasitoides, abejas y depredadores) ha sido remarcada. La azadiractina y los otros limonoides de las semillas inhiben la enzima que cataliza el último paso del proceso que convierte a la ecdisona en la hormona activa 20-hidroxiecdisona. Entre sus efectos se destacan la inhibición del apareamiento y la comunicación sexual, impedimento de la ovoposición y la eclosión de huevos, esterilidad en adultos, bloqueo de los pasos de mudas necesarias para entrar a la siguiente etapa del desarrollo, efecto antialimentario y el bloqueo de la síntesis de quitina.⁷²

- **Azadiradiona:** Muestra una significativa actividad antinociceptiva y antiinflamatoria.⁴⁹ También han sido demostradas sus propiedades antifúngica, antimalárica, antidiabética, antimicobacterial, antiulcerosa y para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.⁷³

- **Gedunina:** Posee actividad antifúngica⁵⁰ y antimalárica.⁷⁴

- **Compuestos de azufre,** como el tetrasulfuro cíclico y el trisulfuro: Muestran actividad antifúngica frente a *Trichophyton mentagrophytes*.⁵³

- **Nimbina y nimbidina:** Estos dos componentes poseen actividad antiviral, por lo cual han tenido gran éxito empleándolos contra el virus de la papa y de las enfermedades

venéreas de las aves, es decir evita las enfermedades virales de las cosechas y del ganado. Además, de la nimbidina han sido demostradas sus propiedades antiinflamatoria, antiartrítica, antipirética, hipoglicemiante, antiulcerosa, antifúngica, antibacteriana, espermicida, analgésica y diurética. Estudios realizados sugieren que este compuesto suprime las funciones de los macrófagos y neutrófilos relevantes para la inflamación. La nimbina es espermicida, antihistamínica, antiinflamatoria, antimicótica y antiséptica.^{37,55,56}

- **Nimbolida:** Muestra actividad antimalárica porque previene el crecimiento del *Plasmodium falciparum*.⁷⁴ También ha sido reportada su acción antibacteriana.³⁷
- **Fitosteroles:** Posee acción antiulcerosa.³⁷
- **Nimbidol:** Es antituberculoso y antiprotozoario.⁵⁵
- **Quercetina:** Es antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana.⁵⁵
- **Aceite de la semilla:** Es repelente de insectos, antifúngico, antibacterial y antiinflamatorio. Efectivo en el tratamiento del acné, quemaduras, herpes, llagas y psoriasis, además reduce el prurito, enrojecimiento, dolor y costra como consecuencia de estas afecciones.⁷⁵

I.1.1.1.5 Antecedentes de estudios científicos con la especie

Esta especie vegetal ha sido estudiada extensamente desde el punto de vista científico, debido a los diversos usos tradicionales que se le han atribuido a lo largo de la historia y la identificación de varios compuestos químicos que justifican sus propiedades biológicas. Algunos de estos se resumen a continuación:

Labrada y colaboradores (2018) reportaron la evaluación de diferentes niveles de radiación gamma (1, 5, 10, 20 y 25 kGy) sobre características organolépticas, físicas y químicas y algunos parámetros de calidad del aceite esencial de los frutos de esta especie. Los niveles de irradianza evaluados estimularon variaciones en función de las dosis aplicadas, sin embargo, no modificaron significativamente ($p \geq 0,05$) ninguna de las variables contempladas en el estudio y las características organolépticas se mantuvieron invariables con respecto al control. Se comprobó la formación de otros compuestos utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Se concluye que los niveles de radiaciones establecidas no modifican significativamente las

propiedades físicas y químicas del aceite esencial y tampoco se forman moléculas más complejas que puedan alterar las propiedades del mencionado aceite.⁷⁶

Arinze y Alumanah (2018) informaron sobre la influencia del método de secado al sol sobre la composición química de un extracto acuoso por decocción de las hojas de esta especie, usando métodos fitoquímicos estándar [Químico y Cromatografía en Capa Delgada (CCD)]. Como resultado se obtuvo que los extractos de la hoja fresca y seca contienen azúcares reductores, flavonoides (Quercetina, quercetina-3-rutinósido y quercetina-3-ramnósido), saponinas, antraquinonas, taninos, aglicona esteroideal, glicósidos cardíacos y cianogénicos, terpenoides y azúcares (Fructosa, ramnosa, xilosa y manosa). También se detectó la presencia de vitamina C en el extracto de las hojas frescas, pero no en el de hojas secas, mostrando que el secado afecta los constituyentes fitoquímicos de esta planta medicinal.⁷⁷

Priyanka y colaboradores (2017), reportaron una caracterización fitoquímica y bioquímica de la hoja de esta especie. El análisis fitoquímico de los extractos en metanol y en agua mostró la mayor concentración de glicósidos cardíacos y saponinas respectivamente; mientras que las menores concentraciones fueron para las saponinas en el extracto en metanol y alcaloides, flavonoides y azúcares reductores para el extracto acuoso. En cuanto a los parámetros bioquímicos, la estimación del contenido de prolina mostró valores altos (25 µg), planteándose la importancia de este resultado, pues este compuesto juega un papel fundamental en el funcionamiento de las articulaciones y los tendones, es terapéuticamente importante para enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer's y Parkinson, Diabetes Mellitus tipo 2 y Policitemia Vera. El contenido de clorofila fue de 59, 148 µg/mL, mientras que el de carbohidratos en base a la glucosa, fue bajo.⁴⁶

Serrato y colaboradores (2014), publicaron sus resultados en cuanto a la evaluación de la actividad antibacteriana e insecticida de extractos de la semilla. Partieron de la obtención de los extractos, los que tuvieron rendimientos variables. El mayor valor se obtuvo utilizando el acetato de etilo en Soxhlet con la pepita de la semilla (5,2 g/10 g de peso seco). Los extractos con mayor efecto antimicrobiano fueron los de tipo Soxhlet (de etanol y de acetato de etilo) en las bacterias *Proteus mirabilis*, *Salmonella*

sp. y *Shigella* sp., seguido por el macerado metanol-cloroformo en las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* y el acuoso con efecto sólo sobre la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. El mayor efecto insecticida (100 %) sobre *Acanthoscelides obtectus* Say (gorgojo del frijol) fue producido por el extracto concentrado de la semilla en acetato de etilo y la dilución 1:1 en etanol absoluto, en las aplicaciones de aspersión directa y en grano, seguidos por la aplicación en dieta, donde causó una mortalidad de 90 y 86,6 % para estos mismos tratamientos, respectivamente. Con lo anterior se observa que la efectividad de este extracto es mejor si se aplica directamente. En la aplicación de etanol, considerado como control, no sobrepasó el 20 % de mortalidad en las distintas aplicaciones.⁷⁸

Isea y colaboradores (2013), publicaron una revisión sobre el efecto garrapaticida de esta especie vegetal. Se concluyó que la hoja o la semilla pueden ser utilizadas con potencial éxito en el control de garrapatas en diferentes especies animales. Los extractos acuosos de hoja o de semilla, de disolventes orgánicos o el aceite de la semilla, parecen tener efectos tóxicos dosis-dependientes, letales y directos, sobre garrapatas adultas, ninfas, larvas y huevos; pero también efectos sobre el ciclo reproductivo, como disminución de la masa de huevos y modificación del número y tiempo de eclosiones. Cuando se emplea la semilla para obtener extractos en agua, concentraciones de 5 a 10 % (m/v) han sido eficaces, mientras que con la hoja requieren ser probablemente de al menos 15 % (m/v), para obtener un efecto tóxico letal directo sobre el parásito adulto. Con concentraciones inferiores podrían conseguirse efectos tóxicos sobre su reproducción. Los extractos con el aceite de la semilla, o de disolventes orgánicos de hoja o de semilla, parecen tener similar eficacia a concentraciones inferiores al 5 % y los extractos acuosos de hoja fresca o seca han mostrado efectos garrapaticidas.⁴⁸

Otro reporte sobre la evaluación del efecto insecticida del extracto en etanol de la semilla sobre ninfas de la chinche de los pastos (*Collaria scenica* Stal.) informa por primera vez en la literatura que la AZA contenida en este extracto a concentraciones entre 50 y 250 ppm resulta tener un importante efecto sobre esta. El tratamiento a 250 ppm resultó ser el más eficaz, presentando la mayor mortalidad, el menor número

de exuvias y adultos. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tres tratamientos experimentales, reafirmando la eficacia de este compuesto sobre *C. scenica*. El extracto parece actuar como inhibidor del desarrollo de las ninfas, reduciendo la ecdisis hasta en un 50 % y causando alteraciones como mudas incompletas que terminan ocasionando la muerte del insecto antes que este pueda completar su desarrollo y reproducirse.⁷²

Esparza y colaboradores (2010), informaron sobre la concentración de AZA en cuatro extractos elaborados a partir de la semilla de esta especie vegetal y su efectividad insecticida sobre *Aphis gossypii* Glover, así como posibles efectos tóxicos sobre *Ixora coccinea* L. Para ello se compararon los extractos por extrusión simple, extrusión metanólica en frío (metanólico), Soxhlet-hexano (hexánico) y acuosa (acuoso). Los análisis de los extractos por CLAR mostraron concentraciones significativamente diferentes de 2478, 565, 422 y 150 ppm de AZA en el extracto de metanol, de hexano, oleoso y en agua, respectivamente. El bioensayo para determinar el efecto insecticida y la fitotoxicidad de los extractos consistió en exponer 10 ninfas de *A. gossypii* a hojas de *I. coccinea* tratadas con cada extracto a dosis de 0,01; 0,1 y 0,2 mg de AZA en 5 cm² y un testigo con agua, con tres repeticiones. La mortalidad se midió a 24, 48 y 72 h. Sólo el extracto oleoso produjo lesiones en 35 % del área foliar tratada con daño medio y nivel cinco de fitotoxicidad en *I. coccinea*. Se encontraron diferencias significativas en la mortalidad de *A. gossypii* por tipo de extracto, tiempo y dosis, así como en las interacciones dosis tiempo y dosis tipo de extracto. El extracto con el mayor potencial insecticida fue el de metanol (0,2 mg AZA), con 100 % de mortalidad a 48 y 72 h. La aplicación simultánea del metanol en extrusión extrae más AZA de la semilla, lo que promueve una mayor actividad insecticida.⁷⁹

Se realizó un estudio clínico en seis semanas para verificar la eficacia del gel dental del extracto de neem con enjuague bucal de gluconato de clorhexidina (0,2% m/v) como control positivo. Los resultados mostraron que el gel dental redujo significativamente el índice de placa y recuento bacteriano en comparación con el grupo control.⁸⁰

La administración del polvo liofilizado del extracto de la corteza durante 10 días a la dosis de 30 mg dos veces al día mostró una disminución significativa (77 %) de la

secreción de ácido gástrico. El extracto de la corteza a la dosis de 30-60 mg dos veces al día durante 10 semanas curó casi por completo las úlceras duodenales, un caso de úlcera esofágica y un caso de úlcera gástrica cicatrizó completamente cuando se administró a la dosis de 30 mg dos veces al día durante 6 semanas.⁸¹

I.2 Estudios de calidad de extractos vegetales. Características e importancia

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica clínica que se utiliza desde la antigüedad. Esto ha condicionado que en la actualidad se profundice en el conocimiento y estudio de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales, lo que es propiciado, no sólo por el regreso a lo natural que ocurre de forma general en la sociedad, sino también por la creciente evidencia sobre su seguridad y eficacia.⁸²

Muchos de los productos a base de plantas medicinales se promocionan con las características de curar diferentes padecimientos; sin embargo, la mayoría no incluye la información científica necesaria que garantice su calidad, es decir, que se tomen en cuenta factores extrínsecos e intrínsecos para su producción, como son, en el caso de los extrínsecos, una correcta identificación y autenticación de la planta, impurezas que pueda contener (plaguicidas, micotoxinas y demás sustancias tóxicas) asociadas a toda la cadena de producción; así como factores intrínsecos, entre ellos el tipo de metabolitos y la proporción de éstos, los cuales contribuyen a la actividad terapéutica o a la toxicidad. Las anteriores consideraciones son fundamentales para establecer la calidad de las plantas medicinales o de los productos elaborados a base de estas y la calidad incide directamente en su eficacia y seguridad (inocuidad), razón por la que representan un enorme desafío para las autoridades de salud que tienen que regularlas.⁸³

En los medicamentos a base de plantas medicinales, la **calidad** es un requisito básico, no sólo por su significación intrínseca, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros de seguridad y eficacia.⁸² La calidad, de acuerdo con la norma NOM-001-SSA-2010, se define como el “cumplimiento de especificaciones establecidas para garantizar la aptitud de uso”.⁸³

Como los medicamentos a base de plantas son mezclas complejas que se originan a partir de fuentes biológicas, se necesitan grandes esfuerzos para garantizar una calidad constante y adecuada. Al seleccionar cuidadosamente el material vegetal y un proceso de fabricación estandarizado, el patrón y la concentración de los componentes de los medicamentos a base de plantas deben mantenerse lo más constante posible, ya que este es un requisito previo para obtener resultados terapéuticos reproducibles.⁸²

El control de la calidad de las drogas vegetales y sus derivados (extractos y formas farmacéuticas terminadas), garantiza su identidad, pureza (ausencia de contaminantes, falsificaciones o adulteraciones) y contenido en principios activos o marcadores. Las exigencias concernientes al control de la calidad, así como los métodos a utilizar, se recogen principalmente en las Farmacopeas⁸⁴, así como en normas nacionales e internacionales, monografías de la OMS y científicas.⁸³

Los medicamentos a base de plantas y los productos derivados de estos son un grupo diverso para los que hay disponibles diferentes (y a menudo limitados) niveles de evidencia. El aseguramiento de la calidad basado en los esquemas existentes depende en gran medida de los controles en las etapas finales de producción y, al menos para aquellos productos para los que existen monografías, de procedimientos analíticos sólidos.⁸⁵

Se estima que hasta la fecha se encuentran documentadas 28,187 especies vegetales con usos medicinales y de éstas, sólo se encuentran inscritas en farmacopeas un porcentaje menor (aproximadamente 16 %), lo que evidencia que se deben hacer mayores esfuerzos en la regulación para controlar y garantizar una mayor calidad de las plantas que serán usadas como productos herbolarios.⁸³

Como la calidad de los fitofármacos es el parámetro clave para la seguridad y la eficacia, es importante caracterizar varios constituyentes o grupos de constituyentes y definir rangos adecuados. Los componentes especificados deben tener relevancia para la seguridad y la eficacia y representar una parte sustancial del medicamento a base de plantas. En el futuro, debería ser posible caracterizar y etiquetar aún más los medicamentos a base de plantas para la transparencia y el control, incluso más allá de las monografías farmacopeicas.⁸⁴

I.2.1 Parámetros de calidad de extractos vegetales

Con el objetivo de determinar si los extractos vegetales elaborados poseen los requerimientos de calidad necesarios para su aplicación farmacéutica u otras, se les determinan algunos parámetros de calidad físicos y físico-químicos, como establece la Norma Ramal de Salud Pública 312,⁸⁶ tales como:

- **Requisitos organolépticos:** Permiten determinar color, olor y sabor de un determinado extracto y analizar si son característicos de ellos, en caso de conocerse.
- **Potencial hidrogeniónico (pH):** Permite conocer la concentración de iones hidronio o hidroxilos, cuyo control es necesario para garantizar la estabilidad del extracto (y su compatibilidad con otras sustancias, en caso de formar parte de una forma farmacéutica o con el sitio de aplicación o con las vías de absorción, si constituye un medicamento herbario).
- **Índice de refracción:** Mediante esta determinación se conoce el número de impurezas presentes y la transparencia del extracto.
- **Densidad relativa:** Mediante esta determinación se conoce la masa de sustancia por unidad de volumen con respecto a la masa de un volumen igual de agua a 4⁰C.
- **Sólidos totales:** Permite determinar la cantidad total de sólidos disueltos en el extracto.
- **Contenido alcohólico:** Este análisis ofrece el dato del contenido alcohólico que posee la disolución. Esta determinación es muy importante, pues la proporción de alcohol varía durante el proceso extractivo, por su evaporación, por el contenido de humedad de la droga y por la extracción propiamente de los compuestos solubles.
- **Análisis capilar:** Esta determinación posibilita identificar mediante el análisis de la imagen obtenida (en la que se distinguen 4 zonas: franja, sub-franja, banda y sub-banda) la que puede o no variar su coloración y su altura, los componentes en cuestión que posee el extracto.⁸⁷

Desde el punto de vista químico también se determinan parámetros de calidad, como la identificación de los principios activos, tanto de forma cualitativa como cuantitativa. La identificación cualitativa se basa en el desarrollo de reacciones químicas donde, de forma general, la aparición de un determinado color o formación de un precipitado, es

indicativo de la presencia de una clase de metabolito secundario. Esta técnica no da un criterio absoluto sobre determinados constituyentes, porque pueden ocurrir diversas interferencias, pero permite poseer una idea sobre la posible presencia de estos.⁸⁷

Otros parámetros químicos permiten cuantificar clases de metabolitos secundarios sobre la base del resultado que se obtiene en el ensayo cualitativo. Entre estas técnicas se pueden citar: cuantificación de fenoles totales,⁸⁸ flavonoides totales⁸⁹ y azúcares reductores totales,⁹⁰ entre otros.

Otras determinaciones que contribuyen al establecimiento de parámetros de control de la calidad para los extractos vegetales, son: Los estudios de cromatografía en capa delgada, los que proporcionan en algunos casos información valiosa adicional para establecer su identidad, como la presencia de marcadores químicos. Esta técnica resulta fácil de realizar, efectiva y poco costosa. Para cada determinación debe establecerse la fase estacionaria, la fase móvil y método de detección, mientras que para las bandas o manchas de interés obtenidas se reportan sus razones de flujo, color y fluorescencia.⁹¹ Esta técnica combinada con un análisis espectrofotométrico (Huella espectral), permite obtener los espectros de absorción y la longitud de onda máxima para cada banda de interés, así como para el extracto total, lo que contribuye a la caracterización química de los extractos.⁹²

La calidad microbiológica también debe ser determinada, pues garantiza la ausencia de microorganismos patógenos, permite valorar la carga microbiana presente y así evitar los riesgos a la salud.⁹³

Capítulo II. Materiales y Métodos

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Características generales de la investigación

El trabajo que se desarrolló consiste en un estudio prospectivo y experimental para evaluar la calidad del extracto en etanol de la hoja de *Azadirachta indica* A. Juss.

Se realizó en los laboratorios de Tecnología Farmacéutica y MEDICUBA/SUIZA del Departamento de Farmacia de la Universidad de Oriente y en la empresa Laboratorio Biológico-Farmacéutico (LABIOFAM) de Mayarí-Holguín, en el período de tiempo comprendido entre Febrero y Junio del 2020.

II.2 Recolección y procesamiento del material vegetal

Las hojas se recolectaron en el poblado Franco-Chavaleta Sur del municipio Mayarí, en la provincia Holguín, previa identificación taxonómica en el Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO) de la ciudad de Santiago de Cuba por el Lic. Jainer Costa Acosta.

Se recolectaron cuatro lotes del material vegetal (1 Kg cada uno) de una población de más de 20 individuos; en dos días consecutivos, dos en la sesión mañana y dos en la tarde, garantizando la recogida de las hojas en lugares diferentes de la zona, según cada lote. Las hojas se limpiaron adecuadamente y se garantizó la no presencia de materia inorgánica y orgánica extraña. Estas se sometieron a un proceso de secado al sol de acuerdo a lo establecido en la empresa LABIOFAM Mayarí-Holguín. Se consideraron secas las hojas cuando tres pesadas consecutivas no difirieron en más de 0,5 mg.⁹¹

II.3 Elaboración del extracto etanólico

Se elaboraron cuatro lotes del extracto etanólico de la hoja, de acuerdo a la metodología establecida en el Proceso tecnológico P 15-2-02-005⁹⁴ de la empresa LABIOFAM Mayarí-Holguín.

Se utilizaron tres litros de etanol 96 % por un kilogramo de hojas secas. Posteriormente se mezclaron y se agitaron por 24 horas en el reactor mezclador con capacidad para 10 L. Esta operación fue realizada por un operario, según P15-2-02-018 “Uso del reactor mezclador”.⁹⁴ Luego se filtró al vacío la disolución obtenida

empleando embudo Büchner. Se acumuló el filtrado en el tanque colector para luego envasar y etiquetar según modelo SG 1402 en frascos ámbar.

II.3.1 Determinación de los parámetros de calidad

A los cuatro lotes se les determinaron parámetros de calidad físicos, físico-químico y químico cualitativo y cuantitativo.

II.3.1.1 Determinación de parámetros físicos y físico- químicos

- Características organolépticas

Se determinó el olor y color según la metodología establecida en la NRSP 312.⁸⁶

Determinación del olor: Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de anchura por 10 cm de longitud y fue introducida en un extremo en la muestra de ensayo. Se olió y se determinó si correspondía con las características del producto.

Determinación del color: Se tomó un tubo para ensayos, bien limpio y seco, se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas.

pH: Se determinó según se establece en la NRSP 312.⁸⁶ Se realizó por triplicado. Los resultados se aproximaron hasta la centésima y se informaron los valores promedios $\pm$ la desviación estándar (S). Se utilizó un pH-metro digital (OP-211/1, Alemania) con electrodo combinado de vidrio y calomel. Para su calibración se empleó solución buffer (UNI-CHEM) de pH=7.⁸⁶

Determinación de sólidos totales: De la muestra de ensayo previamente homogenizada se transfirió 5 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se colocó en un baño de agua (marca VEB- MLW de procedencia alemana) y se evaporó hasta que el residuo estuvo aparentemente seco. Posteriormente se pasó a una estufa (MIM, Hungría) a una temperatura de 105 ± 2 °C durante 3 horas. Se retiró la cápsula de la estufa, se colocó en una desecadora hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se pesó. Después se repitió el proceso anterior, pero empleando solo 60 minutos de secado, las veces necesarias, hasta obtener un peso constante.

Los sólidos totales (S_t) se calcularon mediante la **ecuación matemática 1**:

$$S_t = \frac{(Pr - P)}{V} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

Pr → masa de la cápsula más el residuo (g).

P → masa de la cápsula vacía (g).

V → volumen de la porción de ensayo (mL).

100 → factor matemático.

El ensayo se realizó por triplicado.⁸⁶ Los resultados se aproximaron hasta la centésima y se informaron las medias de los porcentajes de los sólidos totales $\pm S$.

Determinación de la densidad relativa: De la muestra de ensayo se tomó la cantidad necesaria de acuerdo con la capacidad del picnómetro y se enfrió a 25 °C. Se pesó el picnómetro limpio, vacío y seco con un error máximo permisible de $\pm 0,5$ mg y se llenó con la muestra de ensayo de modo que no quedaran burbujas de aire, se empleó una tira de papel de filtro para extraer el exceso de muestra. Se sumergió en un baño de agua (marca VEB- MLW de procedencia alemana) a 25 ± 1 °C durante 30 min, al cabo de las cuales se tapó, se secó exteriormente cuidando de no frotar excesivamente o de transmitir el calor de la mano y se pesó. Se vació el picnómetro, se lavó con alcohol etílico y posteriormente con agua, repitiéndose el ensayo con agua enfriada a 25 °C. Las pesadas se realizaron en una balanza analítica marca SARTORIUS de procedencia alemana.

La densidad relativa (Dr) se calculó mediante la **ecuación matemática 2**:

$$D = \frac{(m_1 - m)}{(m_2 - m)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

m → masa del picnómetro vacío (g).

m_1 → masa del picnómetro con la muestra de ensayo (g).

m_2 → masa del picnómetro con agua (g).

El ensayo se realizó por triplicado.⁸⁶ Los resultados se aproximaron hasta la centésima y se informaron los valores promedios $\pm S$.

- **Determinación del índice de refracción:** Sobre el prisma de medición de un refractómetro de Abbe (Suiza) se colocó una gota de agua, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tiene cantos agudos, se esperó unos minutos y se ajustó el instrumento al índice de refracción correspondiente al agua a una temperatura de 25 °C, con una tolerancia de $\pm 0,2$ °C. Se limpiaron los prismas cuidadosamente empleando un algodón humedecido con disolución de alcohol y éter etílico (50 % v/v). Con la varilla de vidrio se colocó en el prisma fijo, sin tocarlo, una o dos gotas de la muestra de ensayo. Se cerró el doble prisma y se esperaron unos minutos antes de efectuar la lectura, hasta que la temperatura fue estable.

Como la muestra de ensayo es de color oscuro u opaco, se utilizó luz reflejada, o sea, se colocó una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cerró el termoprisma y se enfocó la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incidiera sobre la abertura de entrada del prisma de medición.

Se hicieron tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas, informándose este $\pm$ S. Los resultados se aproximaron hasta la milésima.⁸⁶

- **Análisis capilar:** Se vertieron 20 mL de la muestra de ensayo en un vaso para precipitado de 100 mL, de aproximadamente 5 cm de diámetro y 70 cm de altura y se introdujo en la cámara protectora.

Se colocó una banda de papel de filtro (Whatman # 1) de 4 cm de altura por 15 cm de longitud, verticalmente de manera que su borde superior fue fijado a una varilla metálica que permitió la suspensión de la tira de papel y su extremo inferior fue sumergido dentro de la muestra de ensayo, pero sin tocar el fondo ni las paredes del recipiente. Se cerró la cámara y se dejaron transcurrir 2 horas garantizando la temperatura de 25 ± 1 °C durante la corrida, finalizada esta se retiró el papel y se dejó secar. Una vez seco se procedió a su inspección visual y caracterización.

Para el análisis e interpretación de la imagen se tuvieron en cuenta los aspectos siguientes:

1. Color.
2. Altura.
3. Descripción de las diferentes partes.

4. Cambios de coloración con vapores de amoníaco.

5. Examen bajo luz ultravioleta (UV).

En dependencia de la tonalidad que predominó, **el color** de la imagen en conjunto se definió como:

- _ Vivamente coloreada.
- _ Poco coloreada.
- _ Muy poco coloreada.

Si los colores característicos de cada zona son fácilmente detectables, estos se detallaron.

La altura de una imagen capilar se determinó midiendo con una regla graduada en cm del borde inferior del papel hasta la franja clasificándose en:

- Alta → de 8,0 cm en adelante.
- Normal → entre 5,0 y 8,0 cm.
- Baja → menos de 5,0 cm.

Descripción de las diferentes partes: Se describieron e informaron la forma que tienen la franja y las características de la subfranja, banda y subbanda.

En el análisis de la imagen se identificaron 4 zonas:

1. **Franja:** Límite superior de ascensión del líquido.
2. **Subfranja:** Región generalmente poco coloreada, comprendida entre la franja y la zona superior de la banda.
3. **Banda:** Zona generalmente pigmentada debido a la presencia de sustancias coloreadas.
4. **Subbanda:** situada debajo de la banda hasta el límite de inmersión.

Cambios de coloración con vapores de amoníaco: Se expuso la imagen capilar a los vapores de amoníaco y se observaron e informaron los cambios de coloración.

Examen bajo la luz ultravioleta: Después de la corrida, la tira de papel bien seca se expuso a la luz ultravioleta (RAY LEIGH UV-2601, China) a 365 nm. Se observó e informó la fluorescencia de las diferentes zonas de la imagen.⁸⁶

II.3.1.2 Determinación de los parámetros químicos

- Determinación cualitativa de metabolitos

Para la determinación cualitativa se emplearon las reacciones químicas descritas en la técnica de tamizaje fitoquímico,⁸⁷ para las siguientes clases de metabolitos secundarios: Alcaloides (Dragendorff, Mayer, Wagner), triterpenos y esteroides (Liebermann-Burchard, Solkowsky y Rosemheim), quinonas (Borntrager y variante con benceno), cumarinas (Baljet, Legal, hidroxamato férrico), saponinas (espuma), azúcares reductores (Fehling y Benedict), fenoles y taninos (cloruro férrico, gelatina y cafeína), aminoácidos y aminas libres (Ninhidrina), flavonoides (Shinoda, ácido sulfúrico concentrado, Rosemheim y álcalis), resinas (ensayo de resinas) y aceites esenciales y sustancias grasas (Sudán III y papel).

Estos ensayos ofrecen un criterio cualitativo general de la composición química que pueda existir en un extracto vegetal, no obstante, este no es absoluto, ni confirmativo de la presencia de estos compuestos; pues se pueden producir numerosas interferencias en estas reacciones, producto de la presencia en el medio de otras sustancias (metabolitos secundarios o no), capaces de reaccionar en forma similar, provocando reacciones falsas positivas.⁸⁷

- Determinación cuantitativa de metabolitos

Cuantificación de flavonoides totales: Se realizó empleando el método de Kumazawa.⁸⁹ Se fundamenta en que el catión de aluminio forma complejos estables de color amarillo con los flavonoides, que producen en el análisis espectrofotométrico un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales.

Este método consistió en mezclar una alícuota de 500 µL de la disolución madre (0,01 g/mL en agua destilada) de cada uno de los cuatro lotes de los extractos en etanol, con 500 µL de la disolución etanólica de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2 %. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente de las muestras y el blanco, la

absorbancia fue medida a 420 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10S, de procedencia americana.

A partir de una disolución patrón de quercetina (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich®) se construyó la curva de calibración a concentraciones entre 5-25 µg/mL. El contenido de flavonoides totales fue calculado como miligramos equivalentes de quercetina/g de droga seca. Se utilizó la **ecuación matemática 3**. Este procedimiento se realizó por triplicado. Los valores presentados corresponden a la media ± S.⁸⁹

$$mg/g = \frac{\text{Concentración de flavonoides} \left(\frac{mg}{mL} \right) \times \text{Factor de dilución}}{\text{masa de la muestra (g)}}$$

(Ecuación 3)

II.3.1.3 Determinación de la huella espectral en el UV

Para la determinación en la región UV-Visible (400-800 nm), 1 mL de cada uno de los lotes de los extractos se disolvieron en 10 mL de etanol. Para la determinación en la región UV (200-500 nm), se disolvieron 0,5 mL en 25 mL de etanol. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz RAY LEIGH UV-2601 (China) y se empleó como blanco el disolvente etanol.⁹⁵

II.4 Análisis estadístico y procesamiento de los resultados

Para el procesamiento de los resultados y análisis estadístico se empleó el software Microsoft Excel contenido en el paquete Microsoft Office 2016 y el STATGRAPHICS Centurion versión 15.2.14.

En la evaluación de la calidad de los extractos en etanol se compararon los valores de cada uno de los parámetros determinados en los cuatro lotes en estudio a través de un análisis de varianza de clasificación simple. Las diferencias entre los lotes fueron determinadas por el Test de Mínimas Diferencias Significativas de Tukey (HSD), para un 95 % de intervalo de confianza. Se informaron los intervalos de confianza para cada parámetro determinado.

Capítulo III. Resultados y Discusión

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Recolección y procesamiento del material vegetal

En el Anexo I se muestran los resultados de la identificación taxonómica a la especie vegetal, corroborando que se trabajó con *Azadirachta indica* A. Juss.

Las hojas recolectadas en cada uno de los cuatro lotes poseen un color verde oscuro, lo que coincide con resultados de la literatura,⁹⁶ así como la ausencia de materia orgánica e inorgánica extraña.

El tiempo de secado para cada uno de los cuatro lotes de la droga vegetal fue de cinco días, lo que coincide con la experiencia de trabajo de LABIOFAM Mayarí. La droga seca en los cuatro lotes mostró una coloración verde claro y fácil trituration al tacto.

III.2 Elaboración del extracto en etanol

Se obtuvo un litro (1 g/mL) de cada uno de los cuatro lotes del extracto en etanol a partir de las hojas secas de la especie.

Durante el proceso de elaboración de cada uno de los cuatro lotes de extracto, la droga seca se mezcló con facilidad con el etanol en el reactor mezclador. Este proceso facilitó la distribución homogénea de la droga en el menstuo y por tanto el contacto adecuado para garantizar la difusión de los constituyentes y la calidad del proceso extractivo. La agitación y el tiempo establecido para esta operación son factores que favorecieron la permeabilidad de la pared celular del material vegetal y la difusión del disolvente hacia el interior de la célula vegetal para así conseguir extraer los componentes presentes en la hoja. El movimiento constante del disolvente durante el proceso extractivo contribuyó a reducir el tiempo de operación y facilitar una extracción más completa de la droga.⁹⁷ La elaboración a temperatura ambiente favoreció la no ocurrencia de pérdidas del disolvente debido a su volatilidad y evitó la posibilidad de la degradación de metabolitos termolábiles.⁹¹ El control de todas estas operaciones contribuyó a la obtención del extracto final en cada lote con calidad.

Teniendo en cuenta, que durante el proceso de elaboración de productos farmacéuticos uno de los aspectos importantes a considerar para asegurar su calidad es el control del proceso tecnológico, que permite efectuar correcciones y por tanto minimizar la fabricación de un producto defectuoso; se recomienda la determinación de los parámetros pH e índice de refracción, una vez estandarizados, los cuales son fáciles de determinar y los resultados se obtienen de forma rápida. Estas

determinaciones las podría realizar el operario responsable del proceso tecnológico. El control de estos parámetros en la etapa de producción constituye una garantía de la calidad del producto final.⁹⁸

III.2.1 Determinación de los parámetros de calidad al extracto en etanol

III.2.1.1 Determinación de parámetros físicos y físico- químicos

- Características organolépticas

Los cuatro lotes de los extractos en etanol mostraron un olor característico a la hoja, color verde oscuro, transparencia y homogeneidad.

No se encontraron referencias bibliográficas sobre las características organolépticas de extractos de la hoja u otros órganos de esta especie para la comparación con estos resultados. No obstante, las características obtenidas coinciden con muchos extractos vegetales en etanol aprobados en nuestro país con fines terapéuticos.⁹⁹

- pH

La tabla I muestra los resultados de los valores promedios del pH y la desviación estándar, obtenidos para cada lote de los extractos en etanol de la hoja de la especie.

Tabla I: Valores promedios y desviación estándar (S) del pH en cada Lote

Lotes	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
pH± S	6,04± 0,03 ^a	5,95± 0,01 ^b	6,18± 0,01 ^{c,d}	6,17 ± 0,01 ^{d,e}

Letras distintas significan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

Como se puede observar en la tabla I, los valores de pH de los cuatro lotes del extracto en etanol reflejan las características ácidas débiles de las sustancias que se extraen, como son los compuestos fenólicos (taninos y flavonoides), vitamina C,⁷⁷ entre otros. Estas características ácidas débiles han sido reportadas por varios autores. Entre estos, Reyes y colaboradores (2017),¹⁰⁰ evaluaron el pH a extractos en agua de la hoja seca y fresca por el método de infusión, a diferentes tiempos de elaboración (cero, tres, cinco, ocho, diez, 12 y 15 minutos). Todas las determinaciones evidenciaron estas características, las que disminuyen al incrementar el tiempo de infusión tanto para la droga seca [6,91±0,03 (cero minutos) a 6,29±0,006 (15 minutos)] como la fresca [6,76±0,025 (cero minutos) a 5,74±0,010 (15 minutos)], lo que se atribuyó al aumento de la extracción de los compuestos fenólicos que poseen carácter ácido.

Los lotes 3 y 4 poseen los valores de pH más cercanos, lo que fue corroborado por el análisis estadístico, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre

estos con un nivel del 95 % de confianza. Sin embargo, sí existen diferencias estadísticas de estos dos con respecto a los lotes 1 y 2 para el mismo nivel de confianza (Tabla I, Anexos 2 y 3). Además, se observa la mayor acidez para el lote 2, lo que pudiera indicar que en este extracto están presentes sustancias que aportan estas características, a diferencia de los lotes restantes.

En el anexo 4 se recogen los intervalos de confianza (95 %) para este parámetro.

De forma general, las características ácidas débiles obtenidas en los cuatro lotes caracterizan a muchos extractos en etanol aprobados en Cuba para uso terapéutico.⁹⁹

- Sólidos totales

La tabla II muestra los resultados de los valores promedios de los sólidos totales y la desviación estándar para los cuatro lotes del extracto en etanol de las hojas de la especie.

Tabla II: Valores promedios y desviación estándar de los sólidos totales (S_t) en cada lote

Lotes	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
$(S_t) (\%) \pm S$	5,84 $\pm$ 0,05 ^a	5,89 $\pm$ 0,06 ^a	6,04 $\pm$ 0,29 ^a	6,11 $\pm$ 0,23 ^a

Letras iguales significan no diferencias estadísticas ($p > 0,05$)

Como se muestra en la tabla II, los porcentajes de los sólidos totales determinados en los cuatro lotes indican la presencia de compuestos extraídos con etanol 96 %. A pesar de que el lote 4 presenta el mayor valor, el análisis realizado no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro lotes, con un nivel del 95 % de confianza (Tabla II, Anexos 5 y 6).

Se encontró un solo reporte bibliográfico relacionado a este parámetro en un extracto derivado de la hoja de esta especie. Esta referencia informa sobre la determinación de los sólidos totales a extractos en agua de la hoja seca y fresca elaborados por el método de infusión a diferentes tiempos (cero, tres, cinco, ocho, diez, 12 y 15 minutos). Como resultado, solo se cuantifica en el extracto de la hoja seca a partir de los cinco minutos de elaboración de la infusión, con valores de 0,5-1 grados Brix ($^{\circ}\text{Bx}$),¹⁰⁰ los que son muy inferiores a los obtenidos en este trabajo.

En el anexo 7 se recogen los intervalos de confianza (95 %) para este parámetro.

Los extractos vegetales suelen poseer diferentes porcentajes de sólidos totales, pues este parámetro depende de la composición química de cada especie vegetal y de la

solubilidad de sus constituyentes en los menstruos que se utilizan para su elaboración.⁹¹

- Densidad relativa

La tabla III recoge los resultados de los valores promedios y la desviación estándar de la densidad relativa para los cuatro lotes de los extractos en etanol.

Tabla III: Resultados de los valores promedios y la desviación estándar de la densidad relativa en cada lote

Lotes	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Densidad relativa (g/mL) ± S	0,90 ± 0,04 ^a	0,91 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,01 ^a

Letras iguales significan no diferencias estadísticas ($p > 0,05$)

Como se muestra en la tabla III, los valores de la densidad relativa para cada uno de los cuatro lotes de los extractos son superiores al del etanol 96 % (0,799 g/mL), lo que demuestra la presencia de compuestos extraídos.

Existe similitud en los valores de este parámetro para los cuatro lotes, lo que se confirma con el ANOVA realizado, al no mostrarse diferencias estadísticamente significativas entre estos, con un nivel del 95 % de confianza (Tabla III, Anexos 8 y 9). Este comportamiento es similar a lo analizado para el parámetro sólidos totales, confirmando la relación proporcional que existe entre estos.

No se encontraron referencias bibliográficas sobre la densidad relativa de extractos de la hoja u otros órganos de esta especie para la comparación con estos resultados. No obstante, los valores obtenidos coinciden con muchos extractos vegetales en etanol aprobados en nuestro país con fines terapéuticos⁹⁹ y al igual que el parámetro sólidos totales depende de la composición química de cada especie vegetal.⁹¹

En el anexo 10 se recogen los intervalos de confianza (95 %) para este parámetro.

- Índice de refracción

En la tabla IV se recogen los resultados de los valores promedios y la desviación estándar del índice de refracción para cada uno de los cuatro lotes del extracto en etanol de la hoja.

Tabla IV: Valores promedios y desviación estándar del índice de refracción en cada lote

Lotes	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Índice de refracción ± S	1,365 ± 0,000 ^a	1,362 ± 0,000 ^b	1,367 ± 0,000 ^c	1,366 ± 0,001 ^{a,c}

Letras distintas significan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

Como se observa en la tabla IV, los valores de los índices de refracción para cada uno de los cuatro lotes son superiores al del etanol 96 % (1,3611), lo que demuestra la presencia de sustancias que refractan la luz y al igual que los parámetros anteriores reflejan que el proceso extractivo que se realizó es adecuado.

Del análisis estadístico se obtuvo que existen diferencias estadísticamente significativas del lote 2, con respecto al 1, 3 y 4 con un nivel del 95 % de confianza (Tabla IV, Anexos 11 y 12). Nuevamente, al igual que para el parámetro pH se muestra un comportamiento diferente para el lote 2, por lo que sería posible que en este pudieran estar presentes otras sustancias capaces de refractar la luz.

No se encontraron referencias bibliográficas sobre el índice de refracción de extractos de la hoja u otros órganos de esta especie para la comparación con estos resultados. No obstante, los valores obtenidos coinciden con muchos extractos vegetales en etanol aprobados en nuestro país con fines terapéuticos⁹⁹ y al igual que los otros parámetros determinados depende de la composición química de cada especie vegetal.⁹¹

En el anexo 13 se recogen los intervalos de confianza (95 %) para este parámetro.

- **Análisis capilar**

Los resultados del análisis e interpretación de la imagen en el análisis capilar, se describen a continuación:

Color: La imagen fue poco coloreada⁸⁶ para los cuatro lotes, mostrando similitudes entre estos.

Altura: Para los lotes 1 y 2 fue de 13,5 cm, mientras que para el lote 3 fue de 14,4 cm y para el 4 de 12,4 cm. No obstante a estos valores, la altura de la imagen en los cuatro lotes se considera alta (de 8,0 cm en adelante).⁸⁶

Descripción: En el análisis de la imagen fue posible distinguir las 4 zonas: franja, subfranja, banda y subbanda.⁸⁶ En los cuatro lotes, la franja se mostró traslúcida y

festonada, la subfranja fue poco coloreada, en la banda pudo observarse un color verde oscuro y no traslúcida y en la subbanda el color era el mismo para todos, verde claro.

Cambios de coloración con vapores de amoníaco: La imagen del lote 1 ante los vapores de amoníaco cambió a un color amarillo, más intenso en la subfranja. En el lote 2 se produjo en la imagen un cambio completo a color amarillo. Este cambio también ocurrió en los lotes 3 y 4 con una mayor intensidad en el color que los lotes 1 y 2.

Examen bajo la luz ultravioleta: La imagen de los cuatro lotes no mostró fluorescencia a la luz ultravioleta a 365 nm.

No se encontraron referencias bibliográficas sobre el análisis capilar para extractos de la hoja u otros órganos de la planta para la comparación con los resultados obtenidos.

III.2.1.2 Determinación de parámetros químicos

- Determinación cualitativa de metabolitos

En la tabla V se recogen los resultados de la determinación de la composición química cualitativa para los cuatro lotes de los extractos en etanol.

Como se observa en la tabla V, para los cuatro lotes del extracto en etanol de las hojas se obtuvieron resultados positivos para: alcaloides, triterpenos y esteroides, cumarinas, saponinas, aceites esenciales, azúcares reductores, fenoles y taninos, flavonoides, aminoácidos y aminos libres.

Estos resultados positivos coinciden con varios trabajos investigativos publicados tanto para extractos alcohólicos, como acuosos de la especie.^{8,46,96,101-103} Arinze y Alumanah (2018) publicaron los resultados de un tamizaje fitoquímico realizado a extractos acuosos obtenidos por decocción de la hoja fresca y seca, detectándose la presencia de azúcares reductores, flavonoides, saponinas, antraquinonas, taninos, carbohidratos, glicósidos cianogénicos y cardíacos. Por cromatografía en capa delgada identificaron la presencia de los flavonoides quercetina, quercetina-3-rutinósido y quercetina-3-ramnósido, azúcares como fructosa, ramnosa, xilosa y manosa y vitamina C.⁷⁷

Ramadass y Subramanian (2018) reportaron los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a extractos en cloroformo, etanol y agua de las hojas de la especie. Se obtuvieron resultados positivos para alcaloides, flavonoides, antraquinonas, azúcares reductores, polisacáridos y fenoles en los tres extractos, mientras que los taninos y

saponinas solo en los extractos en cloroformo y etanol y fitosteroles en el acuoso. Los terpenoides resultaron negativos en los tres extractos.¹⁰²

Tabla V. Resultados de la determinación de la composición química cualitativa para cada lote

Metabolitos	Ensayos	Evidencias	L-1	L-2	L-3	L-4
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado color ladrillo	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
	Mayer	Precipitado de color blanco	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
	Wagner	Precipitado color carmelita	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
Triterpenos y esteroides	Lieberman-Burchard	Color verde intenso visible	(+)	(+)	(+)	(+)
	Solkowski	Coloración amarilla rojiza	(+)	(+)	(+)	(+)
	Rosemheim	Color verde	(-)	(-)	(-)	(-)
Quinonas	Borntrager	Color marrón	(-)	(-)	(-)	(-)
	Variante con benceno	Color carmelita	(-)	(-)	(-)	(-)
Cumarinas	Baljet	Precipitado rojo	(++)	(+++)	(+++)	(+++)
	Legal	Color rojo que desaparece en unos minutos	(+)	(+)	(+)	(+)
	Hidroxamato férrico	No presencia de coloración violeta	(-)	(-)	(-)	(-)
Saponinas	Espuma	Presencia de espuma persistente	(+)	(+)	(+)	(+)
Resinas	Resinas	No precipitado	(-)	(-)	(-)	(-)
Aceites esenciales	Sudán III	Gotas oleosas de color rojo oscuro	(+)	(+)	(+)	(+)
	Papel	No transparencia	(-)	(-)	(-)	(-)
Azúcares reductores	Fehling	Precipitado rojo	(+)	(+)	(+)	(+)
	Benedict	Precipitado rojo	(+)	(+)	(+)	(+)
Fenoles y taninos	Cloruro férrico	Verde oscuro	(+)	(+)	(+)	(+)
	Gelatina	Precipitado blanco o turbidez	(+)	(+)	(+)	(+)
	Cafeína	Precipitado blanco o turbidez	(+)	(+)	(+)	(+)
Aminoácidos y aminos libres	Ninhidrina	Azul violáceo	(+)	(+)	(+)	(+)
Flavonoides	Ácido sulfúrico	Diferente coloración al carmelita claro	(+)	(+)	(+)	(+)
	Shinoda	No coloración de la fase del alcohol amílico	(-)	(-)	(-)	(-)
	Rosemheim	Color rojo anaranjado en la fase amílica	(+)	(+)	(+)	(+)
	Álcalis	Coloración amarilla	(+)	(+)	(+)	(+)

Leyenda: L-1 (lote 1), L-2 (lote 2), L-3 (lote 3), L-4 (lote 4), (+): Positivo (—): Negativo

Alok y colaboradores informaron los resultados del estudio fitoquímico realizado a varios extractos obtenidos de la hoja de especie. El extracto en éter de petróleo resultó positivo a esteroides y aceites fijos; en cloroformo: esteroides, saponinas y taninos; en acetona: alcaloides y carbohidratos; en etanol: compuestos fenólicos, alcaloides, glicósidos, taninos y carbohidratos y en agua: compuestos fenólicos, alcaloides, glicósidos, taninos y carbohidratos.⁹⁶

En el caso de las quinonas, algunos reportes indican su presencia en la hoja, específicamente las antraquinonas^{77,104} y otros no^{8,105}. Las resinas también han sido reportadas para este órgano vegetal.¹⁰⁶ No obstante, no se obtuvieron resultados positivos en este estudio para estas dos clases de metabolitos secundarios, lo que se justifica porque la composición química de una especie vegetal depende de muchos factores, los que han sido considerados como intrínsecos y extrínsecos. Entre los extrínsecos se encuentran las condiciones climáticas, las características físicas, composición y ventilación del suelo, la altitud, temperatura, humedad, luz, régimen de vientos y de precipitaciones, época del año, diferentes técnicas de cultivo, entre otros. Entre los intrínsecos se encuentran: fases del ciclo vital de la planta (Floración, fructificación o fase vegetativa), la edad, mutaciones, variedades, entre otros. También se debe mencionar la influencia de la producción y destrucción del compuesto durante las fases previas a su identificación o en su extracción, así como las diferencias entre lotes de plantas dependiendo de factores intrínsecos.¹⁰⁷

Teniendo en cuenta las coloraciones observadas en varios de los ensayos realizados (Tabla V), se puede sugerir la posible presencia de varios tipos de metabolitos secundarios según la clase química,⁸⁷ como se describe a continuación:

- La coloración verde en el ensayo de Lieberman-Burchard para triterpenos y esteroides sugiere posibles estructuras esteroidales,⁸⁷ metabolitos que han sido reportados en la hoja de la especie por Verkerk y Wright.^{96,108}
- La coloración rojo anaranjado en el ensayo de Rosemheim para flavonoides sugiere antocianidinas,⁸⁷ la que ha sido reportada para la hoja de la especie por Nyamukuru y colaboradores (2017).¹⁰⁶
- La coloración amarilla en el ensayo de álcalis para flavonoides sugiere flavonas, flavanonol e isoflavonas.⁸⁷

- La coloración verde intensa en el ensayo de cloruro férrico para fenoles y taninos sugiere taninos del tipo pirocatecólicos.⁸⁷

- **Determinación cuantitativa de flavonoides totales**

Los flavonoides constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios con mayor diversidad de funciones en las plantas, muchas de estas de capital importancia para su supervivencia. Estas contemplan desde la atracción de vectores para la polinización y dispersión de las semillas, hasta su función defensiva frente a herbívoros y patógenos. Esta diversidad de funciones en las plantas los convierte en un grupo de compuestos con diversas potencialidades desde el punto de vista farmacológico.⁹⁶

Durante el ensayo, las muestras de cada lote presentaron un color amarillo, lo cual se debe a que el catión de aluminio forma complejos estables con los flavonoides en etanol, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas. El método es exacto y reproducible, proporcionando desviaciones muy pequeñas o ninguna diferencia entre una prueba y otra sobre la misma muestra.

En la tabla VI se reflejan los resultados obtenidos para la cuantificación de flavonoides totales: el valor medio y la desviación estándar. Estos valores fueron calculados en base a la curva de calibración obtenida, empleando como patrón quercetina, donde se obtuvo la ecuación: $y = 18,82x + 0,000$; $R^2=0,970$ y nivel de significación $p<0,05$. El contenido de flavonoides totales de cada extracto fue expresado en miligramos equivalentes de quercetina/g de droga seca.

Tabla VI. Contenido promedio de flavonoides totales (mg/g) en equivalentes de quercetina y desviación estándar para cada lote

Lotes	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Flavonoides totales (mg de quercetina/g de droga seca) Media $\pm$ S	2,60 $\pm$ 0,24 ^a	2,13 $\pm$ 0,01 ^b	2,65 $\pm$ 0,04 ^a	2,60 $\pm$ 0,16 ^a

Letras distintas significan diferencias estadísticas significativas ($p<0,05$)

Como se observa en la tabla VI, los valores de la concentración de flavonoides totales en equivalentes de quercetina confirman la presencia de estos, previa identificación en los ensayos químicos cualitativos. A pesar de que la mayor concentración de estos metabolitos se encuentra en el lote 3, no existen diferencias estadísticas entre este y los lotes 1 y 4 (Tabla VI, Anexos 14 y 15) con un nivel del 95 % de confianza.

Nuevamente el lote 2 resulta diferente, con la más baja concentración de los flavonoides totales.

Han sido aislados varios flavonoides de la hoja de esta especie vegetal, como: kaemferol, quercetina, miricetina, apigenina-7-O-glucósido,¹⁰⁹ quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-ramnósido.⁷⁷ Sin embargo, no se dispone de referencias bibliográficas sobre estudios de cuantificación de flavonoides totales en extractos en etanol de la hoja, pero sí de un reporte con un extracto en agua, donde se obtuvo 9,85 mg de flavonoides totales equivalentes a quercetina/gramos de sólidos totales del extracto,⁸ cantidad que resulta superior a los obtenidos en esta investigación.

En el anexo 16 se recogen los intervalos de confianza (95 %) para este parámetro.

III.3 Determinación de la huella espectral en el ultravioleta

La determinación de la huella espectral deviene en un parámetro derivado de la composición química del extracto y sirve como patrón de comparación de formulaciones preparadas a partir de la propia especie.

En la figura 6 se muestra el espectro UV-VIS en el rango de 400-800 nm para los cuatro lotes del extracto en etanol. Como resultado, se obtuvo la presencia de varios máximos de absorción, a 404, 436, 536, 604 y 664 nm. A pesar de que en los cuatro lotes se obtienen estos máximos de absorción, se observa una similitud en los lotes 1-2 y el 3 con el 4, resultando diferentes entre ellos en cuanto a los valores de absorbancia, que son menores para los dos primeros lotes. Teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer, que enuncia que la absorción de una muestra es directamente proporcional a su concentración, se puede plantear que la disminución en las absorbancias de las sustancias que emiten en el rango de las longitudes de onda trabajadas en los lotes 1 y 2, sugiere una disminución en la concentración de los compuestos extraídos que están emitiendo en dichas longitudes de onda. Este resultado se puede relacionar con los valores del porcentaje de sólidos totales determinados, ya que se observó un comportamiento similar para los lotes 1 y 2 (menores desde el punto de vista matemático, aunque sin diferencias estadísticas entre los cuatro lotes) (Tabla II, Anexo 6), así como en el análisis capilar frente a los vapores de amoníaco.

Esta diferencia en cuanto a concentración de sustancias extraídas de los lotes 1-2 con respecto al 3-4, puede deberse a factores intrínsecos del material vegetal y de las características propias de las dos zonas diferentes de recolección de estos lotes.

En la figura 7 se muestra el espectro UV en el rango de 200-500 nm para los cuatro lotes del extracto en etanol. Como resultado, se obtuvo la presencia de varios máximos de absorción, a 206 (Lote 2), 208 (Lotes 1, 3, 4), 252, 258, 352 y 356 nm. Como se observa en la figura 7, los espectros de los lotes 1, 3 y 4 son muy similares, superponiéndose en las longitudes de onda, sin embargo el lote 2, aunque comparte la mayoría de los máximos de absorción con estos, presenta menores valores de absorbancia, lo que pudiera indicar una menor concentración de los compuestos presentes que absorben al ultravioleta.

El comportamiento de este parámetro para el lote 2, diferente al resto de los lotes, también se observó en los parámetros pH, índice de refracción y la cuantificación de flavonoides totales, pudiendo indicar que el material vegetal recolectado en este lote presenta características intrínsecas diferentes.

Los múltiples máximos en la región ultravioleta podrían estar relacionados a la presencia de un número importante de compuestos fenólicos y de los terpenoides (Limonoides, ejemplo: azadiractina, cuyas propiedades espectrales reportan un máximo de absorción a los 217 nm y la nimbina, a los 245 nm),¹¹⁰ los que están presentes según los resultados químicos cualitativos informados anteriormente.

Fong y colaboradores (2014) informaron sobre el espectro UV-VIS del extracto acuoso de la hoja de la planta, donde obtuvieron dos máximos de absorción en el rango ultravioleta del espectro: 215 y 240 nm respectivamente. Por su parte, en la región del espectro visible solamente aparecen pequeños picos a los 530 y 660 nm (Figura 8). Estos sugieren que el máximo de absorción observado a los 215 nm corresponde a la azadiractina y el de 240 nm a la nimbina.⁸ De forma general, estos resultados se asemejan a los obtenidos en este estudio para el extracto en etanol, pudiendo relacionar los picos detectados a 206 nm (Lote 2), 208 nm (Lotes 1, 3 y 4) y 252 nm (Lotes 1-4) con estos dos principios activos presentes en la especie vegetal.

Otro estudio realizado¹¹¹ muestra los espectros de absorción obtenidos para extractos elaborados en etanol (ERE), acetato de etilo (ERAE), hexano (EEH) y agua (ERA) por los métodos de extracción: maceración y soxhlet (Figuras 9 y 10, respectivamente). De forma general, se observa para el extracto en etanol por maceración (Figura 9) y por soxhlet (Figura 10) el máximo de absorción en la zona de los 200 nm, que es similar a lo obtenido en este trabajo.

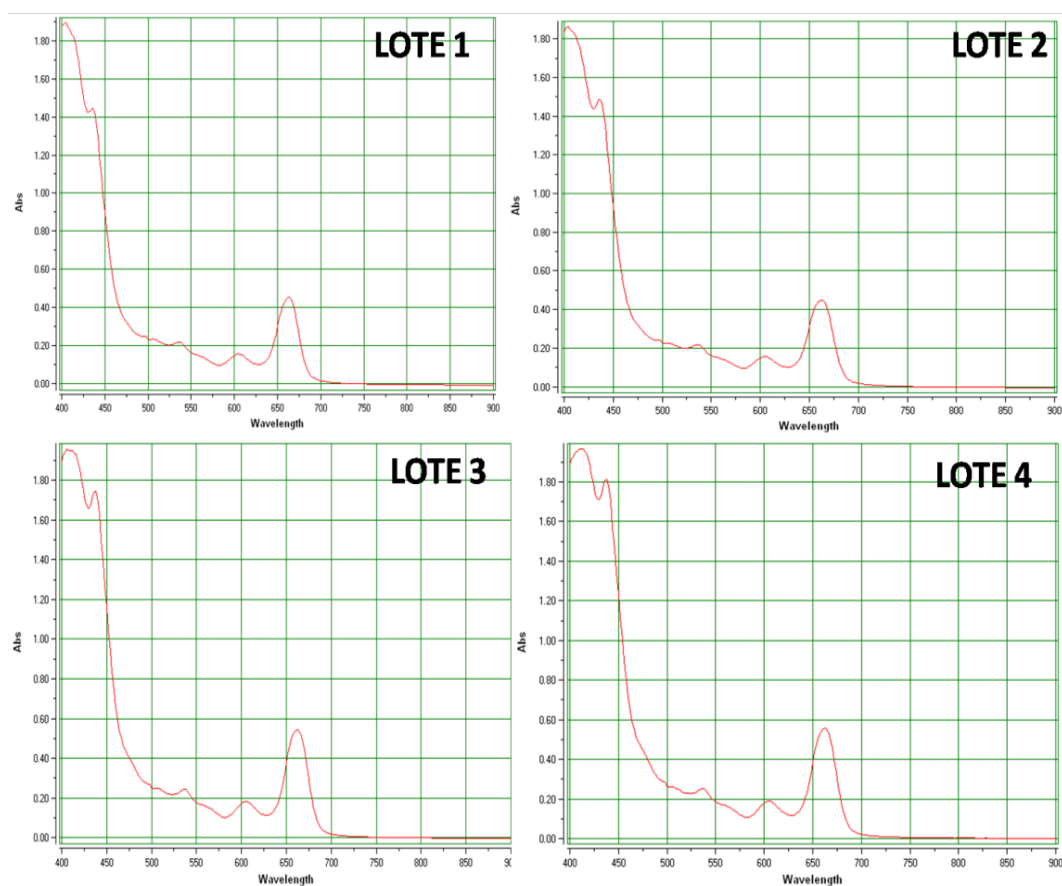


Figura 6. Espectro UV-VIS en el rango 400-800 nm para los cuatro lotes

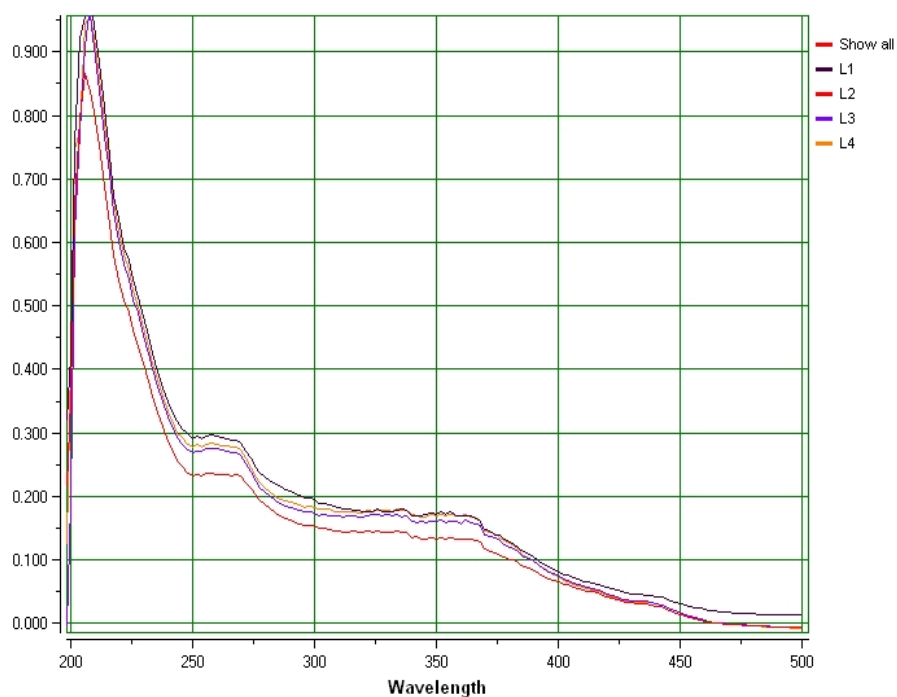


Figura 7. Espectro UV en el rango 200-500 nm para los cuatro lotes

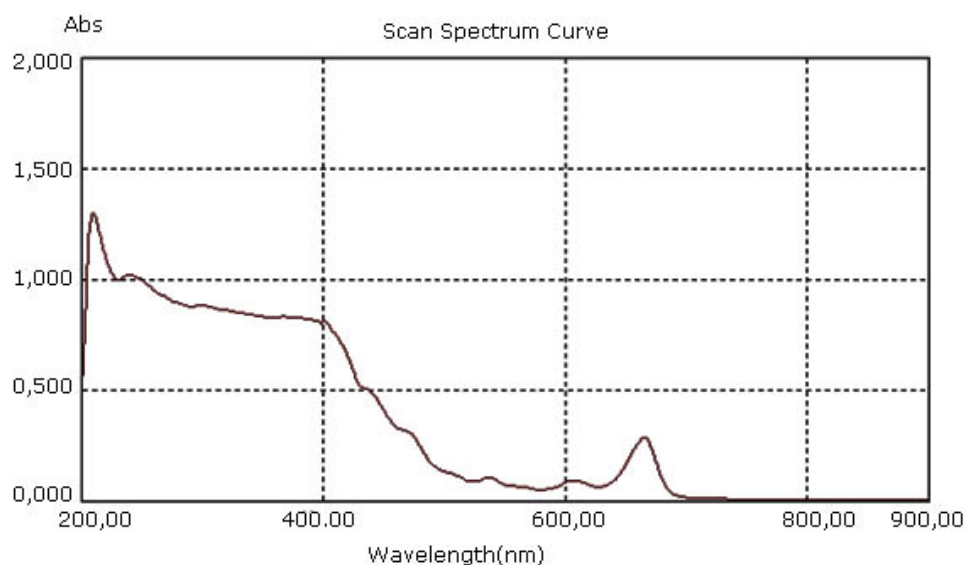


Figura 8. Espectro de absorción UV-VIS del extracto acuoso de las hojas de *A.indica*⁸

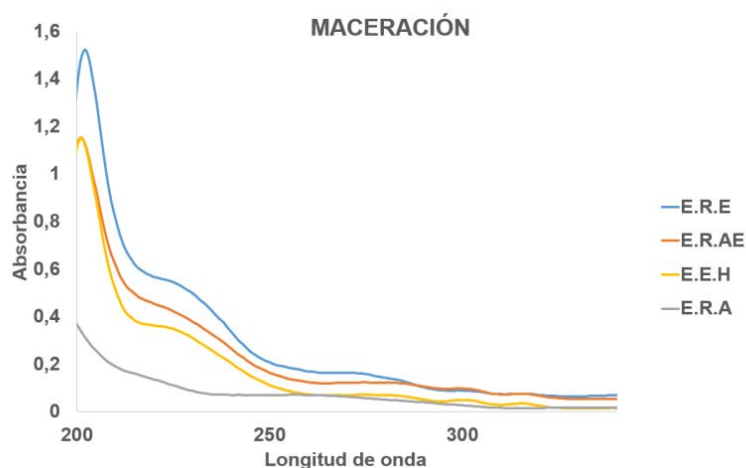


Figura 9. Espectros de absorción UV de extractos de *A. indica* obtenidos por el método de maceración.¹¹¹

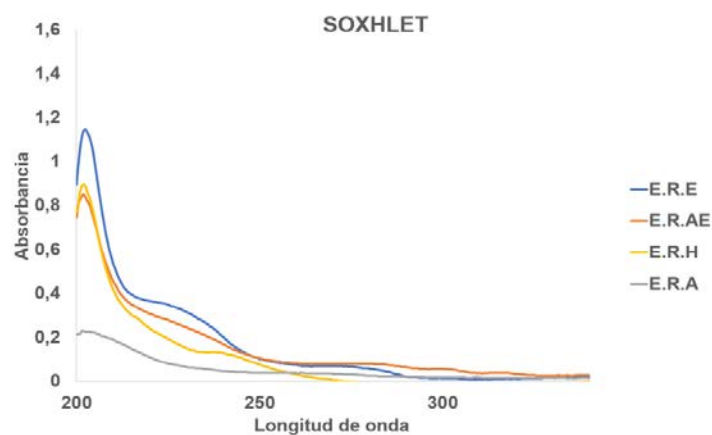


Figura 10. Espectros de absorción UV de extractos de *A. indica* obtenidos por el método de Soxhlet.¹¹¹

Los valores de absorbancia obtenidos en esta investigación pudieran ser considerados como distintivos para el extracto en etanol y ser tomados como patrón para su control de la calidad.

Resumiendo los resultados de la evaluación de la calidad física, físico-química y química al extracto en etanol de la hoja de *Azadirachta indica* A. Juss, se puede plantear que estos caracterizan a este extracto vegetal, destacándose un comportamiento estadísticamente diferente para el lote 2 en los parámetros pH, índice de refracción, concentración de flavonoides totales; así como la huella espectral al UV, lo que se podría atribuir a propiedades intrínsecas del material vegetal recolectado.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Los cuatro lotes del extracto en etanol elaborados a partir de la hoja de *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) mostraron un color verde oscuro, olor característico, transparencia, homogeneidad, características ácidas débiles (5,94-6,20), porcentaje de sólidos totales en un rango de 5,66-6,29 %, la densidad relativa de 0,88-0,93 g/mL y el índice de refracción de 1,361-1,367. La imagen capilar se caracterizó por ser poco coloreada, alta, con sus cuatro zonas definidas, la franja traslúcida y festonada, la subfranja poco coloreada, la banda de color verde oscuro y no traslúcida, la subbanda de color verde claro, frente a los vapores de amoníaco la imagen de color amarillo y ausencia de fluorescencia a la luz ultravioleta. Se identificaron alcaloides, triterpenos y esteroides, cumarinas, saponinas, aceites esenciales, azúcares reductores, fenoles y taninos, flavonoides, aminoácidos y aminos libres. El contenido de flavonoides totales fue de 1,99-2,79 mg/g de droga seca y la huella espectral al UV-VIS permitió obtener máximos de absorción a 206, 208, 252, 258, 352, 356, 404, 436, 536, 604 y 664 nm. Los indicadores de la calidad que se reportan constituyen un patrón de referencia para el control del extracto en etanol de la hoja como producto final y en el proceso tecnológico.

Recomendaciones

RECOMENDACIONES

1. Evaluar la calidad del extracto en etanol de la hoja de *Azadirachta indica* A. Juss en un mayor número de lotes y diferentes épocas del año.
2. Determinar otros parámetros químicos al extracto en etanol de la hoja, como la cuantificación de fenoles y carbohidratos totales.
3. Evaluar la calidad microbiológica del extracto en etanol.
4. Realizar el control del proceso tecnológico de elaboración del extracto en etanol, determinando los parámetros pH e índice de refracción, una vez estandarizados.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Qi Z. Who Traditional Medicine Strategy 2014-2023. Geneva: World Health Organization. 2013. Consultado el 13/02/2020. Disponible en: [https://www.who.int/global_health_histories/seminars/Dr_Zhangs_Presentation_GHHSeminar_86.pdf].
2. Badke MR, Budó MLD, Alvim NAT, Zanetti GD, Heisler EV. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. Texto & Contexto Enfermagem 2012; 21(2):363-70.
3. Casamayor PD, Pérez YEC, Morales IG, Castellanos IC, González EH. Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la Medicina Natural y Tradicional. MEDISAN 2014; 18(10):1467-74.
4. Martínez Ávila Y, Gómez López LL. Impacto social de una estrategia de intervención sobre prescripción racional de medicina verde en Céspedes durante 2011. Revista Cubana de Plantas Medicinales 2013; 18(4):609-18.
5. Gallegos MZ. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud en la población rural de Babahoyo, Ecuador. Anales de la Facultad de Medicina 2016; 77(4):327-32.
6. Elizagaray FB, Castro RA. Producción científica cubana sobre plantas medicinales y productos naturales a partir de la base de datos PlantMed CUBA, 1967-2010. Revista Cubana de Plantas Medicinales 2013; 18(3):348-360.
7. Atawodi SE, Atawodi JC. *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. Phytochemistry Reviews 2009; 8(3):601-620.
8. Fong OL, Berenguer CR, De la Vega JA, Wawoe ND, Puente EZ. Potencial antioxidante de un extracto acuoso de hojas del NIM (*Azadirachta Indica* A. Juss). Revista Cubana de Plantas Medicinales 2014; 19(2):205-207.
9. Chati JT. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de Luma chequen (Molina) A. Gray "Arrayán" frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Lima - Perú. Repositorio institucional: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2014. 30-45p.
10. Chaisawangwong W, Gritsanapan W. Quality assessment and scavenging activity of Siamese neem flower extract. Natural Product Research 2012;27(4-5):394-401.

11. Manikandan P, Letchoumy PV, Gopalakrishnan M, Nagini S. Evaluation of *Azadirachta indica* leaf fractions for *in vitro* antioxidant potential and *in vivo* modulation of biomarkers of chemoprevention in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46(7):2332-2343.
12. Roy MK, Kobori M, Takenaka M, Nakahara K, Shinmoto H, Isobe S, *et al.* Antiproliferative effect on human cancer cell lines after treatment with nimbolide extracted from an edible part of the neem tree (*Azadirachta indica*). *Phytotherapy Research* 2007; 21(3):245-250.
13. Chattopadhyay RR, Bandyopadhyay M. Effect of *Azadirachta indica* leaf extract on serum lipid profile changes in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *African Journal of Biomedical Research* 2005; 8(2):101-4.
14. Chattopadhyay I, Nandi B, Chatterjee R, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Mechanism of antiulcer effect of Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract: effect on H⁺-K⁺-ATPase, oxidative damage and apoptosis. *Inflammopharmacology* 2004; 12(2): 153-76.
15. Uzzaman S. Pharmacological activities of neem (*Azadirachta indica*): A review. *International Journal of Pharmacognosy and Clinical Research* 2019; 1(2):01-4.
16. Mossini SA, de Oliveira KP, Kemmelmeier C. Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* cultured with neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. *Journal of Basic Microbiology* 2004; 44(2):106-13.
17. Schmutterer H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology* 1990; 35(1): 271-297.
18. Ivbijaro MF, Bolaji OO. Effects of cypermethrin + dimethoate and extracts of *Piper guineense* and *Azadirachta indica* on the pests and yield of cowpea, *Vigna unguiculata*. *Journal of Agricultural Science* 1990; 115(2): 227-231.
19. Jothi BD, Verghese A, Tandon PL Evaluation of different plant oils and extracts against *Citrus aphid*, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy). *Indian Journal of Plant Protection* 1990; 18(2): 251-254.
20. Krishnaiah NV, Kalode MB. Efficacy of selected botanicals against rice insect pests undergreen house and field conditions. *Indian Journal of Plant Protection* 1990; 18(2): 197-205.

21. Agrawal IL. Ovicidal activity of some phytochemicals on *Myloccerusun decimpustulatus* Faust (Coleoptera: Curculionidae). Indian Journal of Entomology 1990; 52(1): 35-38.
22. Ahmed S, Grainge M. Potential of the neem tree (*Azadirachta indica*) for pest control and rural development. Economic Botany 1986; 40(2): 201-209.
23. Parrotta JA, Chaturvedi AN. *Azadirachta indica* A. Juss. Neem, margosa. Meliaceae. Mahogany family. USDA Forest Service, International Institute of Tropical Forestry 1994. SO-ITF-SM-70.8p.
24. Garralla SS, Cuadrado GA. Morfología polínica de las Meliaceae de la Argentina. Boletín Sociedad Argentina Botánica 1997; 32 (3-4):227-234.
25. Varela C. La familia Meliaceae en los herbarios de Venezuela. Clave para los géneros venezolanos. Acta Botánica Venezuelica 2010; 33(1): 137-150.
26. Arboretum Universidad Francisco Marroquín, Guatemala. Artículo disponible en: [<https://arboretum.ufm.edu/familia-de-planta/meliaceae/>]. Consultado el 25 de Mayo de 2020. 2007.
27. USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [Base de Datos en Línea]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Artículo disponible en: [<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?704>]. Consultado el 26 de Mayo de 2020. 2014.
28. Ricardo N, Albert D, Torres Y. Relaciones entre las características morfológico-funcionales y ecológicas de especies autóctonas de Meliaceae cubanas: estrategia para su empleo forestal. Acta Botánica Cubana 2016; 215 (1): 2-23.
29. *Azadirachta* spp. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Artículo disponible en: [<http://www.tropicos.org/name/20400352>]. Consultado el 3 de febrero de 2020.
30. Ogbuewu P, Odoemenam VU, Obikaonu HO, Opara MN, Emenalom OO, Uchegbu MC. The growing importance of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) in agriculture, industry, medicine and environment: A Review. Research Journal of Medicinal Plants 2011; 5: 230-245.
31. The Plant List — A working list for all plant species *Azadirachta*. Artículo disponible en: [<http://www.theplantlist.org/1>]. Consultado el 26 de Mayo de 2020. 2010.

32. Osuna EL. Producción de plantas, establecimiento y manejo de plantaciones de neem: *Azadirachta indica* A. Juss. Folleto técnico Número 5. México. Artículo disponible en: [\[https://books.google.com.cu/books?id=Gaa_YgEACAAJ&dq=bibliogroup:%22Folleto+t%C3%A9cnico%22&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiPjd6p55XqAhXkZzABHT13BO04WhDoATAAegQIARAB\]](https://books.google.com.cu/books?id=Gaa_YgEACAAJ&dq=bibliogroup:%22Folleto+t%C3%A9cnico%22&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiPjd6p55XqAhXkZzABHT13BO04WhDoATAAegQIARAB). Consultado el 26 de Mayo de 2020. 2000. 22-24p.
33. National Academy of Science. Washington, DC: NAS. Neem, a tree for solving global problems, 1992. 35-33p.
34. Bhowmik D, Chiranjib, Yadav J, Tripathi KK, Kumar KPS. Herbal Remedies of *A. indica* and its Medicinal Application. Journal of Chemical Pharmaceutical Research 2010; 2(1): 62-72.
35. Dhayanithi NB, Kumar TTA, Kathiresan K. Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. Journal of Environmental Biology 2010; 31(4): 409-412.
36. López PY, Angulo EM, Martínez RC, Soto BJ, Chaidez QC. Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22. Bioquímica 2007; 32(4): 117-125.
37. Kumar RB, Alok S, Kumar DC, Sabharwal M, Deo RY. An updated review of pharmacological studies on *Azadirachta indica* (Neem). International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2018; 9(7): 2645-2655.
38. Conrick J. Neem. The ultimate herb. Hopeful Communications. Alchua, Florida, U.S.A. 1994. 60p.
39. Parrotta JA, Chaturvedi AN. *Azadirachta indica* A. Juss. Margosa, neem Meliaceae familia de la caoba. SO-ITF-70, 1995. 65-72p.
40. Muños S. El aceite de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y su relación con el control de la roya de la hoja de trigo Var. *Baviacora*. Instituto Tecnológico Agropecuario, 2001. 41p.
41. Biswas K, Chattopadhyay I, Ranajit K, Bandyopadhyay U. Biological Activities and Medicinal Properties of Neem (*Azadirachta indica*). Current Science 2002; 82(11): 1336-1345.

42. Singh K, Singh A, Singh D. Molluscicidal activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Journal of Ethnopharmacology 1996; 52(1): 35-40.
43. Stoney C. Una guía útil para los árboles de uso múltiple. Uso del Neem como agente de Control Biológico de Plagas. Program Officer y Erin Hughes, Program Associate Winrock International. Hoja informativa, Junio 1998 FACT 98-04S. artículo disponible en: [<http://www.winrock.org/forestry/factpub/spusonim.htm>]. En grupo de investigación Yagua. Validación Integral del Sistema Agroforestal con Árbol del Neem. Bogotá, D.C. 2005. 33p.
44. Cano W. Efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (neem) sobre la viabilidad *in vitro* de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Facultad de Ciencias Médicas César Vallejo. 2017. 22p.
45. Cruz FM, del Angel RS. El Árbol de Nim, Establecimiento y Aprovechamiento en la Huasteca Potosina. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Huichihuayán y Campo Experimental Ébano. Folleto Técnico Núm. 3. San Luis Potosí, México. 7-8 p.
46. Priyanka SD, Dixit S, Sahoo S. Phytochemical and Biochemical Characterizations from Leaf Extracts from *Azadirachta Indica*: An Important Medicinal Plant. Biochemistry & Analytical Biochemistry 2017; 6(2):323-326. Doi: 10.4172/2161-1009.1000323.
47. Hidalgo MCL. Obtención del aceite de semilla de nim por extracción de gasolina natural. Universidad de Guayaquil, Tesis para optar por el título de doctora en Química y Farmacia. Artículo disponible en: [<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/752/1/NIM.pdf>]. 2002. 11-14p.
48. Isea GAF, Emérita IRR, Hernández AJP. Actividad garrapaticida de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim). Revista Cubana de Plantas Medicinales 2013; 18(2):327-340.
49. Ilango K, Maharajan G, Narasimhan S. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *A. indica* fruit skin extract and its isolated constituent azadiradione. Natural Product Research 2013; 27(16): 1463-1467.
50. Rao BS, Nazma MJ, Rao MJ. Antifungal activity of gedunin. Current Science 1977; 46: 714-716.

51. Awotedu OL, Ogunbamowo PO, Emmanuel IB, Lawal IO. Phytominerals and Phytochemical Studies of *Azadirachta indica*, *Leea guineensis* and *Parkia biglobosa* Leaves. International Annals of Science 2019; 6(1): 28-34.
52. Arika WM, Nyamai DW, Agyirifo DS, Ngugi MP, Njagi ENM. *In-vivo* antidiabetic effect of aqueous leaf extract of *Azadirachta indica* A. juss in alloxan induced diabetic mice. Journal of Diabetic Complications & Medicine 2016; 1(2): 106.
53. Pant N, Garg HS, Madhusudanan KP, Bhakuni DS. Sulfurous compounds from *Azadirachta indica* leaves. Fitoterapia 1986; 57: 302-304.
54. Mohammad AA. Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. ID 7382506, 11 pages. Artículo disponible en: [<http://dx.doi.org/10.1155/2016/7382506>]. Consultado el 24 de Abril de 2020. 2016.
55. OMS. WHO Monographs On Selected Medicinal Plants Volume 3, 2007. 88-101.
56. Kaur G, Alam MS, Athar M. Nimbidin suppresses functions of macrophages and neutrophils: relevance to its antiinflammatory mechanisms. Phytotherapy Research 2004; 18(5): 419-424.
57. Naik MR, Bhattacharya A, Behera R, Agrawal D, Dehury S, Kumar S. Study of antiinflammatory effect of neem seed oil (*A. indica*) on infected Albino rats. Journal of Health Research and Reviews 2014; 1(3): 66-69.
58. Jagadeesh K, Srinivas K, Shreenivas PR. Antiinflammatory effect of *Azadirachta indica* (neem) in Albino rats-An experimental study. IOSR Journal of Pharmacy 2014; 4(1): 34-38.
59. Satyanarayana K, Sravanthi K, Shaker IA, Ponnu-lakshmi R. Molecular approach to identify antidiabetic potential of *Azadirachta indica*. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine 2015; 6(3): 165-174.
60. Bhat M, Kothiwale SK, Tirmale AR, Bhargava SY, Joshi BN. Antidiabetic properties of *Azadirachta indica* and *Bougainvillea spectabilis*: *In-vivo* studies in murine diabetes model. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 561625. Artículo disponible en:[<http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep033>]. Consultado el 23 de Mayo de 2020. 2011.

61. Maleki L, Sadeghian-Rizi T, Ghannadian M, Sanati MH, Shafizadegan S, Sadeghi-Aliabadi H. Antibacterial activity of *Azadirachta indica* leaf extracts against some pathogenic standards and clinical bacterial isolates. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection* 2017; e12987.
62. Surabhi LW, Charan AA, Bind A. Antimicrobial activity of methanolic and acetonic extracts of *Azadirachta indica*, *Saraca asoca* and *Curcuma longa*. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Science* 2013; 3(2): 79-86.
63. Aslam F, Rehman KU, Asghar M, Sarwar M. Antibacterial activity of various phytoconstituents of neem. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 2009; 46(3): 209-213.
64. Shrivastava DK, Swarnkar K. Antifungal Activity of leaf extract of neem (*Azadirachta indica* Linn.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2014; 3(5): 305-308.
65. Metwally FM, El-Mezayen HA, Moneim AEA, Sharaf NE. Antitumor effect of *Azadirachta indica* (Neem) on murine solid ehrlich carcinoma. *Academic Journal of Cancer Research* 2014; 7(1): 38-45.
66. Yusuf H. The antimalarial activity of the extract of the neem leaves (*A. indica* A. Juss) on *P. falciparum in-vitro*. *Proceedings of the Annual International Conference Syiah Kuala University* 2011 Banda Aceh, Indonesia, 2011.29-30p.
67. Bhajoni PS, Meshram GG, Lahkar M. Evaluation of the antiulcer activity of the leaves of *Azadirachta indica*: An experimental study. *Integrative Medicine International* 2016; 3(1-2): 10-16.
68. Maan P, Yadav KS, Yadav NP. Wound Healing Activity of *Azadirachta indica* A. Juss Stem Bark in Mice. *Pharmacognosy Magazine* 2017; 13(Suppl 2):S316-S320. doi:10.4103/0973-1296.210163.
69. Bijauliya RK, Alok S, Kumar M, Chanchal DK, Yadav S. A comprehensive review on herbal cosmetics. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2017; 8(12): 4930-49.
70. Jones I, Ley SV, Denholm AA, Lovell H, Wood A, Sinden RE. Sexual development of malaria parasites is inhibited *in-vitro* by the neem extract azadirachtin and its semi-synthetic analogues. *FEMS Microbiology Letters* 1994; 120(3): 267-273.

71. Debashri M, Tamal MA. Review on efficacy of *Azadirachta indica* A. Juss based biopesticides: An Indian perspective. Research Journal of Recent Sciences 2012, 1 (3): 94-99. ISSN 2277-2502.
72. Villamil DAM, Naranjo N, Van Strahlen MA. Efecto Insecticida del Extracto de Semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Collaria scenica* Stal (Hemiptera: Miridae). EntomoBrasilis 2012; 5 (2): 125-129.
73. Badria FA, Ahmed MH. Azadiradione: A multi-targets compound with new therapeutic approach. Asian Journal of Phytomedicine and Clinical Research 2018; 6(3): 115-120.
74. Khalid SA, Duddeck H, Gonzalez Sierra M. Isolation and characterization of antimalarial agent of the neem tree, *A. indica*. Journal of Natural Product 1989; 52(5): 922-927.
75. Arredondo E. El increíble árbol de Neem. Yoga. Artículo disponible en: [<http://revista.ciudadyoga.com/m/medicina-alternativa/530-el-increible-arbol-de-neem>]. 2015.
76. Labrada YH, Cordoví JMV, Ledea JLR, Rapado MP, Rosabal ÚMC. Physical and chemical characterization of essential oil of *Azadirachta indica* A. Juss exposed to gamma radiation. Revista Cubana de Química 2018; 30(3):470-482.
77. Arinze UW, Alumanah EO. The Effect of Drying on the Phytochemical Composition of *Azadirachta Indica* Leaf Extract. International Journal of Advanced and Innovative Research 2018; 7(2): 25-29.
78. Serrato BEB, Salgado R G, Rodríguez CN. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss): Obtención de extractos y su evaluación antibacteriana e insecticida. Artículo disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/237082896_NEEM_Azadirachta_indica_A_Juss_OBTENCION_DE_EXTRACTOS_Y_SU_EVALUACION_ANTIBACTERIANA_E_INSECTICIDA?enrichId=rgreq-51904eee19d165646d148ac38a0160f0-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzIzNzA4Mjg5NjBtBUzoxMDI0MDE1MjA0MzkzMDRAMTQwMTQyNTgzMzQ5Mw%3D%3D&el=1_x_2&_esc=publicationCoverPdf]. Consultado 28 de Mayo de 2020. 2014.

79. Esparza GD, López JC, Villanueva JAJ, Osorio FA, Otero GC, Camacho ED. Azadirachtin concentration, insecticide and phytotoxicity of four neem *Azadirachta indica* A. JUSS. Extracts. *Agrociencia* 2010; 44(7): 821-833.
80. Pai MR, Acharya LD, Udupa N. Evaluation of antiplatelet activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel—a 6-week clinical study. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 90 (1): 99–103.
81. Bandyopadhyay U, Biswas K, Sengupta A *et al.* Clinical studies on the effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extract on gastric secretion and gastroduodenal ulcer. *Life Sciences* 2004; 75(24): 2867–2878.
82. Busse W. The Significance of Quality for Efficacy and Safety of Herbal Medicinal Products. *Drug Information Journal* 2000; 34(1): 15-23.
83. Pérez AV, Castillejos EVR, Pérez JGH. Control de calidad de plantas medicinales y su legislación sanitaria en México. *Tequio* 2019; 2(6):5-16.
84. López AJB, Miranda MM, Bello AA. Parámetros de calidad de drogas y extractos empleados en la elaboración de una formulación expectorante. *Revista Cubana de Farmacia* 2016; 50(2). Artículo disponible en:
[<http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/29/33>].
85. Heinrich M. Quality and safety of herbal medical products: regulation and the need for quality assurance along the value chains. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2015; 80(1): 62–66.
86. MINSAP. Medicamentos de origen vegetal. Extractos y Tinturas. Métodos de ensayo. Norma Ramal de Salud Pública 312 (NRSP). La Habana, Cuba, 1991.1-5p.
87. Ochoa AP, López TG, Colombat MR. Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. Monografía. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente. Editado en CD-ROM ISBN 959-207-012-1, 2002. 43-5 p.
88. Lady P. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia). *VITAE Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 2009; 16(3): 388-95.
89. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 2004; 84 (3): 329-339.

-
90. Miller G. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959; 31(3): 426-428.
91. Miranda M, Cuéllar A. *Farmacognosia y Productos Naturales*. Editorial Félix Varela. Ciudad de la Habana, Cuba; 2001. 147-170p.
92. Nikam PH, Kareparamban J, Jadhav A, Kadam V. Future Trends in standardization of herbal drugs. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2012; 02(06): 38-44.
93. Appendix XVI D. Microbiological Quality of Non- Sterile Pharmaceutical Preparations and Substances. *British Pharmacopeia* 2010. 31-40p.
94. LABIOFAM HOLGUÍN COMPLEJO NIM-CREE. P 15-2-02-005. Proceso tecnológico para la obtención del extracto alcohólico concentrado y no concentrado partiendo de la hoja del nim. 2015. 1p.
95. OMS Quality control methods for herbal materials 2011. 172p.
96. Alok M, Versha P, Geeta P, Deepak K, Ishan D. Pharmacognostical standardization of leaves of *Azadirachta indica*. An effective panacea for all disease. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* 2011; 2 (4): 563-568.
97. Sharapin N. *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitofarmacéuticos*. Santa Fé de Bogotá Colombia: Convenio Andrés Bello y Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos (RIPROFITO) del Subprograma X de CYTED, 2000. 23-5 p.
98. González Y. *Calidad en la industria farmacéutica*. La Habana: Editorial Félix Varela, 2013. 41 p.
99. Ministerio de Salud Pública. *Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos*. Segunda Edición. Editorial Ciencias Médicas, La Habana, Cuba, 2017. 19,29,33,45,65p.
100. Reyes AM, Reyes AM, Aguilar NCG, Carrillo MLI. Propiedades antioxidantes de infusiones de neem (*Azadirachta indica*) encapsuladas con proteína de soya. *Revista Electrónica Nova Scientia* 2017; 9(18): 167- 185.
101. Susmitha S, Vidyamol KK, Ranganayaki P, Vijayaragavan R. Phytochemical Extraction and Antimicrobial Properties of *Azadirachta indica* (Neem). *Global Journal of Pharmacology* 2013; 7 (3): 316-320.
102. Ramadass N, Subramanian N. Study of phytochemical screening of neem (*Azadirachta indica*). *International Journal of Zoology Studies* 2018; 3(1): 209-212.

103. Ayeni KE, Yahaya SA. Phytochemical screening of three medicinal plants: Neem leaf (*Azadirachta indica*), Hibiscus leaf (*Hibiscus rosa sinensis*) and spear grass leaf (*Imperata cylindrica*). Continental J. Pharmaceutical Sciences 2010; 4(1):47-50.
104. Briceño G, García J, Maselli A, Rosales LC. Efecto de extractos etanólicos de ruda y neem sobre el control de bacterias fitopatógenas del género *Erwinia*. Agronomía Tropical 2011; 61(2): 141-148.
105. Samineh J, Soodabeh S, Mohammad RSA, Abbas H, Mahnaz K. Micromorphological and preliminary phytochemical studies of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*. Turkish Journal of Botany 2013; 37(4): 690-697.
106. Nyamukuru A, Fabula J, Lamonda MBK, Sekagya Y, Aduma P. Medicinal Plants and Traditional treatment practices used in the management of HIV/AIDS Clients in Mpigi District, Uganda. Journal of Herbal Medicine 2017; 17: 51-58.
107. Izco J. Botánica. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid, 1997.781 p.
108. Verkerk RHJ, Wright DJ. Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. Pesticide Science 1993; 37(1):83-91.
109. Tripathi YC, Prabhu VV. Chemical constituents of leaves of *Azadirachta indica*. National Academy Science Letters 1996; 19(11): 210-213.
110. O'Neil MJ. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 13th Edition. Whitehouse Station NJ, USA: Merck and Co. Inc; 2001. 48-60p.
111. Guerrero JMR. Producción de extractos de *Azadirachta indica* (Nim) y evaluación de su actividad insecticida para el control de *Sitophilus oryzae*. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Químico. 2016. 32-36p.

Anexos

ANEXOS

Anexo 1. Identificación taxonómica de la especie

BIOECO
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN
Inteligencia, educación, protección...

MUSEO DE HISTORIA NATURAL "TOMÁS ROMAY"
Direc: José A. Saco # 601, esq. Barnabé, C.P. 90100,
Santiago de Cuba, Cuba.
Teléf: 53 022 626568, 620859, 658777, 623277
Email: direc@bioeco.cu

HERBARIO BSC "DR. JORGE SIERRA CALZADO"

Nombre y apellidos: Joan Manuel Alvarez Consuegra

Institución a que pertenece: Dpto Farmacia, Universidad de Oriente

Servicio que solicita:
☒ Identificación taxonómica Azadirachta indica A. Juss

Nombres vulgares: Arbol del Nene Familia: Meliaceae

Finalidad del estudio: Estado de la muestra: ☐ Buena ☒ Regular ☐ Mala
☒ Docente
☐ Investigativo

Identificador: Lic. Taisley Costa Acosta Fecha: 03/Julio/2020
Vto. Bueno
Lic. Josefina Blando Ojeda
Curadora

Anexo 2. Análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) para el pH

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,110425	3	0,0368083	184,04	0,0000
Intra grupos	0,0016	8	0,0002		
Total (Corr.)	0,112025	11			

Verificación de varianza (Levene's)($\alpha=0,05$): 0,441.

Anexo 3. Prueba de múltiples rangos para el pH

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

pH.Lote	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Lote 2	3	5,95333	X
Lote 1	3	6,04	X
Lote 4	3	6,17333	X
Lote 3	3	6,18333	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Lote 1 - Lote 2	*	0,0866667	0,0369644
Lote 1 - Lote 3	*	-0,143333	0,0369644
Lote 1 - Lote 4	*	-0,133333	0,0369644
Lote 2 - Lote 3	*	-0,23	0,0369644
Lote 2 - Lote 4	*	-0,22	0,0369644
Lote 3 - Lote 4		0,01	0,0369644

* indica una diferencia significativa.

Anexo 4. Intervalos de confianza (95 %) para el parámetro pH

Lotes	Casos	Límite Inferior	Límite Superior
Lote 1	3	6,02669	6,05331
Lote 2	3	5,94002	5,96665
Lote 3	3	6,17002	6,19665
Lote 4	3	6,16002	6,18665
Total	12		

Anexo 5. ANOVA para los sólidos totales en los cuatro lotes

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,150492	3	0,0501639	1,40	0,3115
Intra grupos	0,286333	8	0,0357917		
Total (Corr.)	0,436825	11			

Verificación de varianza (Levene's)($\alpha=0,05$): 0,4591.

Anexo 6. Prueba de múltiples rangos para los sólidos totales

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Lote 1	3	5,84	X
Lote 2	3	5,89	X
Lote 3	3	6,04333	X
Lote 4	3	6,11667	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Lote 1 - Lote 2		-0,05	0,494492
Lote 1 - Lote 3		-0,203333	0,494492
Lote 1 - Lote 4		-0,276667	0,494492
Lote 2 - Lote 3		-0,153333	0,494492
Lote 2 - Lote 4		-0,226667	0,494492
Lote 3 - Lote 4		-0,0733333	0,494492

* indica una diferencia significativa.

Anexo 7. Intervalos de confianza (95 %) para el parámetro sólidos totales

Nivel	Casos	Límite Inferior	Límite Superior
Lote 1	3	5,66189	6,01811
Lote 2	3	5,71189	6,06811
Lote 3	3	5,86523	6,22144
Lote 4	3	5,93856	6,29477
Total	12		

Anexo 8. ANOVA para el parámetro densidad relativa

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0000109167	3	0,00000363889	0,01	0,9991
Intra grupos	0,003992	8	0,000499		
Total (Corr.)	0,00400292	11			

Verificación de varianza (Levene's)($\alpha=0,05$): 0,3630.

Anexo 9. Prueba de múltiples rangos para la densidad relativa

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Lote 1	3	0,903667	X
Lote 2	3	0,905	X
Lote 3	3	0,905333	X
Lote 4	3	0,906333	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Lote 1 - Lote 2		-0,00133333	0,420597
Lote 1 - Lote 3		-0,00166667	0,0420597
Lote 1 - Lote 4		-0,00266667	0,0420597
Lote 2 - Lote 3		-0,000333333	0,0420597
Lote 2 - Lote 4		-0,00133333	0,0420597
Lote 3 - Lote 4		-0,001	0,0420597

* indica una diferencia significativa.

Anexo 10. Intervalos de confianza (95 %) para el parámetro densidad relativa

Nivel	Casos	Límite Inferior	Límite Superior
Lote 1	3	0,882637	0,924696
Lote 2	3	0,88397	0,92603
Lote 3	3	0,884304	0,926363
Lote 4	3	0,885304	0,927363
Total	12		

Anexo 11. ANOVA para el parámetro índice de refracción

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0000441025	3	0,0000147008	43,56	0,0000
Intra grupos	0,0000027	8	3,375E-7		
Total (Corr.)	0,0000468025	11			

Verificación de varianza (Levene's)($\alpha=0,05$): 0,5501

Anexo 12. Prueba de múltiples rangos para el índice de refracción**Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD**

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Lote 2	3	1,36173	X
Lote 1	3	1,3646	X
Lote 4	3	1,36603	XX
Lote 3	3	1,36673	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Lote 1 - Lote 2	*	0,00286667	0,00151847
Lote 1 - Lote 3	*	-0,00213333	0,00151847
Lote 1 - Lote 4		-0,00143333	0,00151847
Lote 2 - Lote 3	*	-0,005	0,00151847
Lote 2 - Lote 4	*	-0,0043	0,00151847
Lote 3 - Lote 4		0,0007	0,00151847

* indica una diferencia significativa.

Anexo 13. Intervalos de confianza (95 %) para el parámetro índice de refracción

Nivel	Casos	Límite Inferior	Límite Superior
Lote 1	3	1,36405	1,36515
Lote 2	3	1,36119	1,36228
Lote 3	3	1,36619	1,36728
Lote 4	3	1,36549	1,36658
Total	12		

Anexo 14. ANOVA para la cuantificación de flavonoides totales

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,484312	3	0,161437	6,71	0,0141
Intra grupos	0,192453	8	0,0240566		
Total (Corr.)	0,676765	11			

Verificación de varianza (Levene's)($\alpha=0,05$): 0,5501.

Anexo 15. Pruebas de múltiples rangos para la concentración de flavonoides totales**Método: 95,0 porcentaje LSD**

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Lote 2	3	2,13333	X
Lote 1	3	2,55767	X
Lote 4	3	2,56667	X
Lote 3	3	2,64667	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Lote 1 - Lote 2	*	0,424333	0,292033
Lote 1 - Lote 3		-0,089	0,292033
Lote 1 - Lote 4		-0,009	0,292033
Lote 2 - Lote 3	*	-0,513333	0,292033
Lote 2 - Lote 4	*	-0,433333	0,292033
Lote 3 - Lote 4		0,08	0,292033

* indica una diferencia significativa.

Anexo 16. Intervalos de confianza (95 %) para el parámetro concentración de flavonoides totales

Nivel	Casos	Límite Inferior	Límite Superior
Lote 1	3	2,41165	2,70368
Lote 2	3	1,98732	2,27935
Lote 3	3	2,50065	2,79268
Lote 4	3	2,42065	2,71268
Total	12		