

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA MEXICALI
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



“Caracterización fisicoquímica de la hoja de neem (*Azadirachta indica*)”

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERÍA**

PRESENTA:

SAMUEL LEPE DE ALBA

DIRECTOR DE TESIS

DR. CONRADO GARCÍA GONZÁLEZ

CODIRECTOR DE TESIS

DR. MARCOS ALBERTO CORONADO ORTEGA

Mexicali, Baja California Junio de 2021.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría, por apoyarme para realizar este trabajo y por la formación que se me dio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca para realizar mis estudios de maestría.

Agradezco a mis directores de tesis el Dr. Conrado García González y el Dr. Marcos Alberto Coronado Ortega, que me hayan aceptado como su alumno, por su orientación y apoyo durante este tiempo.

Agradezco también al Doctor José Ramón Ayala Bautista por el conocimiento que me transmitió durante mis estudios de maestría.

Agradezco también a la Doctora Ma. Socorro Romero Hernández y a la M.I Luz Estela Salazar Escalante, por apoyarme cuando necesitaba.

Al Dr. Benjamin Valdez Salas por el apoyo en la realización de este proyecto.

Y a los síndicos por su tiempo y paciencia en la revisión de esta tesis.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE TABLAS | iv |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1 JUSTIFICACIÓN | 9 |
| 1.2 OBJETIVOS | 11 |
| 1.2.1 OBJETIVO GENERAL | 11 |
| 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 11 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 12 |
| 2.1 DESCRIPCIÓN DE LA AZADIRACHTA INDICA | 12 |
| 2.1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN | 12 |
| 2.1.2 CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA | 13 |
| 2.2 COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS PLANTAS | 19 |
| 2.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS | 20 |
| 2.4 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LA HOJA DE NEEM | 22 |
| 2.5 ANÁLISIS ELEMENTAL | 27 |
| 2.6 REVISIÓN TECNOLÓGICA DE PATENTES | 28 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 3.1 RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA | 31 |
| 3.2 ANÁLISIS PRÓXIMO | 31 |
| 3.3 ANÁLISIS QUÍMICO | 34 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 44 |
| 4.1 ANÁLISIS PRÓXIMO | 44 |
| 4.2 ANÁLISIS QUÍMICO | 46 |
| 4.3 ANÁLISIS XRF | 49 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 50 |
| RECOMENDACIONES | 54 |
| REFERENCIAS..... | 55 |
| OTROS PRODUCTOS ACADÉMICOS | 63 |
| ANEXOS | 65 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|--------------------------------------|
| Tabla 1: Taxonomía del neem | 14 |
| Tabla 2: Identificación de los principales compuestos químicos aislados de la Azadirachta Indica | 18 |
| Tabla 3: Fitoquímicos presentes en extractos acuosos y metanólicos de hojas de Azadirachta indica | 20 |
| Tabla 4: Procedimientos para la caracterización fisicoquímica de la hoja de neem | ¡Error! Marcador no definido. |
| Tabla 5: Datos experimentales del análisis próximo de la hoja de neem..... | 44 |
| Tabla 6: Comparación de análisis próximo de la hoja de neem | 45 |
| Tabla 7: Datos experimentales del análisis químico | 46 |
| Tabla 8: Comparación de análisis químico de la hoja de neem | 47 |
| Tabla 9: Comparación de análisis químico de la hoja de neem vs la hoja de Melia Azedarach | 48 |
| Tabla 10: Comparación de análisis químico de hoja de neem vs la hoja de Swietenia humilis..... | 48 |
| Tabla 11: Resultados XRF de la hoja de neem y su ceniza..... | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Fig. 1: Diagrama extracción Soxhlet | 9 |
| Fig. 2: Maceración..... | 9 |
| Fig. 3: Distribución mundial del neem | 13 |
| Fig. 4: Elementos macroscópicos del neem, a) árbol, hoja, c) raíz, d) flor, e) fruto y f) semilla | 16 |
| Fig. 5: Estructuras de compuestos químicos aislados de la <i>Azadirachta indica</i> , 1, Azadirachtin, 2, Nimbin, 3, Nimonol, 4, Nimocinol, 5, Salannin, 6, Azadiradione | 19 |
| Fig. 6: Principales causas por las cuales, los metabolitos secundarios inducen una respuesta de defensa de las plantas. ... | 22 |
| Fig. 7: Estructura básica de la celulosa | 25 |
| Fig. 8: En hemicelulosas los enlace β -(1 \rightarrow 4) s unen los átomos C1, O y C4 en posición ecuatorial, entre unidades de glucosa, xilosa y manosa | 26 |
| Fig. 9: Hojas de neem a) frescas, b) secas, c) moildas y en el tamiz a 0.5 mm | 31 |
| Fig. 10: Análisis químico a) extraíbles en acetona, b) extraíbles en agua caliente, c) lignina | 36 |
| Fig. 11: Extraíbles en agua caliente a) extraíbles en agua caliente sin filtrar, b) extraíbles en agua caliente filtrados | 37 |
| Fig. 12: Determinación de lignina a) lavado y filtrado de lignina, b) lignina seca..... | 38 |
| Fig. 13: Determinación de holocelulosa a) montaje, b) holocelulosa, c) holocelulosa limpia | 40 |
| Fig. 14: Determinación de celulosa a) celulosa sin filtrar, b) celulosa filtrada | 41 |
| Fig. 15: Análisis próximo a) hoja de neem libre de humedad, b) hoja de neem libre de material volátil, c) cenizas | 46 |

RESUMEN

El neem (*Azadirachta indica*) ha sido utilizado desde hace muchos años como alternativa natural para diversas aplicaciones, estas propiedades son atribuidas a los metabolitos secundarios. Entre las propiedades del neem también se tiene registro que tiene actividad antimicrobiana, espermicida, antioxidante entre otras. No se tiene un registro del área sembrada en México y el mundo.

En el presente trabajo se realizó la caracterización fisicoquímica de la hoja de neem. Dicha caracterización incluye los análisis próximo (contenido de humedad, cenizas, material volátil y carbono fijo), análisis químico (extraíbles, lignina, celulosa, holocelulosa y hemicelulosa) y análisis elemental, ya que no se encuentran reportados en la literatura pese a que se tienen diversos artículos y patentes que mencionan sus propiedades y usos, sin reportar datos de dicho análisis. La metodología aplicada para la caracterización fisicoquímica fue de acuerdo con las normas y procedimientos aplicables de las normas American Society for Testing and Materials (ASTM), Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI) y National Renewable Energy Laboratory (NREL).

Entre los resultados más destacables, se encontró que la hoja de neem tiene un contenido de humedad de 68.98%, y en base seca su composición es: material volátil de 75.10%, cenizas de 4.34% y carbono fijo de 17.55%. A partir del análisis químico se determinó que la hoja de neem tiene 10.98% de extraíbles en acetona, 31.92% de extraíbles en agua caliente, 23.57% de lignina, 18.45% de celulosa y 1.77% de hemicelulosa. El análisis elemental arrojó que la hoja de neem contiene 62.00% Ca, 29.76% K, 5.11% S, 1.34% Fe, 0.66% Sr, 0.54% P, 0.23% Zn, 0.22% Cu y 0.16% Mn.

Palabras clave: neem, caracterización fisicoquímica, análisis próximo.

ABSTRACT

Neem (*Azadirachta indica*) has been used for many years as a natural alternative for various diseases, these properties are attributed to secondary metabolites. Among the properties of neem there is also a record that it has antimicrobial and spermicidal, antioxidant activity among others. There is no record of the area planted in Mexico and the world.

In the present work, the physicochemical characterization of the neem leaf was carried out. This characterization includes the proximate analysis (moisture content, ash, volatile material and fixed carbon), chemical analysis (extractables, lignin, cellulose, holocellulose and hemicellulose) and elemental analysis, since they are not reported in the literature despite being they have various articles and patents that mention their properties and uses, without reporting data from said analysis. The methodology applied for the physicochemical characterization was in accordance with the applicable standards and procedures of the American Society for Testing and Materials (ASTM), Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI) and National Renewable Energy Laboratory (NREL).

Among the most remarkable results, it was found that the neem leaf has a moisture content of 68.98%, and on a dry basis its composition is: volatile material of 75.10%, ash of 4.34% and fixed carbon of 17.55%. From the chemical analysis it was determined that the neem leaf has 10.98% in acetone, 31.92% extractable in hot water, 23.57% lignin, 18.45% cellulose and 1.77% hemicellulose.

The elemental analysis shows that the neem leaf contains 62.00% Ca, 29.76% K, 5.11% S, 1.34% Fe, 0.66% Sr, 0.54% P, 0.23% Zn, 0.22% Cu and 0.16% Mn.

Keywords: neem, physicochemical characterization, proximate analysis.

Capítulo 1: Introducción

Las plantas medicinales contienen fitoquímicos con propiedades curativas, aunque no todas las plantas han sido científicamente probadas. Hoy en día, las plantas medicinales se suelen utilizar con más confianza, porque algunas de sus partes contienen principios activos que pueden utilizarse con fines terapéuticos, curar o tratar determinadas afecciones. Las plantas con propiedades medicinales fueron las primeras medicinas que el hombre comenzó a utilizar de forma empírica para curar enfermedades (1).

Existe evidencia de la utilización de las propiedades fitoquímicas de las plantas desde tiempos ancestrales. Se desconoce cómo se comenzaron a utilizar, los primeros escritos datan del año 2,800 a.C., y pertenecen a la cultura de los sumerios. El primer tratado sobre el tema, el Pen Tsao se atribuye al emperador chino Shen Nung, que describe y clasifica 366 hierbas con aplicaciones alimenticias, repelentes de insectos y con fines ceremoniales. El impreso más interesante es el papiro de Ebers, perteneciente a los egipcios; éste comprende una extensa lista de plantas en diversas aplicaciones, algunas de estas se utilizan hoy en día como el aloe, el eucalipto y la menta. Los antiguos libros sagrados del brahmanismo, mencionan el uso de las plantas, estableciendo verdaderos rituales en la recolección de las plantas (2).

El uso de plantas con fines curativos constituye el origen de gran parte de la medicina moderna. Muchos medicamentos convencionales provienen de fuentes vegetales. La mayoría de los medicamentos se basaban de plantas. El desarrollo

de medicamentos a partir de plantas continúa, y las farmacéuticas se dedican a la detección farmacológica de hierbas a gran escala (3).

A lo largo de la historia, México siempre ha sido un área de interés para sus recursos naturales en todo el mundo. Los ricos recursos vegetales hacen de México el quinto lugar del mundo de países con mayor diversidad de especies, esta vasta tierra que incluye regiones subtropicales, zonas templadas, desiertos y regiones frías, es un lugar ideal para el desarrollo de diversas especies vegetales. La cantidad de plantas medicinales en México es de aproximadamente 4,500, de las cuales sólo el 11% han sido investigadas químicamente, el 2.6% han sido investigaciones bio-orientadas y sólo el 1.9% han sido investigaciones farmacológicas y toxicológicas (4).

El árbol de neem botánicamente conocido como *Azadirachta indica* (A. Juss) es una planta perenne resistente, de rápido crecimiento tropical y subtropical perteneciente a la familia de *Meliaceae*. Se encuentra extensamente distribuido en Asia, África y otras partes tropicales del mundo. Esta planta tiene usos ancestrales y se ha utilizado en la medicina tradicional ya que tiene una amplia gama de propiedades medicinales. Desde hace años, se han estado realizando investigaciones científicas sobre sus propiedades terapéuticas (5).

El neem es utilizado tradicionalmente en la India, sus usos y propiedades se conocen desde hace 4,000 años, en la India se conoce al neem como la “botica del pueblo” o la “farmacia de la aldea” debido a que es utilizada con un sinfín de usos medicinales al igual que para curar y prevenir distintas enfermedades (6).

Aplicaciones del neem en diferentes áreas

Usos medicinales:

Desde tiempos ancestrales, los indios conocen las propiedades medicinales del neem. El neem se ha utilizado ampliamente en la medicina Ayurveda, Unani y la homeopática. Tradicionalmente, muchos trastornos como inflamación, infecciones, fiebre, enfermedades de la piel, trastornos dentales y otros se han tratado con diferentes partes del árbol de neem como hojas, flores, semillas, frutos, raíces y corteza. La hoja de neem exhibe una amplia gama de actividades farmacológicas, antiparasitarias (7) , antihiper glucémicas (8), antiulcerosas (9), antipalúdicas (10), antifúngicas (11), antibacterianas (12), antioxidantes (13), y anticancerígenas (14).

La literatura ayurvédica enumera varios usos medicinales del neem. Describe la corteza de neem, como fresca, amarga, astringente, acre y refrescante, y útil en el cansancio, tos, fiebre, pérdida del apetito, infestación de gusanos. Se informa que la corteza sirve para tratar heridas, vómitos, enfermedades de la piel, sed excesiva y diabetes. Asimismo se reporta que las hojas de neem son beneficiosas para los trastornos oculares, los venenos de insectos y para tratar el trastorno vático. También se ha observado que es antileprótico. Las frutas de neem son amargas, purgantes, antihemorroides y antihelmíticas. Actualmente se están realizando estudios sobre el efecto de la administración de soluciones de neem, sobre el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardíacas y el SIDA (15).

Usos ambientales

El neem en comparación con otras especies está adaptado a condiciones de estrés (16). El neem se usa comúnmente en programas y proyectos de control de la desertificación. Sus propiedades xirofíticas la convierten en una especie confiable para la fijación y estabilización de dunas de arena, así como para otros proyectos de gestión ambiental. Los registros botánicos de la *Azadirachta indica* tienen grandes implicaciones microclimáticas.

Usos veterinarios

El neem ha sido utilizado históricamente para eliminar del cuerpo varias formas de parásitos externos e internos rápidamente. Los extractos de neem tienen imitadores de hormonas que interfieren con el ciclo de vida de los parásitos, inhiben su capacidad para alimentarse y evitar que los huevos eclosionen (17).

Repelente de insectos

Los estudios han demostrado que los compuestos de neem contienen repelentes de insectos más eficaz que el químico sintético ampliamente utilizado conocido como DEET (N,N,-dietil-m-toluamida), un compuesto carcinógeno al estar expuesto por largos períodos de tiempo (18).

Usos industriales

En 2002, en la conferencia mundial sobre el neem, se propuso la idea de promover al neem como una planta industrial. Varias industrias, incluidas las farmacéuticas, cosméticos, desinfectantes, caucho, bioplaguicidas y textiles, utilizan aceite de neem. Actualmente, se encuentran disponibles muchas de estas preparaciones comerciales a base de neem (19).

El neem en México

El neem es una especie originaria de la India, en México fue introducida en 1989 por la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el Municipio de Marín, y no hay reporte que haya causado daños al ecosistema. Actualmente se encuentra distribuida en más de 15 estados de la República (20). Actualmente se encuentra distribuido en varios estados como Yucatán, Veracruz, Oaxaca, Morelos, Chiapas, Guanajuato, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Durango, Baja California y San Luis Potosí (21).

Sin embargo no se encuentra una base de datos de la superficie cultivada en México ni en el mundo.

No existe antecedente sobre caracterización de fisicoquímica de hojas de neem en árboles jóvenes.

Métodos de extracción de compuestos

Extracción Soxhlet:

Franz von Soxhlet inventó la técnica de extracción Soxhlet en 1879 para la determinación de grasa en la leche. Desde entonces, se ha convertido en la herramienta más utilizada para la extracción sólido-líquido en muchos campos como la alimentación, la farmacéutica y medio ambiente (22). La extracción Soxhlet se basa en las siguientes etapas: 1) colocación del solvente en una bola, 2) el disolvente se lleva a ebullición hasta el condensador de reflujo, 3) el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior, 4) subida del nivel de solvente cubriendo el cartucho hasta un punto donde

el reflujó que devuelve el solvente con el material retirado a la bola , 5) se repite este proceso el número de veces que sea necesario para que se agote la muestra. El extraído se concentra en la bola de disolvente (23). En la Figura 1, se muestra detalladamente como es el proceso de la extracción Soxhlet.

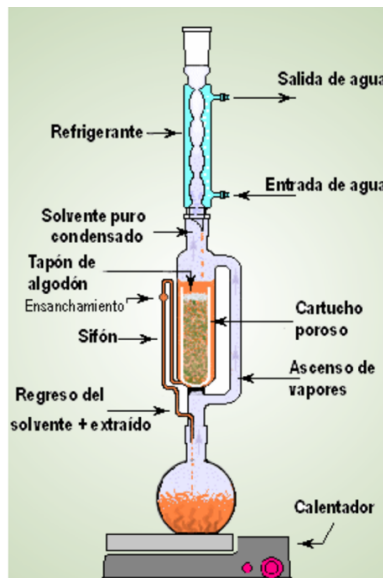


Fig. 1: Diagrama extracción Soxhlet (23).

Maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido – líquido, donde la materia prima tiene una gran cantidad de compuestos solubles en el líquido de extracción que son las que se pretenden extraer como se muestra en la Figura 2. El proceso de maceración genera dos productos que se pueden utilizar, el sólido sin esencias o el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima utilizada y del líquido de extracción. Existen dos métodos de maceración según la temperatura en caliente y en frío (24).



Fig. 2: Maceración. Fuente: elaboración propia.

1.1 Justificación

Existen diferentes sustancias químicas en el metabolismo de las plantas medicinales, que pueden ayudar a la misma a sobrevivir. Los metabolitos secundarios son uno de ellos. Existen en diferentes concentraciones o proporciones según las partes de la planta, y las condiciones ambientales como por ejemplo, la altura en donde se encuentre, lugar de origen, el tipo de suelo, los cambios climáticos.

En México las plantas medicinales han sido utilizadas desde tiempos prehistóricos como medicinas. La salud entre culturas como la náhuatl y maya, se obtenía con tratamientos que requerían de alternativas naturales para curar y tratar las enfermedades. Con la llegada de los españoles a México en el siglo XVI, Fray Bernardino de Sahagún, recopiló en el libro Historia general de las cosas de la Nueva España, escrito en 1548, los nombres en náhuatl de las plantas que se utilizaban para ciertos padecimientos. Muchos de los usos sobreviven gracias a la aplicación de la herbolaria. Gracias a que México posee una flora y fauna muy diversa, su herbolaria es una de las más variadas ya que incluye una centena de remedios caseros que se utilizan para la curación de diferentes padecimientos. La

herbolaria se basa en la presencia de compuestos químicos con acciones farmacológicas en las especies vegetales, que constituyen los ingredientes primarios que los laboratorios farmacéuticos utilizan en sus medicamentos comerciales patentados.

La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser utilizadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. También señala que el 80% de la población utiliza plantas medicinales para satisfacer o complementar sus necesidades de salud (25).

En México, de acuerdo con la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), se han registrado más de cuatro mil especies de plantas con atributos medicinales, que representan el 15% del total de la flora en el país (26).

Existe un vacío en el conocimiento de la composición química de las plantas, lo que estimula la investigación de compuestos nuevos con actividad biológica, por ello aislar e identificar los metabolitos secundarios en la actualidad se realiza con mayor exactitud y rapidez con el desarrollo de nuevas y mejores herramientas como los bioensayos de toxicidad y citotóxicos *in vitro*, así como métodos *in vivo* empleando organismos vivos como ratas, ratones, conejos así como las técnicas analíticas, cromatografía, resonancia magnética nuclear, análisis infrarrojo y la espectrometría de masas.

En el presente estudio se muestra un análisis y caracterización fisicoquímica de la hoja de neem *Azadirachta indica* de origen local recolectadas del campo de UABC Vicerrectoría.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Realizar la caracterización fisicoquímica de la hoja de neem (*Azadirachta indica*) mediante normas ASTM, NREL y TAPPI.

1.2.2 Objetivos específicos

- Revisar el estado del arte de las publicaciones científicas y tecnológicas a través de patentes.
- Determinar el contenido de humedad, material volátil, ceniza y carbono fijo de la hoja de neem conforme a los procedimientos ASTM y NREL.
- Realizar el análisis químico que consiste en la determinación de extraíbles en solvente orgánico, extraíbles en agua caliente, lignina, holocelulosa, celulosa y hemicelulosa, de acuerdo con los procedimientos ASTM y TAPPI.
- Realizar análisis de espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF).

Capítulo 2: Marco teórico

2.1 Descripción de la *Azadirachta indica*

El árbol de neem *Azadirachta indica* A. Juss, es una planta perenne arbórea originaria de la India, se adapta y crece bien en zonas de clima tropical y subtropical. Esta planta tiene propiedades insecticidas (27), antibacteriales (28), además tiene uso forestal (29) y farmacológico (30). Debido a estas características muchos países han hecho el esfuerzo por importarla. En México fue introducido en 1989 por la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.1.1 Origen y distribución

El neem es una planta cuyo origen es la India, la mayoría coincide en que es de zonas secas de la montaña Siwalík de la India y Birmania, ubicados en la región tropical del suroeste Asiático, otros lo ubican en el Subcontinente Indo-Pakistaní, en las áreas secas del sur y sureste Asiático, incluyendo Pakistán, Sri Lanka, Birmania, Tailandia, Malasia e Indonesia.

En la actualidad se encuentra distribuido en más de 78 países como se muestra en la Figura 3, en el continente Asiático, Africano, Oceanía, Centro y sur América. Se estima que en el mundo existen alrededor de 200 millones de árboles, la mayor parte de ellos en Asia, donde crecen bajo cultivo y en forma silvestre, particularmente en la India.

En África se encuentran árboles en Nigeria y Sudán, sobre la costa Este de Etiopía, Somalia, Kenia, Tanzania y Mozambique y en la región Oeste, en Mauritania, Togo, Costa de Marfil y Camerún.



Fig. 3: Distribución mundial del neem. Fuente: SAGARPA (21).

En Europa, se encuentran principalmente árboles experimentales en Alemania y en la costa Oeste de Francia.

En América se encuentra en países como Trinidad y Tobago, Jamaica, Puerto Rico, Islas Vírgenes, Surinam, Guyana, Barbados, Cuba, República Dominicana, Haití, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Bolivia, Ecuador, Argentina y Brasil.

2.1.2 Clasificación y descripción botánica

El neem tiene como nombre científico *Azadirachta indica* A. Juss y pertenece a la familia *Meliaceae*, a la cual también pertenece el cedro, la caoba, el paraíso (piocha o canelo). La clasificación del neem la describe Baley, 1977 como sigue en la Tabla

1:

Tabla 1: Taxonomía del neem

| | |
|--------------------|--------------------|
| Reino | Vegetal |
| Subreino | Trachaeophyta |
| División | Embriofitas |
| Subdivisión | Angiospermas |
| Clase | Dicotiledónea |
| Orden | Geraniales |
| Familia | Meliaceae |
| Género | Azadirachta |
| Especie | Azadirachta indica |

El neem es un árbol de crecimiento rápido, robusto, de hoja perenne, siempre verde y frondosa. Sus características botánicas se describen a continuación:

Árbol. El tronco del neem crece recto y alcanza un grosor hasta de 2.5 m; la corteza es de color gris rojizo y de un espesor hasta de 2.5 cm; el árbol puede alcanzar una altura de 30 m y un diámetro de copa de 25 m; puede vivir por más de 200 años. En la Figura 4a se muestra un árbol de neem.

Hoja. Es peciolada de forma aserrada y de alrededor de 7 a 10 cm de largo, y ancho de 3 a 4 cm; cuando son jóvenes (retoños) son de color rojo cobrizo, al madurar cambian a verde oscuro como se observa en la Figura 4b. Las hojas se agrupan en foliolos de 35 cm de largo, con una separación entre hojas de 3 a 4 cm. Cada foliolo presenta 7 pares, las hojas son compuestas imparipinadas más una terminal. La caída de hojas del árbol ocurre solo bajo extrema sequía o después del daño por heladas.

Raíz. Presenta una raíz principal pivotante de rápido crecimiento y desarrollo, clave para resistir la sequía como se observa en la Figura 4c, lo que permite vivir en suelos muy pobres, alcanza hasta el doble de la altura del árbol, con esto permite extraer nutrientes del subsuelo profundo.

Flor. Es pequeña de 5 mm, blanca, crema o amarillenta, bisexual, actinomorfa, que crece en racimos como se observa en la Figura 3d de hasta 22 cm de largo de manera axilar; en plena floración su aroma y néctar facilitan su polinización. La floración depende de las condiciones edafoclimáticas de cada región y su fecundidad depende de la cantidad de iluminación recibida así como de la humedad del suelo, las que estimulan e inhiben el aborto floral.

Fruto. Es una drupa elipsoidal, lisa de 1.4 a 2.4 cm de largo, producido en racimos; el color de la cáscara al inicio de su formación es verde con endocarpio blanco y duro; al madurar la cáscara se torna amarillenta como se aprecia en la Figura 4e. La pulpa es jugosa y dulce, consumible por humanos, aves y animales; además, encierra a la semilla. El fruto tiene maduración desuniforme, no simultánea (ya que es posible ver en una misma rama flores, frutos inmaduros y frutos maduros), debido al brote secuencial de flores; en México maduran la mayoría de los frutos entre los meses de julio y septiembre.

Semilla. Tiene forma elipsoidal, mide alrededor de 1.4 cm de largo y 6.5 mm de ancho, está envuelta de una cáscara color café que contiene una semilla y algunas veces hasta dos como se aprecia en la Figura 4f. Esta es la parte más importante del árbol porque en ella se almacena la mayoría de sus propiedades (21).

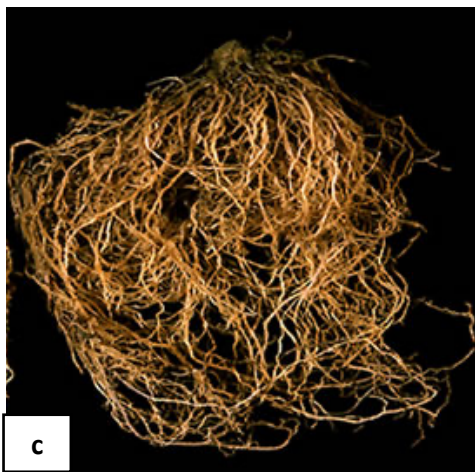


Fig. 4: Elementos macroscópicos del neem, a) árbol, hoja, c) raíz, d) flor, e) fruto y f) semilla. Fuente: elaboración propia

El neem contiene más de 35 componentes biológicamente activos; la azadiractina es el ingrediente activo con propiedades insecticidas predominante en semillas, hojas y otras partes del árbol de neem. La nimbidina, azadiractina y nimbina son los compuestos activos responsables de su actividad antibacteriana (31).

Hasta el momento, se han extraído y aislado más de 300 fitoquímicos químicamente diversos y estructuralmente complejos, de diferentes partes de este árbol, de las hojas la azadiractina (AZA), nimonol y nimocinol y nimocinolida; ácido gálico, galocatequina y epitequina de la corteza; azadiractina, azadiradiona, nimbina, Salanina y epoxiazadiradiona de las semillas. En la Figura 5 se muestran los principales compuestos presentes en la hoja de neem. Estos compuestos químicos han demostrado una amplia gama de efectos inusuales contra un amplio espectro de plagas (insectos, hongos y virus). En la Tabla 2 se muestran los principales compuestos presentes en el neem, así como su peso molecular y en que parte de la planta se encuentra presente.

Tabla 2: Identificación de los principales compuestos químicos aislados de la *Azadirachta Indica* (32)

| Compuesto | Sinónimo | PubChem CID | Fórmula Molecular | Peso Molecular (g/mol) | Se encuentra en |
|--------------|--|-------------|---|------------------------|----------------------------|
| Azadirachtin | Azadirachtin Azadirachtin A Bioneem Neem Azal Azadirachtin – A | 5281303 | C ₁₅ H ₄₄ O ₁₆ | 720.7 | Semilla |
| Nimbin | UNII-N4CTG7K9IU N4CTG7K9IU CHEBI:67304 SCHEMBL1111339 CHEMBL1774397 BDBM92412 DTXSID80208168 | 108058 | C ₃₀ H ₃₆ O ₉ | 540.6 | Árbol |
| Nimonol | CHEMBL2386304 | 73356511 | C ₂₆ H ₃₆ O ₅ | 452.6 | Hoja, semilla, fruta |
| Nimocinol | Nimocinol (+)- Nimocinol DTXSID20915046 | 178770 | C ₂₈ H ₃₆ O ₅ | 452.6 | Hoja, semilla, fruta |
| Salannin | Azadiractin Alannin Azadirachtin | 6437066 | C ₃₄ H ₄₄ O ₉ | 596.7 | Árbol |
| Azadiradione | CHEBI:67280 26241-51-0 CHEMBL1215754 BDBM92410 Q27135739 | 12308714 | C ₂₅ H ₃₄ O ₅ | 450.6 | Hoja, semilla, fruta |

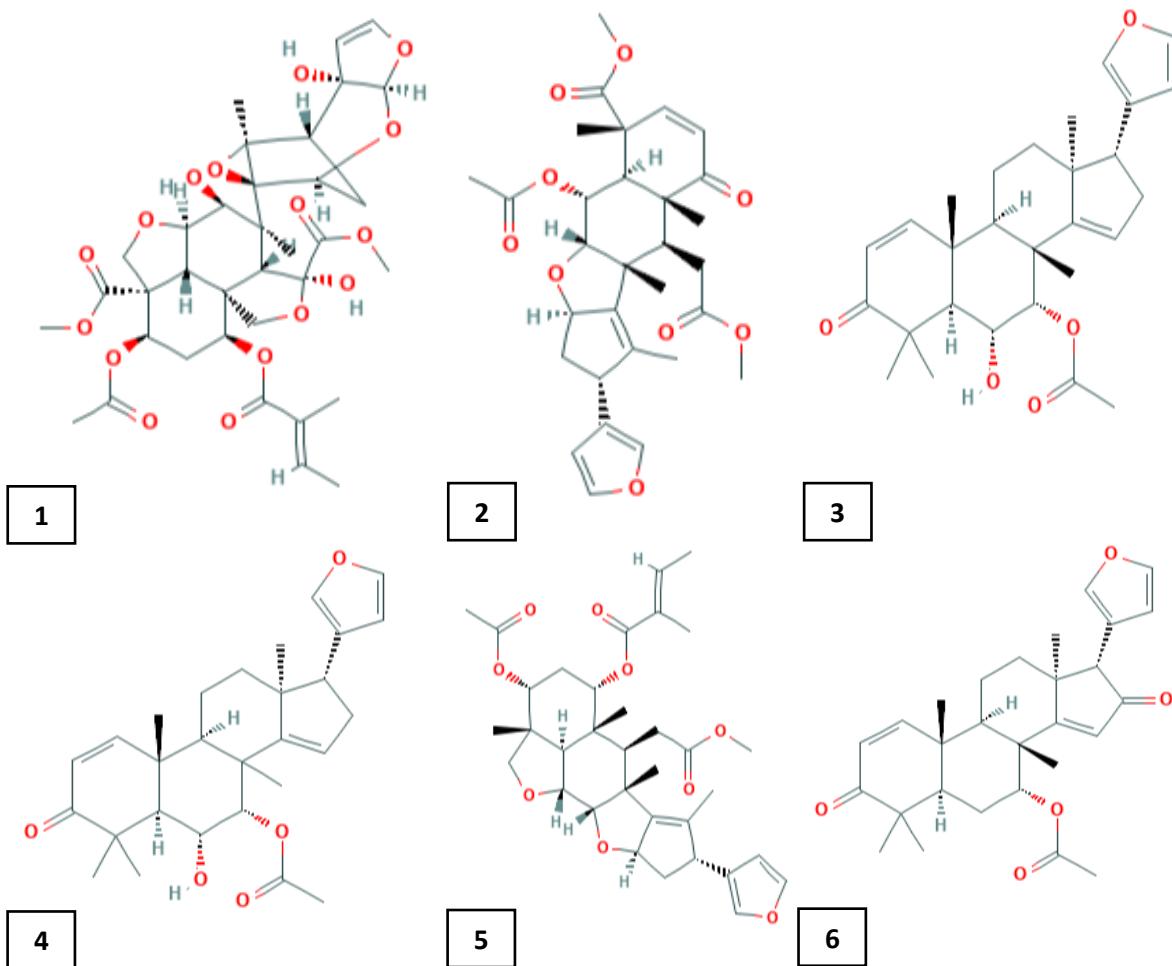


Fig. 5: Estructuras de compuestos químicos aislados de la *Azadirachta indica*, 1, Azadirachtin, 2, Nimbin, 3, Nimonol, 4, Nimocinol, 5, Salannin, 6, Azadiradione. Fuente: PubChem (32).

2.2 Compuestos químicos de las plantas

Los vegetales producen metabolitos secundarios, que resultan de interés desde el punto de vista fitoquímico. Algunos de estos metabolitos secundarios son los siguientes: ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, antibióticos, lignanos, aceites esenciales, alcaloides, esteroides, terpenos entre otros (33). Estos compuestos fitoquímicos son extraídos utilizando diversos

solventes. En la Tabla 3 se muestran los fitoquímicos presentes en extractos de neem utilizando agua y metanol como solventes (34).

Tabla 3: Fitoquímicos presentes en extractos acuosos y metanólicos de hojas de *Azadirachta indica*

| Fitoquímico | Extracto acuoso | Extracto metanólico |
|---------------|-----------------|---------------------|
| Alcaloides | + | + |
| Flavonoides | + | + |
| Fenoles | + | + |
| Terpenoides | + | + |
| Antraquinonas | + | + |
| Glucósidos | - | - |
| Saponinas | - | - |
| Esteroides | + | + |
| Taninos | + | + |

2.3 Características generales de los metabolitos secundarios

Como parte de la respuesta de la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y ataques microbianos en las plantas, se induce la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular conocidos como metabolitos secundarios (35). Estos metabolitos secundarios participan atacando directamente al microorganismo patógeno restringiendo su invasión al resto de la planta. En la actualidad, se conocen 20,000 estructuras de metabolitos secundarios que por su composición química son clasificados en dos grupos: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno son los

alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinatos. Los metabolitos secundarios no nitrogenados incluye a los terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (35).

Los metabolitos secundarios tienen gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos. También participan en la síntesis activa que se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tal como se muestra en la Figura 6 que son: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos tales como bacterias, virus y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, luz y nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (35).

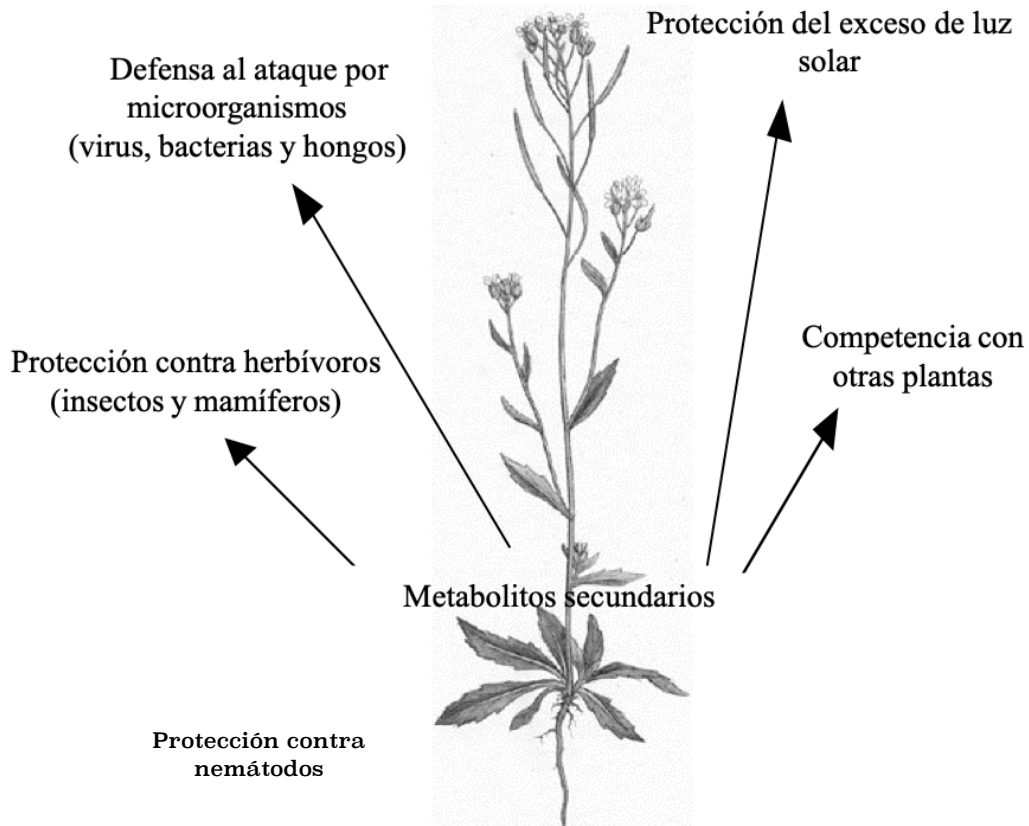


Fig. 6: Principales causas por las cuales, los metabolitos secundarios inducen una respuesta de defensa de las plantas. Fuente: Sepúlveda (35).

2.4 Caracterización fisicoquímica de la hoja de neem

Análisis próximo

Este comprende las determinaciones que se realizan para conocer los macro componentes presentes como el contenido de agua, fibra bruta, grasas, nitrógeno y proteína bruta. Estos análisis incluyen la determinación de humedad, material volátil, cenizas y carbono fijo. Asimismo resultan importantes las determinaciones relacionadas con la caracterización de algún grupo de nutrientes en particular (36).

Contenido de humedad

El contenido de humedad está relacionado con la masa de agua presente en un material (37). El secado es uno de los métodos más comunes para valorar el contenido de humedad; se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debido a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. El principio operacional del método de determinación de humedad incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra (38).

Contenido de materia volátil

Los materiales volátiles son desprendimientos gaseosos de la materia orgánica e inorgánica durante el calentamiento. La muestra de masa conocida se lleva a 900 ± 10 °C en ausencia de aire por 7 minutos. A medida que la masa se calienta, se desprenden productos gaseosos y líquidos, existen desprendimientos a temperaturas bajas, pero esto aumenta a partir de los 550 °C, los principales constituyentes gaseosos son agua, hidrógeno, dióxido de carbono, monóxido de carbono, metano y otros. Un calentamiento rápido aumenta el porcentaje de material volátil (39).

Contenido de cenizas

En el análisis próximo, las cenizas se definen como el residuo inorgánico que se obtiene al incinerar la materia orgánica (36). Cuando un material es tratado térmicamente a temperaturas entre 500 y 600 °C, el agua y otros constituyentes

volátiles son expulsados como vapores en tanto los constituyentes orgánicos son transformados en presencia del oxígeno del aire en dióxido de carbono (CO_2) y dióxido de nitrógeno (NO_2) mientras que el hidrógeno es expulsado como vapor de agua. Los minerales constituyentes (cenizas) permanecen en el residuo en forma de óxidos, sulfatos, fosfatos, silicatos y cloruros, estos dependen de las condiciones de incineración y la composición del producto analizado (36).

Carbono fijo

Esta parte es la que no es volátil y se quema en estado sólido (39). El contenido de carbono fijo se calcula al sustraer el material volátil y contenido cenizas de la masa inicial de la muestra.

Análisis químico

En el análisis químico se determinan las composiciones de los extraíbles, celulosa, lignina y hemicelulosa. La lignina, celulosa y hemicelulosa son los tres polímeros fundamentales que constituyen y forman las plantas. Éstas están unidas fuertemente por enlaces no covalentes y entrecruzamientos covalentes, lo que resulta en un estructura compleja.

Extraíbles

Los materiales solubles o extractivos consisten en aquellos componentes que son solubles en solventes orgánicos neutros. Los extraíbles con solvente son principalmente resinas, ácidos grasos y sus ésteres, ceras y sustancias insaponificables.

Celulosa

La celulosa es el polisacárido macromolecular que está ampliamente distribuido y es el más abundante en la naturaleza. Cerca del 50% del carbono en las plantas se encuentra en la celulosa (40). Por ejemplo, del 40-45% del material seco existe en forma de celulosa en la madera. Usualmente la celulosa viene incluida con la hemicelulosa y lignina, por eso es difícil obtenerse por remoción directa. La celulosa contiene principalmente tres elementos: carbono, hidrógeno y oxígeno en las siguientes proporciones 44.2%, 6.3% y 49.5%, respectivamente, y la fórmula química de su monómero se puede expresar como $(C_6H_{10}O_5)$. La estructura química se muestra en la Figura 7. Como es un polisacárido macromolecular, algunas veces es indicada como $(C_6H_{10}O_5)_n$, donde n es el grado de polimerización. La glucosa en la celulosa se convierte en D-pirano glucosa, y la unidad básica de glucosa está unida por enlaces β -1,4 glicosídicos. Los enlaces glicosídicos no son fuertes y tienden a degradarse bajo condiciones ácidas y altas temperaturas (40).

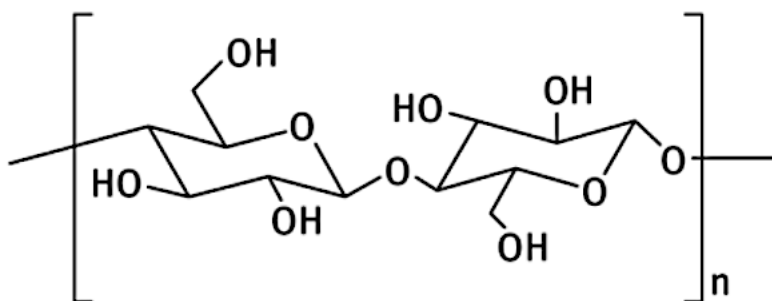


Fig. 7: Estructura básica de la celulosa. Fuente: Wang (40).

Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más común en la naturaleza, representa cerca del 20-35% de la biomasa lignocelulósica. Los xilanos son las hemicelulosas más abundantes. Las hemicelulosas son polímeros heterogéneos de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y ácidos de azúcar. La hemicelulosa de madera dura contiene principalmente xilano, mientras que la hemicelulosa de madera blanda contiene principalmente glucanos como se muestra en la Figura 8. Los xilanos de muchos materiales vegetales son heteropolisacáridos con cadenas principales homopoliméricas de unidades de b-D-xilopiranosas con enlaces 1,4. Además de la xilosa, los xilanos pueden contener arabinosa, ácido glucorónico o su 4-O- metil éter y ácidos acético, ferúlico y p-cumárico. La frecuencia y composición de las ramas dependen de la fuente de xilano (41).

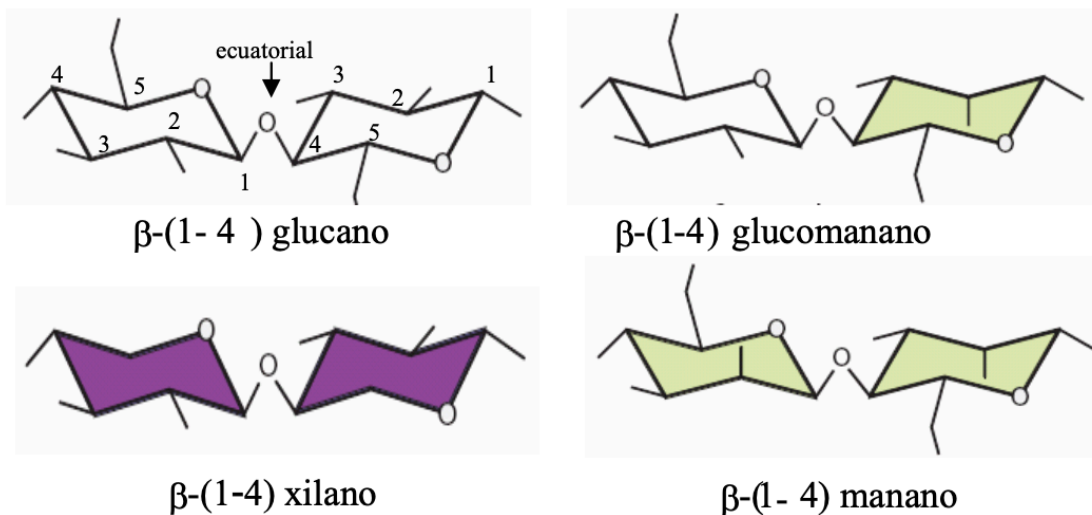


Fig. 8: En hemicelulosas los enlaces β -(1 \rightarrow 4) se unen los átomos C1, O y C4 en posición equatorial, entre unidades de glucosa, xilosa y manosa. Fuente: Saba (41).

Lignina

El botánico suizo A.P. Candolle (1778-1841) utilizó el término “lignina” (derivado del latín *lignum* = madera) por primera vez. La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforman la pared celular de las plantas. La lignina está presente en todas las plantas vasculares y al igual que muchos componentes, se forma por medio de la fotosíntesis (42). Los precursores de las ligninas parecen ser compuestos, como el ácido hidroxifenilpirúvico, que pueden derivarse a través de una serie de reacciones de condensación que comienzan con glucosa (43).

2.5 Análisis elemental

El carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre son, sin lugar a duda los elementos de mayor interés en las aplicaciones orgánicas (44). La técnica del análisis elemental permite determinar el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre (C,H,N y S) presente en muestras orgánicas e inorgánicas, tanto sólidas como líquidas, que no posean calcio ni fósforo. Estos análisis permiten la determinación de contenido de estos elementos en las muestras estudiadas, lo que es esencial para la determinación de la composición química de los materiales. El análisis elemental para determinar C, H, N y S se basa en la volatilización de la muestra, ésta se lleva a combustión total en presencia de oxígeno puro, liberando los elementos en forma de CO₂, H₂O, NO_x y SO_x, respectivamente. Un proceso posterior de reducción transforma los NO_x y SO_x en NO₂ y SO₂, respectivamente. Los gases formados se analizan por medio de un detector. La muestra se oxida por completo y transforma de manera instantánea a todos los compuestos presentes en productos

de combustión. Los gases resultantes de la combustión son enviados a un tubo reductor con helio (He) y posteriormente son separados selectivamente en columnas específicas. Finalmente, los gases son desorbidos térmicamente e introducidos de forma separada a un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes de la muestra (45).

2.6 Revisión tecnológica de patentes

Se realizó una revisión de patentes en las plataformas Patenscope y Google Patents buscando las palabras neem leaf y neem extracts, ya que la parte que se utilizó en este trabajo fue la hoja. El objetivo de esta revisión fue conocer que productos innovadores de la hoja de neem se encuentran patentados, ya que esto es una valiosa fuente de información científico-tecnológica. El periodo de búsqueda comprendió 1985 a noviembre de 2020.

Se encontró que hay patentes registradas en las que se ha utilizado el neem para obtener distintos productos y usos como antibacterial tal y como se muestra en la patente WO 02/22147 A1 (46), por el inventor Brindavanam et al en la que se obtuvo un extracto para el tratamiento de infecciones bacterianas que son resistentes a los antibióticos. En la patente US 2016/0213604 (47), por el inventor Joon Kim se proporciona un método para obtener un extracto de neem y un péptido para inhibir el crecimiento de bacterias en la cavidad oral.

Aplicaciones insecticidas como se muestra en la patente WO 92/19616 (48), por el inventor Henry Guerrini en la que se utiliza un extracto de neem para mejorar la

propiedades insecticidas de repelentes naturales como la citronela. En la patente WO 2017/203454 A1 (49), protegida por Fernando Orozco et al, se obtuvo un extracto de neem que puede usarse como pesticida.

Se han registrado patentes en las que se utilizan sus propiedades como espermicida, en la patente WO 2007/074478 A1 (50), registrada por el inventor Rajesh Jain et al, en la que se obtuvo un extracto para realizar un dispositivo contra enfermedades de transmisión sexual y embarazos.

Se encontró el registro de una patente con el número US 9,668,473 B2 (51), registrada por el inventor Moacir Rossi et al, utilizada para la obtención de nano partículas biopoliméricas.

En la patente 5,370,873 (52), registrada por el inventor Ironka J. Udeinya, se prueba la actividad in vitro de los extractos de neem contra enfermedades como el SIDA, cáncer y la malaria.

Se ha demostrado en patentes como la US 2019/0211027 A1 (53), por el inventor Srivari Chandrasekhar et al, y la patente US 2020/0069636 A1 (54), por el inventor Soman Girish Sudhakar, que algunos de sus compuestos como la nimbolida tiene efectos anti-cancerígenos.

Los extractos en agua caliente han demostrado presentar efectividad contra las células que causan tumores como se muestra en la patente 4,537,774 (55), por el inventor Masaki et al.

Se han elaborado alimentos como en la patente JP 6256011 A (56) en la que el inventor Takeo Nomura elabora un dulce utilizando un extracto de neem mezclado

a una reducción de azúcar, miel o maltitol y bebidas utilizando hojas de neem como en las patentes JP 2006096619 A (57), por el inventor Hidai Hideto y en la patente JP 2005283885 A (58) por el inventor Takahashi et al.

Derivado de la revisión de patentes y encontrándose diversas aplicaciones tales como antibacteriales, alimenticias, médicas. Derivado de lo anterior es de gran apoyo para identificar las áreas en las que esta siendo utilizada esa planta, derivado del presente trabajo. Para ello, se realizó una caracterización fisicoquímica para conocer las diversas aplicaciones.

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1 Recolección y preparación de la muestra

Las hojas de neem (*Azadirachta indica*), fueron recolectadas en los meses de agosto y septiembre de 2019, de los campos de UABC Vicerrectoría Campus Mexicali, ubicada en Blvd. Benito Juárez Mexicali Baja California México.

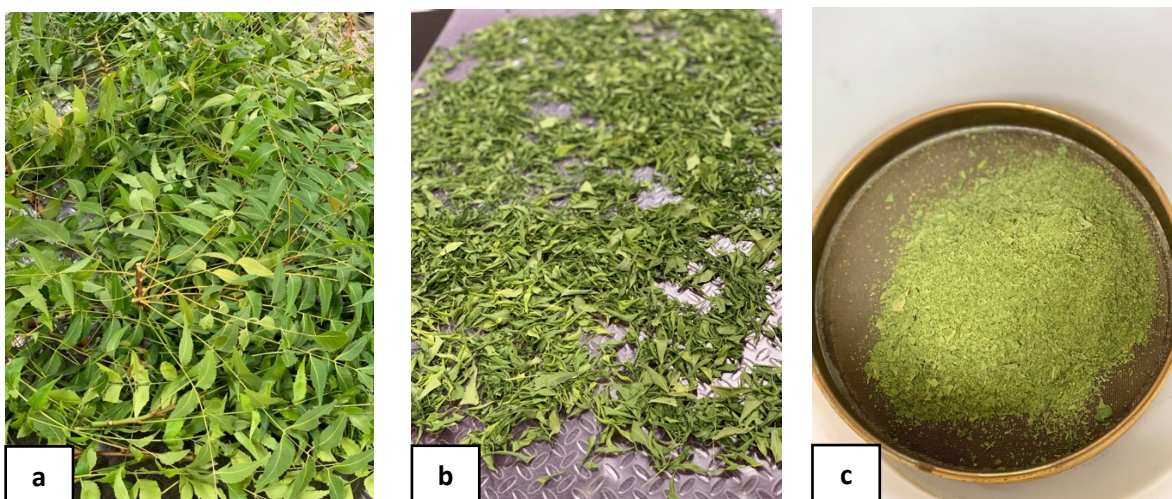


Fig. 9: Hojas de neem a) frescas, b) secas, c) moídas y en el tamiz a 0.5 mm. Fuente: elaboración propia

Las hojas se secaron a temperatura ambiente por 2 semanas con el fin de retirarles la humedad y proceder a su molienda. Posteriormente, la muestra se molió con una licuadora marca Taurus modelo RIBBON de 2 velocidades y se pasó por un tamiz SIEVE N° 35 de 0.5 mm. En la Figura 9 se observa como fue todo este proceso.

3.2 Análisis próximo

El análisis próximo incluye determinaciones de contenido de humedad, material volátil, cenizas y carbono fijo. En el presente trabajo se realizaron las cuatro determinaciones por triplicado.

Contenido de humedad base húmeda

Para la determinación de humedad se basó en el procedimiento NREL/TP-510-42621 (59). Se pesó 1 g de muestra en una cápsula de porcelana libre de humedad y ésta se colocó en la estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 14 h. Se escogió este método ya que este se puede utilizar para determinar la cantidad de sólidos totales que quedan después del secado. El porcentaje de humedad H se calculó mediante la ecuación 1 y se obtuvo su desviación estándar.

$$H = 100 - \left(100 \frac{Wf}{Wi}\right) \quad \boxed{\text{Ec.1}}$$

Donde:

H = humedad, %.

Wi = masa inicial de la muestra, g.

Wf = masa final de la muestra después del calentamiento, g.

Contenido de humedad base seca

Para determinar la humedad en base seca las hojas se secaron por 2 semanas a temperatura ambiente, se molieron y tamizaron. Se pesó 1 g de muestra en una cápsula de porcelana libre de humedad y ésta se colocó en la estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 14 h. El porcentaje de humedad H se calculó mediante la ecuación 1 y se obtuvo su desviación estándar.

Material volátil

La determinación de material volátil se realizó de acuerdo con el procedimiento de la norma ASTM E872-82 (60). En una cápsula de porcelana libre de humedad se

pesó 1 g de muestra. La muestra fue introducida en la mufla a 950°C por 7 min. Ésta se dejó enfriar a temperatura ambiente, se colocó en el desecador y se midió su masa. El porcentaje de masa perdida MP se calculó utilizando la ecuación 2, después se calculó el porcentaje de materia volátil MV con la ecuación 3 y se calculó su desviación estándar.

$$MP = 100 - \left(100 \frac{Wf}{Wi}\right)$$

$$MV = MP - H \quad \boxed{\text{Ec.3}}$$

Donde:

MP = masa perdida, %.

MV = material volátil, %.

Wi = masa inicial de la muestra, g.

Wf = masa final de la muestra después del calentamiento, g.

Contenido de cenizas

El contenido de ceniza se determinó de acuerdo a lo establecido en la norma ASTM E830 (61). Se colocó en una cápsula de porcelana la muestra libre de humedad y material volátil. Esta se calentó en la mufla a 580°C durante 4 h. La muestra se retiró de la mufla y se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, se colocó en el desecador y se pesó. El porcentaje de ceniza CE se calculó mediante la ecuación 4 y se calculó su desviación estándar.

$$CE = \left(100 \frac{Wf}{Wi}\right) \quad \boxed{\text{Ec.4}}$$

Donde:

CE = ceniza, %.

W_i = masa inicial de la muestra, g.

W_f = masa final de la muestra después del calentamiento, g.

Carbono fijo

El porcentaje de carbono fijo CF en base seca se calculó por diferencia de pesos.

Al total de la muestra se le restó MV y CE . Lo anterior se expresa en la ecuación 5 y se sacó su desviación estándar.

$$CF = 100 - MV - CE \quad \boxed{\text{Ec.5}}$$

Donde:

CF = carbono fijo, %.

MV = material volátil, %.

CE = ceniza, %.

3.3 Análisis químico

Mediante el análisis químico se determinó el contenido de extraíbles en solvente orgánico, extraíbles en agua caliente, lignina, holocelulosa, celulosa y hemicelulosa.

Contenido de extraíbles en solvente orgánico

El procedimiento para calcular los extraíbles en solvente orgánico se basó en la norma T 204 cm-97 (62). Se tomaron 5 g de hoja de neem libres de humedad y se colocaron en un papel filtro seco y de masa conocida. Se realizó el montaje de la Figura 10a, para esto se acopló un equipo de extracción Soxhlet a un condensador. Se utilizaron 200 mL de acetona como solvente orgánico. Se mantuvo el solvente en ebullición por 4 h, asegurándose al menos 5 sifones por hora. Para finalizar se secó el papel filtro en la mufla a 105°C por 3 h, se midió la masa y se calcularon los extraíbles en acetona con la ecuación 6.

$$\%Ex_{acetona} = \left(\frac{W_i - W_f}{W_i} \right) * 100 \quad \boxed{\text{Ec. 6}}$$

Donde:

$Ex_{acetona}$ = material extraíble en acetona, %.

W_i = masa inicial de la muestra, g.

W_f = masa final de la muestra, g.

Contenido de extraíbles en agua caliente

Se determinó la cantidad de extraíbles en agua caliente de acuerdo con la norma T 207 cm-99. En un matraz Erlenmeyer (Junta 24/40) se depositaron 2 g de muestra libre de humedad y extraíbles en acetona y se le añadieron 200 mL de agua. Se realizó el montaje de la Figura 10b. El matraz con la muestra se colocó a baño María por 3 h, manteniéndose el nivel del agua por encima del nivel de la muestra y en ebullición constante. Transcurridas las 3 h, el contenido del matraz se filtró en un

embudo Büchner con un papel filtro No. 5 libre de humedad y de masa conocida como se muestra en la Figura 11. Se realizó un lavado con 200 mL de agua caliente. Finalmente, se secó en la mufla el papel con la muestra a 105°C por 4 h. La cantidad de extraíbles en solvente orgánico se determinó con la ecuación 7.

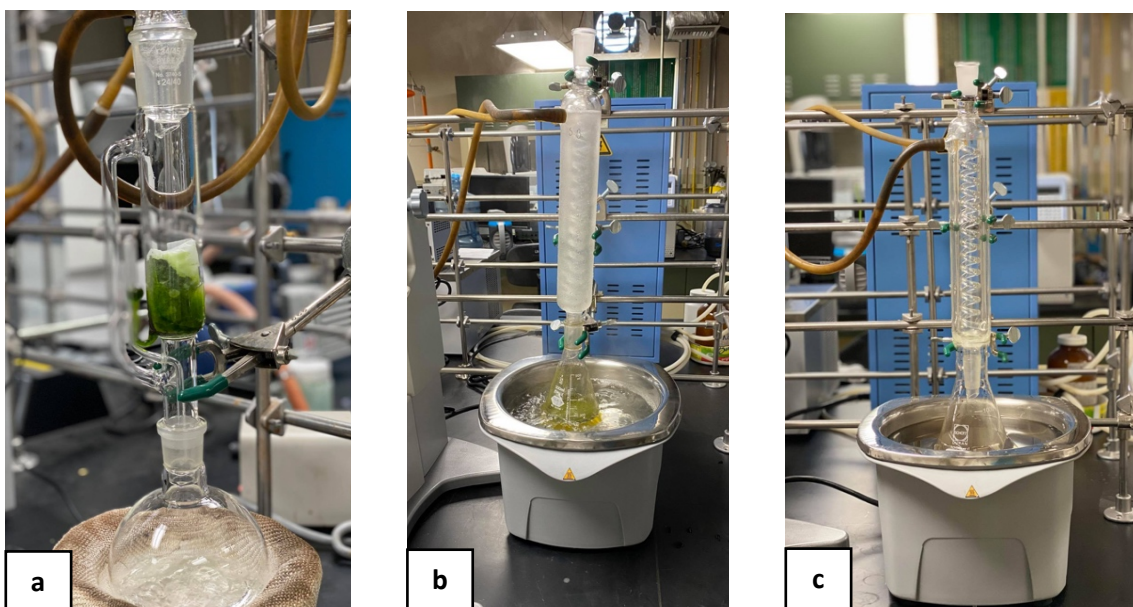


Fig. 10: Análisis químico a) extraíbles en acetona, b) extraíbles en agua caliente, c) lignina. Fuente: elaboración propia.

$$\%Ex_{hw} = 100 * \left(\frac{W_i - W_f}{W_i} \right) \quad \boxed{\text{Ec.7}}$$

Donde:

$Ex_{hot\ water}$ = material extraíble en agua caliente %.

W_i = masa inicial de la muestra, g.

W_f = masa final de la muestra, g.



Fig. 11: Extraíbles en agua caliente a) extraíbles en agua caliente sin filtrar, b) extraíbles en agua caliente filtrados. Fuente: elaboración propia.

Contenido de lignina

La metodología utilizada para la determinación de contenido de lignina se basó en la norma ASTM D1106–96. Se mezcló 1 g de muestra seca libre de extraíbles totales con 15 mL de H_2SO_4 al 72% y a 13 °C. Se agitó la mezcla a 400 rpm durante un minuto y a 200 rpm durante 2 h. Esto se trasvasó a un matraz Erlenmeyer de 1 L y se añadieron 560 mL de agua para lograr una dilución del ácido al 3%. Después, se realizó el montaje de la Figura 10c, en el que el contenido del matraz es llevado a ebullición con reflujo por 4 h. A continuación, se dejó enfriar el matraz a temperatura ambiente y su contenido se filtró en un embudo Büchner con un papel filtro No. 5 libre de humedad y de masa conocida. Posteriormente se lavó con 500 mL de agua caliente para dejar a la muestra libre de ácido. El papel y la muestra se llevaron a secar a la mufla a 105 °C por 4 h como se observa en la Figura 12. Finalmente, se

midió la masa de la muestra remanente y se calculó el contenido de lignina con la ecuación 8.

$$\%Lig = 100 * \left(\frac{W_f}{W_i}\right) \quad \boxed{\text{Ec.8}}$$

Lig = contenido de lignina, %

W_i = masa inicial de la muestra, g.

W_f = masa final de la muestra, g.

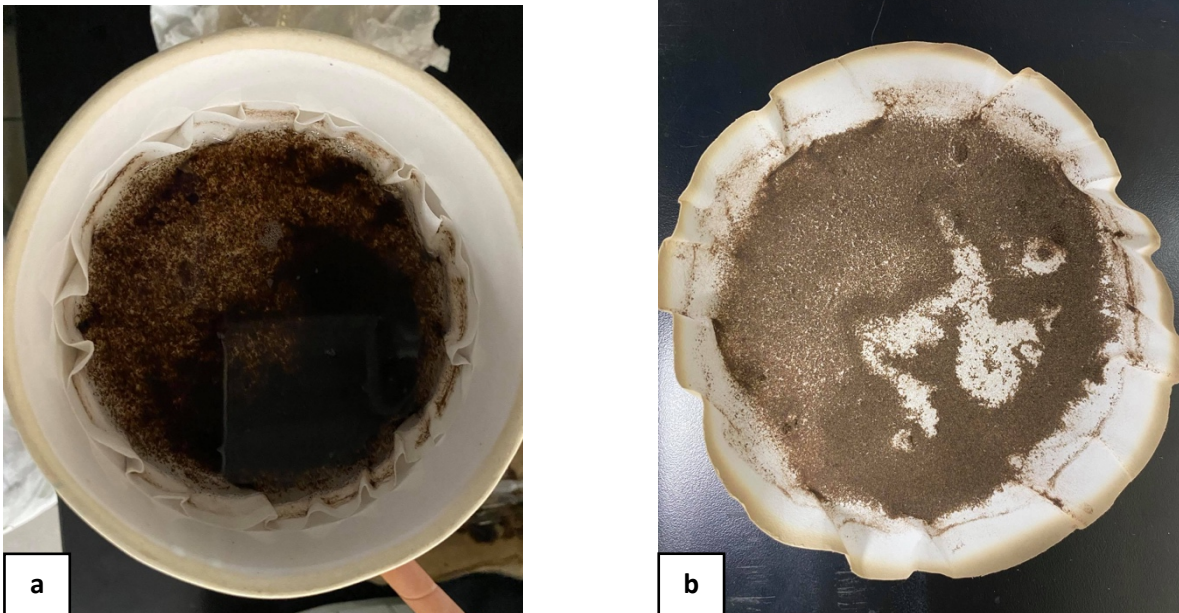


Fig. 12: Determinación de lignina a) lavado y filtrado de lignina, b) lignina seca. Fuente: elaboración propia

Contenido de holocelulosa

La determinación del contenido de holocelulosa se realizó de acuerdo con la norma ASTM D1104-56 (1978). En un matraz Erlenmeyer se colocaron 2 g de hoja de neem libre de humedad y extraíbles totales con 150 mL de agua destilada, 0.2 mL

de ácido acético a 15 °C y 1 g de clorito de sodio. Después se colocó el matraz con tapa en un baño de agua a 75 °C como en la Figura 13 durante 5 h, con agitación constante. Cada hora se le agregó 0.22 mL de ácido acético a 15 °C y 1 g de clorito de sodio. Al transcurrir las 5 h, el matraz se colocó en un baño de agua fría hasta alcanzar los 10 °C. Posteriormente, se filtró el contenido en un embudo Büchner con un papel filtro No. 5 libre de humedad y de masa conocida. Se realizó un lavado con 500 mL de agua fría hasta que la muestra perdió su color amarillo. Finalmente, el papel filtro y la muestra se llevaron a sequedad en la mufla a 105 °C por 4 h. El contenido de holocelulosa se determinó con la ecuación 9.

$$\%Hol = 100 * \left(\frac{W_f}{W_i} \right) \quad \boxed{\text{Ec.9}}$$

Hol = contenido de holocelulosa, %

W_i = masa inicial de la muestra, g.

W_f = masa final de la muestra, g.

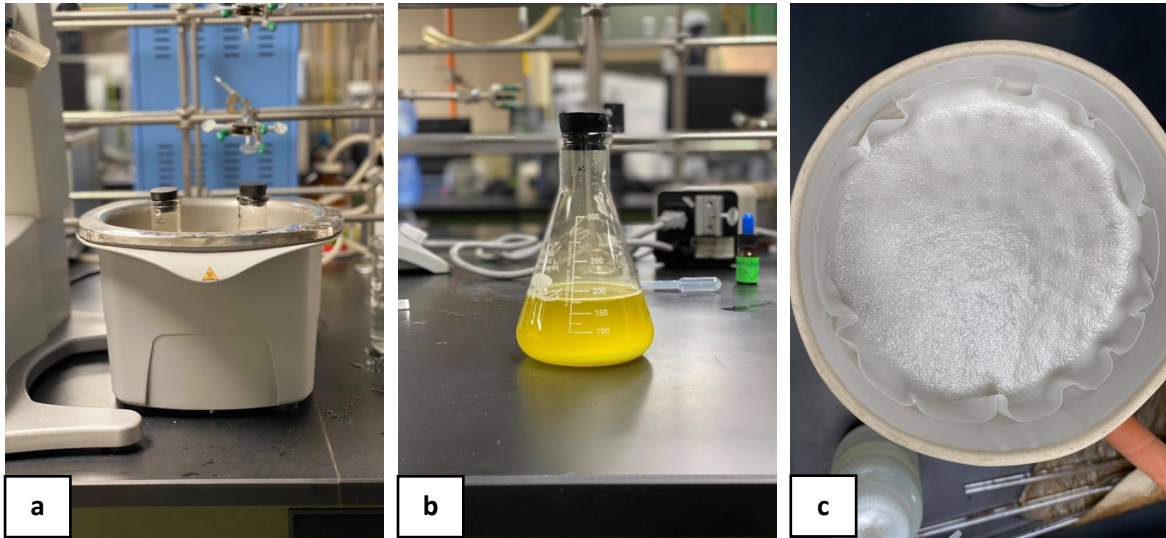


Fig. 13: Determinación de holocelulosa a) montaje, b) holocelulosa, c) holocelulosa limpia. Fuente: elaboración propia.

Contenido de celulosa

La metodología utilizada para la determinación de celulosa se basó en la metodología Rowell (63). En un matraz Erlenmeyer se agregó 1 g de holocelulosa seca y 10 mL de NaOH al 17.5% a 20 °C y se dejó reposar durante 5 min. Se añadieron 5 mL de NaOH al 17.5% a 20 °C en intervalos de 5 min, hasta haber añadido 25 mL de NaOH totales. Después de añadir los últimos 5 mL de NaOH la mezcla se dejó reposar por 30 min. A continuación, se añadieron 33 mL de agua desionizada y se dejó reposar por 60 min. Al transcurrir los 105 min desde el inicio del proceso, la mezcla se filtró en un embudo Büchner con un papel filtro No. 5 libre de humedad y de masa conocida como se muestra en la Figura 14. El residuo fue lavado en el orden siguiente: con 100 mL de NaOH al 8.3%, agua desionizada 15 mL de ácido acético al 10% y agua hasta alcanzar un pH neutro. El papel filtro junto con el residuo fueron llevados a sequedad en la mufla a 105 °C por 4 h. Finalmente, el porcentaje de celulosa se determinó con la ecuación 10.

$$\%Cel = 100 * \left(\frac{W_f}{W_i} \right) \quad \boxed{\text{Ec.10}}$$

Donde

Cel = contenido de celulosa, %

W_i = masa inicial de la muestra, g.

W_f = masa final de la muestra, g.

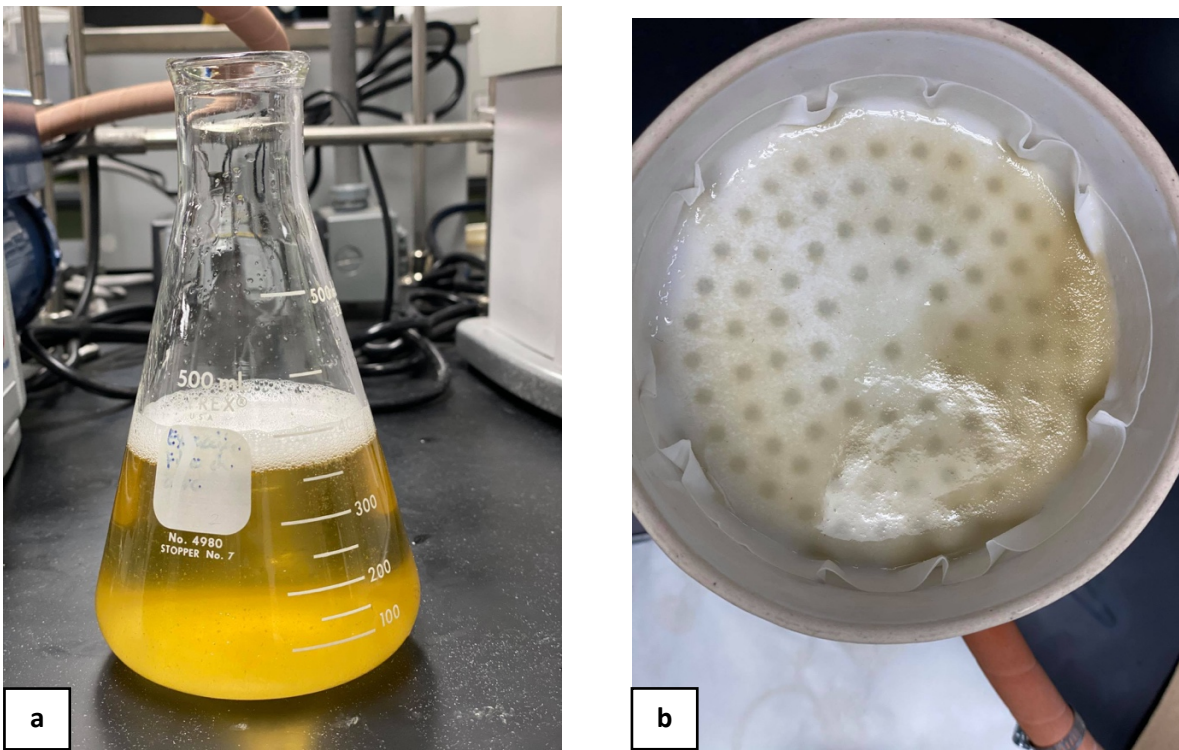


Fig. 14: Determinación de celulosa a) celulosa sin filtrar, b) celulosa filtrada. Fuente: elaboración propia.

Contenido de hemicelulosa

El contenido de hemicelulosa se calculó por diferencia de pesos utilizando la ecuación 11.

$$\%Hem = \%Hol - \%Cel \quad \boxed{\text{Ec.11}}$$

Donde

$\%Hem$ = contenido de hemicelulosa, %

3.4 Análisis del espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF)

El análisis cuantitativo de espectrometría de rayos X se realizó con el espectrómetro de fluorescencia de rayos X de dispersión de energía EDX-7000, Shimadzu. El Espectrómetro de Fluorescencia de Rayos X de Energía Dispersiva EDX-7000 mide la energía (keV) y la intensidad de los rayos X fluorescentes generados para determinar el tipo y el contenido de los elementos que componen una muestra. Se aplica para el análisis elemental no destructivo de muestras sólidas, polvorientas y líquidas. Cuando una muestra es irradiada con rayos X de un tubo de rayos X, los átomos de la muestra generan rayos X únicos que se emiten desde la muestra. Esos rayos X se conocen como "rayos X fluorescentes" y tienen una longitud de onda y una energía únicas que son características de cada elemento que los genera. Por consiguiente, se puede realizar un análisis cualitativo investigando las longitudes de onda de los rayos X. Como la intensidad de los rayos X fluorescentes es una función de la concentración, el análisis cuantitativo también es posible midiendo la cantidad de rayos X en la longitud de onda específica de cada elemento. Se utilizó para detectar oligoelementos en la muestra de hojas y ceniza de neem.

Los procedimientos y análisis desarrollados en el trabajo se resumen en la Tabla 4.

En las secciones siguientes se detalla cada procedimiento.

Tabla 4: Procedimientos para la caracterización fisicoquímica de la hoja de neem

| Proceso | Determinación | Equipo | Norma | Referencia |
|------------------|---------------------------------|--|-------------------------|----------------|
| Pretratamiento | Humedad | - | - | - |
| Análisis próximo | Humedad | Mufia Thermolyne™ | NREL/TP-510-42621 | (59) |
| | Material Volátil | | ASTM E872-82 (2006) | (60) |
| | Ceniza | | ASTM E830-87(2004) | (61) |
| | Carbono Fijo | - | Por diferencia de pesos | (64) |
| Análisis químico | Extraíbles en solvente orgánico | Soxhlet | T 264 cm-07 | (62) |
| | Extraíbles en agua caliente | Baño de agua caliente | T 207 cm-99 | (65) |
| | Lignina | | ASTM D1106-96 (2001) | (66) |
| | Holocelulosa | | ASTM D1104-56 (1978) | (67) |
| | Celulosa | | - | (68) |
| | Hemicelulosa | | - | Por diferencia |
| Análisis XRF | Composición elemental | Espectrómetro de fluorescencia de rayos X EDX-7000, Shimadzu | - | |

Capítulo 4: Resultados y discusiones

4.1 Análisis próximo

En la Figura 15, se muestran ilustrados los cambios que experimentó la hoja de neem durante el análisis próximo. En primer lugar se observa la muestra libre humedad, la segunda posteriormente libre de material volátil y por último se encuentran las cenizas.

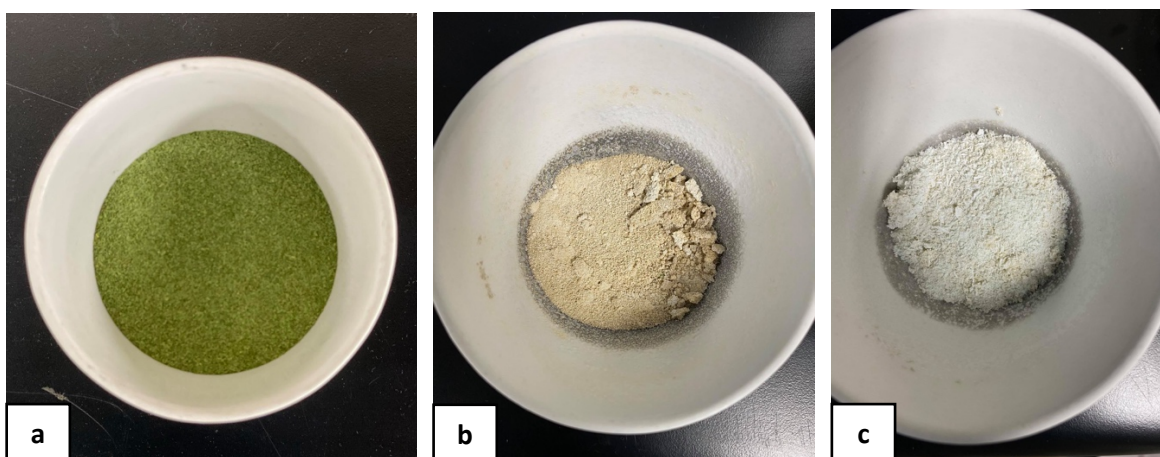


Fig.15: Análisis próximo a) hoja de neem libre de humedad, b) hoja de neem libre de material volátil, c) cenizas. Fuente: elaboración propia.

Los resultados obtenidos del análisis próximo se encuentran en la Tabla 5. El contenido de humedad se expresa en porcentaje de la masa total de la muestra. El contenido de material volátil, cenizas y carbono fijo están expresados en base seca.

Tabla 5: Datos experimentales del análisis próximo de la hoja de neem

| Réplica | H _{bh} (%) | H _{bs} (%) | MV _{bs} (%) | CE _{bs} (%) | CF _{bs} (%) |
|---------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 68.08 | 0.12 | 75.09 | 4.35 | 17.56 |
| 2 | 70.38 | 0.12 | 75.09 | 4.41 | 17.83 |
| 3 | 68.48 | 0.07 | 75.12 | 4.27 | 17.25 |
| Prom | 68.98 | 0.10 | 75.10 | 4.34 | 17.55 |
| DE | 1.23 | 0.03 | 0.02 | 0.07 | 0.29 |

Donde bh: base húmeda, bs: base seca, T.A.: temperatura ambiente, prom: promedio, DE: desviación estándar

Se determinó que el contenido de humedad es alto (68.98%), esto puede representar una desventaja si se quiere secar utilizando un equipo ya que se requiere invertir en energía. Se puede realizar un secado a temperatura ambiente, la desventaja son los tiempos de secado y el espacio para que el material se pueda secar. El contenido de cenizas es bajo (4.34%), el contenido de cenizas reportado por otros autores va del 2.81% al 11.93%. En la Tabla 6 se distingue que Abel et al (69), reportaron un contenido de cenizas ligeramente inferior al del presente trabajo. El contenido de material volátil fue de 75.10%. El contenido de carbono fijo fue de 17.55%. Se puede esperar que con los altos valores de materia volátil y carbono fijo la hoja de neem tenga un alto poder calorífico.

El contenido de humedad en base húmeda es ligeramente inferior al reportado por Kesava et al (70), aunque presenta una diferencia de 7% esta diferencia podría ser porque la muestra es de diferentes países, por lo tanto son diferentes condiciones climáticas, el presentado por Madaki et al (71), Abel et al (69) y por Onyimonyi et al (72) está presentado en base seca.

Tabla 6: Comparación de análisis próximo de la hoja de neem

| Autores | Humedad (%) | Cenizas (%) |
|----------------------|-------------|-------------|
| Presente trabajo | 68.98 | 4.34 |
| Madaki et al (71) | 9.50 | 2.81 |
| Atangwho et al (73) | - | 11.93 |
| Kesava et al (70) | 76.00 | 1.10 |
| Abel et al (69) | 14.30 | 4.03 |
| Onyimonyi et al (72) | 3.5 | 6.0 |
| Obikaonu et al (74) | - | 5.62 |

4.2 Análisis químico

Los resultados obtenidos del análisis químico de la hoja de neem se encuentran en la Tabla 7, todos están expresados en base seca.

Tabla 7: Datos experimentales del análisis químico

| Réplica | Ex _{acetona} (%) | Ex _{hw} (%) | Lig (%) | Hol (%) | Cel (%) | Hem (%) |
|---------|------------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 12.42 | 31.23 | 22.58 | 20.90 | 18.90 | 1.99 |
| 2 | 9.53 | 31.55 | 24.11 | 20.54 | 18.59 | 1.95 |
| 3 | 11.00 | 32.99 | 24.04 | 19.23 | 17.87 | 1.37 |
| Prom | 10.98 | 31.92 | 23.57 | 20.22 | 18.45 | 1.77 |
| DE | 1.45 | 0.94 | 0.87 | 0.88 | 0.53 | 0.35 |

Prom: promedio, DE: desviación estándar.

Se determinó que existe un alto contenido de extraíbles en agua caliente, esto presenta una ventaja ya que algunos compuestos como los metabolitos secundarios son extraíbles en agua caliente y presentan propiedades con distintas aplicaciones.

Los extraíbles en acetona tienen un efecto antipalúdico ya que evitan la propagación de mosquitos como el *Anopheles stephensi* y *Aedes aegypti* y es efectivo contra las cepas resistentes a la cloroquina (75).

Se ha informado que el contenido de polisacáridos (holocelulosa, celulosa y hemicelulosa) tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante, copolimerizada con polivinilpirrolidona se forma un hidrogel para la liberación controlada de metil prednisolona para mejorar la farmacodinámica en enfermedades inflamatorias crónicas del colon (76).

La celulosa, hemicelulosa y lignina son biopolímeros, utilizados para la obtención de nano partículas biopoliméricas (51). Existe una tendencia creciente hacia el uso de materiales de biomasa de desecho para la eliminación de metales pesados del

agua y de aguas residuales debido a su disponibilidad y bajo costo. Los materiales celulósicos son utilizados para adsorber metales pesados del agua como el Cobalto (Co) (77) y Cromo hexavalente (Cr VI) (78).

La celulosa en la hoja de neem mezclada con nanopartículas de plata presenta características potenciales que pueden ser utilizadas como material de cicatrización de heridas (79). Estos mismos nanocompuestos mostraron una buena actividad antibacteriana contra la bacteria *E.coli*, por lo tanto estos mismos pueden ser utilizados en aplicaciones médicas y de envasado (80).

El contenido de lignina es ligeramente superior al que está reportado por Maniraman et al (81). En la Tabla 8 se muestran los resultados del análisis químico realizado en el presente trabajo y el que ha sido reportado por distintos autores.

Tabla 8: Comparación de análisis químico de la hoja de neem

| Autores | Celulosa (%) | Hemicelulosa (%) | Lignina (%) |
|----------------------|--------------|------------------|-------------|
| Presente trabajo | 18.90 | 1.77 | 22.58 |
| Maniraman et al (81) | 68.42 | 13.72 | 13.58 |
| Vinodhini et al (82) | 36.65 | - | 49.35 |
| Costa et al (83) | - | - | 86.1 |
| Sankar et al (84) | - | - | 9.7 |

Se cuentan con pocos datos del análisis químico por lo que se comparó con los datos reportados de la hoja de *Melia Azaderach* conocido como cinamomo, un árbol perteneciente a la familia *Meliaceae* igual que la *Azadirachta indica*. En la Tabla 9 se muestran los datos encontrados. El contenido de lignina del trabajo presente es el más parecido con una diferencia del 1.93% al reportado por Katakí et al (85) y con una diferencia del 7.5% al reportado por Nasser et al (86).

Tabla 9: Comparación de análisis químico de la hoja de neem vs la hoja de *Melia Azedarach*

| Autores | Celulosa (%) | Hemicelulosa (%) | Lignina (%) |
|------------------------|--------------|------------------|-------------|
| Presente trabajo | 18.90 | 1.77 | 22.58 |
| Pandiarajan et al (87) | 66.45 | 12.14 | 16.34 |
| Ramadan (88) | 39.90 | 23.52 | 35.45 |
| Bakshi et al (89) | 13.5 | 12.5 | - |
| Kataki et al (85) | - | - | 20.65 |
| Nasser et al (86) | 41.31 | - | 29.73 |

De igual manera se compararon los datos de la *Azadirachta indica* con los reportados de la hoja de *Swietenia humilis* conocido como venadillo un árbol perteneciente a la familia *Meliaceae*. En la Tabla 10 se muestran los datos encontrados. El contenido de lignina del trabajo presente es superior 12.22% al presentado por Muñoz et al (90).

Tabla 10: Comparación de análisis químico de hoja de neem vs la hoja de *Swietenia humilis*

| Autores | Lignina (%) |
|------------------|-------------|
| Presente trabajo | 22.58 |
| Muñoz et al (90) | 10.36 |
| Rueda et al (91) | 8.6 |

4.3 Análisis XRF

En el análisis XRF destacó la presencia de oligoelementos con sus correspondientes contenidos expresados en porcentaje. Las muestras utilizadas fueron hojas de neem y cenizas de hojas de neem, en ambas muestras calcio (Ca) fue el que presentó un mayor porcentaje, esto es conveniente ya que puede ser utilizado para incluirse en alimentos como en dulces (56) y bebidas (57) (58). Para el caso de la ceniza representa un alto porcentaje. En segundo lugar, en ambas muestras el potasio (K) estuvo presente, para el caso de la hoja de neem fue aproximadamente la mitad de lo que representaba el calcio, mientras que para las cenizas de neem, la proporción de potasio con respecto al calcio es un 21.4 veces menor. En tercer lugar, destaca la presencia de azufre, el cual es el responsable de la actividad antibacteriana (46) (47) y antifúngica.

Madaki et al (71) reportaron el contenido de Calcio (Ca), Potasio (K) y Fósforo (P), en concentraciones de 170 mg, 235.65 mg y 39.34 mg, respectivamente en el que el Calcio y el Potasio destacan como elementos mayoritarios. En el presente trabajo se identificaron Calcio, Potasio y Fósforo en concentraciones de 62%, 29.76% y 0.54% en peso, respectivamente, teniendo en mayor proporción a los dos primeros, por lo que se confirma la presencia de estos en la hoja de neem. El método utilizado por Madaki et al fue la espectroscopía de absorción atómica (AA) la cual permite determinar la concentración de los minerales presentes, mientras que el método utilizado en este trabajo fue la espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF), el cual arrojó el porcentaje de los elementos presentes en la hoja de neem. Dado que los métodos utilizados son distintos, así como la forma en que se reportan las

concentraciones, no se puede hacer una comparación directa. Sin embargo debido, a los resultados se puede validar la presencia de Calcio, Potasio y Fósforo en las hojas de neem.

En la Tabla 11 se muestran los resultados de XRF aplicado a las hojas de neem en base seca y su ceniza. Los principales compuestos determinados fueron Ca, K, Si y S. Las condiciones del equipo y la preparación de las muestras fueron desarrolladas acorde a las especificaciones del fabricante.

Tabla 11: Resultados XRF de la hoja de neem y su ceniza

| Analito | Hoja de neem (%) | Ceniza de neem (%) |
|---------|------------------|--------------------|
| Ca | 62.00 | 91.86 |
| K | 29.76 | 4.28 |
| S | 5.11 | 0.15 |
| Fe | 1.34 | 0.55 |
| Sr | 0.66 | 1.28 |
| P | 0.54 | 0.13 |
| Zn | 0.23 | 0.07 |
| Cu | 0.22 | - |
| Mn | 0.16 | 0.08 |

La muestra fue llevada a 950 °C por 7 min y a 580 °C por 4 h, en ese proceso de incineración existe una formación de óxidos y otros tipos de compuestos, algunos de estos pudieron haber sufrido un arrastre en la corriente de gases de combustión, probablemente esa sea una de las causas de la variación de concentraciones entre la hoja y la ceniza de neem.

Capítulo 5: Conclusiones

Se realizó la caracterización fisicoquímica de la hoja de neem local. Entre lo más destacable de esta caracterización se encontró que la hoja de neem tiene un contenido de humedad 68.98%, material volátil 75.10%, cenizas 4.34% y carbono fijo 17.55%. Además de esto, a partir del análisis químico se encontró la cantidad de extraíbles en acetona del 10.98%, los extraíbles en agua caliente 31.92%, lignina 23.57%, celulosa 18.45% y hemicelulosa 1.77%. Se puede esperar que por su alto contenido de material volátil y carbono fijo tenga un alto poder calorífico.

Los extraíbles en acetona tienen un efecto antipalúdico ya que evita la propagación de mosquitos como el *Anopheles stephensi* y *Aedes aegypti* y es efectivo contra las cepas resistentes a la cloroquina.

El contenido de polisacáridos, hace que sea candidata para la producción de partículas biopoliméricas que pueden ser utilizadas copolimerizadas con polímeros sintéticos para el suministro controlado de medicamentos para enfermedades crónicas del colon.

Los materiales celulósicos presentes en la hoja de neem pueden ser utilizados para adsorber metales pesados del agua como el Cobalto (Co) y Cromo hexavalente (Cr VI).

La celulosa en la hoja de neem mezclada con nanopartículas de plata presentan características que pueden ser utilizadas como material de cicatrización de heridas.

No se encuentran datos del análisis químico para la hoja de neem (*Azadirachta indica*) por lo que se comparó con dos plantas de la misma familia que el neem,

Melia Azaderach o cinamomo y *Swietenia humillis* o venadillo. Se puede observar que el contenido de lignina en el cinamomo es parecido al reportado en el trabajo presente, el contenido de lignina en el venadillo es diferente al que está reportado en este trabajo.

El contenido de celulosa y hemicelulosa es diferente en el neem y el venadillo, esta gran variación de resultados probablemente se deba a las distintas condiciones climáticas en las que se desarrollaron, la frecuencia de riego, la calidad de la tierra y otras relativas a la genética de la misma planta.

El análisis XRF arrojó la presencia de distintos elementos entre los que se encuentran el Calcio y el Potasio. Se han reportado concentraciones de estos elementos en mg. Dado que los métodos utilizados son distintos, así como la forma en que se reportan las concentraciones, no se puede hacer una comparación directa, sin embargo, debido a los resultados, se puede validar la presencia de Calcio, Potasio y Fósforo en las hojas de neem.

Tanto en el análisis próximo como en el análisis químico no se encontraron datos reportados para comparar con los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, los resultados del análisis próximo y químico en plantas similares a la *Azadirachta indica*, se encuentran dentro de los rangos de los resultados obtenidos de la hoja de neem de esta investigación. Por lo que es posible concluir que los resultados del análisis próximo, químico y XRF son confiables.

La relevancia de este trabajo consiste en una primera evidencia de los resultados del análisis químico, ya que no se encuentran reportados en la literatura pese a que

se tienen diversos artículos y patentes que mencionan sus propiedades y usos, sin reportar datos de dicho análisis.

La importancia de esta caracterización, servirá para futuros análisis de otras partes de la misma planta en los cuales se necesite conocer la cantidad de extractivos, lignina, celulosa, hemicelulosa y holocelulosa.

Recomendaciones

Realizar un análisis para la determinación de metabolitos secundarios en las hoja y tallo de neem, para identificar los compuestos a través de distintos solventes. La importancia de esta caracterización, servirá para futuros análisis de otras partes de la planta como los tallos en los cuales se requiera conocer la cantidad de extractivos, lignina, celulosa, hemicelulosa y holocelulosa.

Referencias

1. Néstor S. Álvarez Cruz, Ana J. Bagué Serrano. *Tecnología farmacéutica* . San Vicente, España : Editorial Club Universitario, 2013.
2. Barquero, Andrea A. *Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro*. Buenos Aires, Argentina. : Química Viva, 2007.
3. A Vickers, C Zollman. *ABC of complementary medicine: herbal medicine*. USA : PubMed, 1999.
4. Kakuko Yasunaka, Fumiko Abe, Ariaki Nagayama, Hikaru Okabe, Lucio Lozada-Pérez, Edith López-Villafranco, Elizabeth Estrada Muñiz, Abigail Aguilar, Ricardo Reyes-Chilpa. *Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes*. Japón-México : Journal of Ethnopharmacology, 2005.
5. Sunday E. Atawodi, Joy C. Atawodi. *Azadirachta indica (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities* . Nigeria : Phytochem Rev, 2009.
6. Conrick, John. *Neem: The Ultimate Herb* . Estados Unidos : Lotus Press , 1994.
7. Romero, Lesbia Gabriela Carrera. *Evaluación del Efecto de las Hojas Secas de Neem (Azadirachta indica) Administradas por Vía Oral en Caprinos Para el Control de Nemátodos Gastrointestinales*. Guatemala : Universidad de San Carlos Guatemala , 2019.
8. A.B. Shori, A.S. Baba. *Antioxidant activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes and hypertension by Azadirachta indica-yogurt* . Kuala Lumpur, Malasya : ELSEVIER , 2011.
9. Sultana Farzana, Supti Prava Saha, Nashid Sultana, Md. Ismail Khan. *Gastroprotective Effect of Azadirachta indica Leaves (Neem) Extract on Aspirin Induced Gastric Ulcer in Rats*. Bangladesh : Delta Medical College Journal, 2019.
10. Kigen, Collins Kiprotich. *In silico prediction of anti-malarial activity and pharmacokinetic properties of herbal derivatives of Ajuga remota and Azadirachta indica*. Kenya, África : Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, 2019.
11. Adebawo, F. G. *Fungal Resistance of Obeche (Triplochiton Scleroxylon K. Schum) Wood Treated With Neem (Azadirachta indica, A. Juss) Seed Oil Extract*. Ibadan, Nigeria : Journal of Research, Wildlife & Environment, 2019.
12. Asma Saeed, Bushra Gohar Shah, Faisal Khan. *Anti-Bacterial Potential of Azadirachta Indica Extract Against Staphylococcus Aureus*. Multán, Pakistán : Pakistán Journal of Medical and Health Sciences, 2019.

13. Amal Kumar Ghimeray, Cheng-Wu Jin, Bimal Kumar Ghimire and Dong Ha Cho. *Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in Azadirachta Indica A. Juss grown in foothills of Nepal* . South Korea : African Journal of Biotechnology, 2009.
14. T.R.J. Jeba Malar, J. Antonyswamy, P. Vijayaraghavan, Young Ock Kim, Abdullah A. Al-Ghamdi, Mohamed S. Elshikh, Ashraf A. Hatamleh, Monerah A. Al-Dosary, Sae Won Na, Hak-Jae Kim. *In-vitro Phytochemical and Pharmacological bio-efficacy studies on Azadirachta indica A. Juss and Melia azedarach Linn for anticancer activity*. India : Saudi Journal of Biological Sciences , 2019.
15. Girish K., Shankara Bhat S. *Neem – A Green Treasure*. India : Electronic Journal of Biology, 2008.
16. Kumar, R.V., Gupta, V.K.,. *Thrust on neem is need today*. New Delhi, India : Employment News , 2002.
17. Venugopalan Santhosh Kumar, and Visweswaran Navaratnam. *Neem (Azadirachta indica): Prehistory to contemporary medicinal uses to humankind*. Malaysia : Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2013 .
18. Ruchi Tiwari, Amit Kumar Verma, Sandip Chakraborty, Kuldeep Dhama and Shoor Vir Singh. *Neem (Azadirachta indica) and its Potential for Safeguarding Health of Animals and Humans: A Review* . India : Journal of Biological Sciences, 2014.
19. Rocío Meneses, Flor Ángela Torres, Elena Stashenko, Raquel E. Ocazonez. *Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla*. Colombia : Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud, 2009.
20. Leos-Martínez J, R. Salazar-Sáenz. *El árbol de neem (A. Indica) en México*. México : s.n., 1992.
21. SAGARPA. *El Árbol de nim. Establecimiento y aprovechamiento en la Huasteca Potosina*. México : Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias., 2004.
22. Jawhar Fakhfakh, Sahar Ben-Youssef, Mu. Naushad, and Noureddine Allouche. *Different Extraction Methods, Physical Properties and Chemical Composition of Date Seed Oil*. Riyadh, Saudi Arabia : Springer Nature Switzerland, 2019.
23. Núñez, Carlos Eduardo. *EXTRACCIONES CON EQUIPO SOXHLET*. Argentina : s.n., 2007 .
24. Burdock, George A. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. New York : CRC Press, 2009.

25. María A. Oliveira Miranda, Dilia Velázquez, Alexis Bermúdez. *La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales*. España : Revista de ciencia y tecnología de América , 2005.
26. Sembrando Vida. Bienestar. [En línea] <https://www.gob.mx/bienestar/sembrandovida/articulos/plantas-medicinales-nuestro-patrimonio>.
27. Sharmilla Ashokhan, Rashidi Othman , Muhamad Hafiz Abd Rahim, Saiful Anuar Karsani and Jamilah Syafawati Yaacob. *Effect of Plant Growth Regulators on Coloured Callus Formation and Accumulation of Azadirachtin, an Essential Biopesticide in Azadirachta indica*. Kuala Lumpur, Malasya : MDPI , 2020.
28. Sushmita Kundu, Ayesha Ashraf and Ahsan Habib. *Synthesis of Bening Silver Nanoparticles to Enhace Antibacterial Activity of Azadirachta indica*. Bangladesh : International Journal of Agriculture, Environment and Bioresearch, 2019.
29. Habiba Maikudi Muhammed, Ibrahim Abubakar Sadiq Gudugi, Amina Rabe Musa, Aisha Hussaini, Zainab Jummai Kassim. *Effects of Gmelina Arborea Bark and Azadirachta indica Leaf Powders on Germination and Seedling Vigour of Corchoruos Olitorious (Jute mallow)*. Nigeria : Journal of Plant Development, 2019.
30. Swadesh Sarkar, Amrita Pal, Anirban Chouni & Santanu Paul. *A novel compound β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside isolated from Azadirachta indica effectively induces apoptosis in leukemic cells by targeting G0/G1 populations*. India : Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2020.
31. Akbar, Shadid. *Handbook of 200 Medicinal Plants. A Comprehensive Review of Their Traditional Medicinall Uses and Scientific Justifications*. Estados Unidos : Springer , 2020 .
32. Medicine, National Library of. PubChem . [En línea] 27 de 10 de 2020. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov..>
33. Kuklinski, Claudia. *Farmacognosia*. Barcelona, España : Omega , 2003.
34. Muhammad Ali, Muhammad S. Abdallah, Rabi M. Kutama and Lurwanu Muazu. *Antityphoid Activity and Phytochemical Screening of Azadirachta Indica Leaf Extracts*. África : Scientific Journal of Research and Reviews, 2020.
35. Gabriela Sepúlveda-Jiménez, Helena Porta- Ducoing y Mario Rocha-Sosa. *La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas*. México : Revista Mexicana de Fitopatología, 2004.
36. Flor Marina Fon Fay Vásquez, Héctor Zumbado Fernández. *Análisis proximal en alimentos. Fundamentos teóricos y técnicas experimentales*. Colombia : Colloquium, 2019.

37. Cento Nacional de Metrología. *Conceptos metroológicos aplicados a la medición de contenido de humedad*. México : CENAM.
38. Eva García Martínez, Isabel Fernández Segovia. *Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación*. España : s.n.
39. Erika Biviana Vásquez Sierra, Jhon Fredy Herrera Builes. *Metodología para la caracterización de combustibles sólidos maderables del área metropolitana del valle de Aburrá "AMVA", Colombia*. Colombia : Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 2006.
40. Shurong Wang, Zhongyang Luo. *Pyrolysis of Biomass*. China : DE GRUYTER, 2017.
41. Saba, Badal C. *Hemicellulose bioconversion*. Estados Unidos : Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology , 2003.
42. Marvin Chávez-Sifontes, Marcelo E. Domine. *Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial*. Chile : Avances en Ciencias e Ingeniería, 2013.
43. Klass, Donald L. *Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemicals* . Estados Unidos : Entech International, Inc., 1998.
44. Marisol Faraldos, Consuelo Goberna. *Técnicas de análisis y caracterización de materiales* . Madrid, España : Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2011.
45. Universidad Rey Juan Carlos . LABTE. *Laboratorio de Técnicas Espectroscópicas* . [En línea] [Citado el: 12 de Abril de 2021.] <http://www.labte.es/> .
46. Baba Brandavanam Narasimha, Kant Chandra Khatiyar, Bhimra Dasalukunte Anantanarayana. *Antibacterial combination comprising neem plant extract*. WO 02/22147 A1 India, 21 de March de 2002. Human necessities.
47. Kim Joon, Dennis Gerard Cvitkovitch. *Composition and methods for reducing caries-causing oral bacteria*. US 2016/0213604 A1 Estados Unidos, 28 de July de 2016. Human necessities.
48. Guerrini, Henry Vincent. *Improvements of a pesticidal/insect repellent comprising synthesis of a new pesticidal insect repellent*. WO 92/19616 Australia, 01 de May de 1992. Chemistry, Metallurgy.
49. Fernando Sánchez Orozco, Rodrigo Alberto Sánchez Hoyos, Anny Daniela Martínez Mira, Juan David López Taborda, Juan Carlos Ramirez Oviedo. *Proceso para la obtención de un extracto de Azadirachta Indica*. WO 2017/203454 A1 Colombia, 30 de Noviembre de 2017. Necesidades humanas.

50. Rajesh Jain, Chand Kour Jindal. *Novel spermicidal and anti-infective contraceptive device*. WO 2007/074478 A1 India , 05 de July de 2007. Human necessities .
51. Moacir Rossi Forim, Maria Fátima das Graças Fernandes Da Silva, Joao Batista Fernandes, Paulo Cesar Vieira. *Process for obtaining biopolymeric nanoparticles containig Azadirachta Indica A.Juss. (nem) oil and extracts, biopolymeric nanoparticles, and powder microparticles*. US 9,668,473 B2 Brazil, 06 de June de 2017 . Human necessities.
52. Udeinya, Iroka J. *Therapeutic compounds derived from the neem tree*. 5,370,873 Estados Unidos , 06 de December de 1994. Human necessities .
53. Srivari Chandrasekhar, Prathama Satyendra Mainkar, Karre Nagaraju, Togapur Pavan Kumar, Kanchanapally Tejaswini, Jerald Mahesh Kumar, Katragadda Suresh Babu, Boggavarapu Subrahmanya Sastry, Debabrata Mukhopadhyay. *Nimbolide analogs as anti-cancer agents and preparation thereof*. US 2019/0211027 A1 India , 11 de July de 2019. Chemistry, Metallurgy.
54. Soman, Girish Sudhakar. *Process for preparation of CO2 extract of Azadirachta Indica and herbal composition thereof for treatment of cancers* . US 2020/0069636 A1 India, 05 de March de 2020 . Human necessities .
55. Misaki Shimizu, Tadashi Sudo, Takeo Nomura. *Hot-water extracts of neem bark*. 4,537,774 Japón, August de 27 de 1985. Human necessities .
56. Numura, Takeo. *Candy containing neem extract* . JPH 0851932 A Japón , 27 de February de 1996. Human necessities .
57. Hirai, Hideto. *Tea bag of neem tea and method for producing the same* . JP 200726766 A Japón, 18 de October de 2007 . Human necessities .
58. Tatsuji Takahashi, Ai Tomimatsu. *Food/drink for antiobese use containing Melia Azadirachta l. extract*. JP 2207091645 A Japón, 12 de April de 2007. Human necessities .
59. A. Sluiter, B. Hames, D. Hyman, C. Payne, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and J. Wolfe. *Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples*. NREL/TP-510-42621. Estados Unidos : National Renewable Energy Laboratory, 2008.
60. ASTM. *Standard Test Method for Volatile Matter in the Analysis of Particulate Wood Fuels*. ASTM E872 – 82 (2006). Estados Unidos : ASTM International , 2006.
61. ASTM. *Standard Test Method for Ash in the Analysis Sample of Refuse-Derived Fuel*. ASTM E830 – 87 . Estados Unidos : ASTM International, 2004.
62. Buchanan, Michael. *Solvent extractives of wood and pulp*. TAPPI T 204 CM-07. Estados Unidos : TAPPI Standars , 2007.

63. Rowell, Roger M. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. Estados Unidos : Taylor & Francis , 2013.
64. B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, A. Sluiter, J. Sluiter, and D. Templeton. Preparation of Samples for Compositional Analysis. *NREL/TP-510-42620*. Estados Unidos : National Renewable Energy Laboratory, 2008.
65. TAPPI. Water solubility of wood and pulp. *TAPPI 2007 cm-99*. Estados Unidos : TAPPI Standars, 1999.
66. ASTM. Standard Test Method for Acid-Insoluble Lignin in Wood. *ASTM D1106-96* . Estados Unidos : ASTM International, 2001.
67. ASTM . Method of Test for Holocellulose in Wood . *ASTM D1104-56*. Estados Unidos : ASTM International , 1978.
68. Rowell, Roger M. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. Boca Raton, Florida : Taylor & Francis Group, 2013.
69. Agbajor, Monday Abel Otache and Godwin Kparobo. *Proximate and Mineral composition of leaves of Azadirachta indica*. Nigeria : International Journal of Current Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences, 2017.
70. V. Kesava Rao, B.N. Kowale, A.K. Verma. *Effect of feeding water washed neem (Azadirachta indica) seed kernel cake on the quality, lipid profile and fatty acid composition of goat meat*. India : Small Ruminant Research, 2002.
71. F. M. Madaki, A. Y. Kabiru, M. T. Bakare-Odunola, S. C. Mailafiya, R. U. Hamzah and Janet Edward. *Phytochemical and Proximate Analyses of Methanol Leaf Extract of Neem Azadirachta indica*. Nigeria : European Journal of Medicinal Plants , 2016.
72. A.E. Onyimonyi, Adeyemi Olabode and G.C. Okeke. *Performance and Economic Characteristics of Broilers Fed Varying Dietary Levels of Neem Leaf Meal (Azadirachta indica)*. Nigeria : International Journal of Poultry Science, 2009.
73. I. J. Atangwho, P. E. Ebong, E. U. Eyong, I. O. Williams, M. U. Eteng and G. E. Egbung. *Comparative chemical composition of leaves of some antidiabetic medicinal plants: Azadirachta indica, Vernonia amygdalina and Gongronema latifolium*. Nigeria : African Journal of Biotechnology , 2009.
74. H.O. Obikaonu., I.C. Okoli., M.N. Opara, V.M.O. Okoro., I.P. Ogbuewu., E.B. Etuk and A.B.I. Udedibie. *Haematological and serum biochemical indices of starter broilers fed leaf meal of neem (Azadirachta indica)* . Nigeria : Journal of Agricultural Technology , 2012.
75. Oscar Herrera-Calderon, Kainat Ejaz, Mahnoor Wajid, Muzzamil Shehzad, Johnny Aldo Tinco-Jayo, Edwin Enciso-Roca, Cesar Franco-Quino, Ricardo Ángel Yuli-Posadas, Victor Chumpitaz-Cerrate. *Azadirachta indica: Antibacterial Activity of*

Neem Against Different Strains of Bacteria and their Active Constituents as Preventive in Various Diseases. Perú : Pharmacognosy Journal, 2019.

76. Baljit Singh, Baldev Singh. *Graft copolymerization of polyvinylpyrrolidone onto Azadirachta indica gum polysaccharide in the presence of crosslinker to develop hydrogels for drug delivery applications.* India : International Journal of Biological Macromolecules, 2020.

77. Cornelius Tsamo, Abba Paltahé, Daniel Fotio, Tore Atangana Vincent, and Wassansa Francois Sales. *One-, Two-, and Three-Parameter Isotherms, Kinetics, and Thermodynamic Evaluation of Co(II) Removal from Aqueous Solution Using Dead Neem Leaves.* África : International Journal of Chemical Engineering, 2019.

78. Amrani, Nassima Tazrouti and Moussa. *Chromium (VI) adsorption onto activated sulfate lignin.* África : Water Practice & Technology , 2009 .

79. Ashywarya Ramakrishnan, R. Gokul and M. Pandimadevi. *Preparation and characterisation of nanofibres from bio cellulose and neem-AgNP bio composites for wound healing .* India : International Journal Biomedical Nanoscience and Nanotechnology, 2020.

80. M. Kishanji, G. Mamatha, K. Obi Reddy, A. Varada Rajulu & K.Madhukar. *In Situ Generation of Silver Nanoparticles in Cellulose Matrix using Azadirachta indica Leaf Extract as a Reducing Agent.* India : International Journal of Polymer Analysis and Characterization.

81. P. Manimaran, P. SenthamaraiKannan, K. Murugananthan, and M. R. Sanjay. *Physicochemical Properties of New Cellulosic Fibers from Azadirachta indica Plant.* India : Journal of Natural Fibers , 2017.

82. Das, V. Vinodhini and Nilanjana. *Mechanism of Cr (VI) Biosorption by Neem Sawdust.* India : American-Eurasian Journal of Scientific Research, 2009 .

83. Eveline S. Costa, Bruno Perlatti, Everton M. da Silva, Andreia P. Matos, Maria Fátima G. F. da Silva, João B. Fernandes, Vânia G. Zuin, Caio M. P. da Silva and Moacir R. Forim. *Use of Lignins from Sugarcane Bagasse for Assembling Microparticles Loaded with Azadirachta indica Extracts for Use as Neem-Based Organic Insecticides.* Brasil : Journal of the Brazilian Chemical Society , 2017.

84. P. Sankar Ganesh, S. Gajalakshmi, S.A. Abbasi. *Vermicomposting of the leaf litter of acacia (Acacia auriculiformis): Possible roles of reactor geometry, polyphenols, and lignin.* India : Bioresource Technology, 2008.

85. Konwer, R. Kataki & D. *Carbonization of Some Traditionally Preferred Indigenous Tree Species of Northeast India.* India : Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy, 2007.

86. Ramadan Nasser, Hamad Al-Meffarrej, Mohamad Abdel-Aal and Said Hegazy. *Chemical and Mechanical Properties of Melia Azedarach Mature Wood as Affected by Primary Treated Sewage-Effluent Irrigation*. India : American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences , 2010.
87. P. Pandiarajan, P.G. Baskaran, M. Kathiresan, and S. Kantha. *Physico Chemical Characterization of Fiber from Melia Azedarach Barks as an Effective Reinforcement in Polymer Matrices*. India : Journal of Natural Fibers , 2020.
88. Nasser, Ramadan A. *Effects of Sewage Effluent Irrigation on the Chemical Components and Mechanical Properties of Melia Azedarach L Wood* . Egipto : Journal of Agricultural and Food Chemistry , 2008.
89. M.P.S. Bakshi, M. Wadhwa. *Tree leaves as complete feed for goat bucks*. India : Small Ruminant Research , 2006.
90. Hipólito Jesús Muñoz-Flores, J. Trinidad Sáenz-Reyes, David Castillo-Quiroz, Francisco Castillo-Reyes y Diana Yemilet Avila-Flores. *Calidad de planta en Tabebuia rosea (Bertol) y Swietenia humilis (Zucc) del vivero de San Lucas en Michoacán*. México : Mitigación del Daño Ambiental Agroalimentario y Forestal de México, 2018.
91. Agustín Rueda-Sánchez, Juan de Dios Benavides-Solorio, J. Trinidad Saenz-Reyez, Hipólito Jesús Muñoz Flores, J. Ángel Prieto-Ruiz, Gabriela Orozco Gutiérrez. *Calidad de planta producida en los viveros forestales de Nayarit*. México : Revista Mexicana de Ciencias Forestales , 2013.
92. Soumyajit Senapati, Anindya Bagchi, Anusree Raha, Prosenjit Mukherjee, Monit Paul and Dr. Abhik Si. *Evaluation of antimicrobial activity of Azadirachta indica bark extract*. West Bengal, India : The Pharma Innovation Journal , 2019.

Dr. Conrado García González



Director de Tesis.

Dr. Marcos Alberto Coronado Ortega.



Co Director de Tesis

Otros productos académicos

- Se cuenta con dos registros de derecho de autor que están próximos a ser entregados.
- Se cuenta con el curso de protección de derechos de autor impartido por la OMPI.
- Se tiene la propuesta de un artículo de revisión (review) listo para ser enviado.
- Participación en el Coloquio Internacional Responsabilidad Social y Gestión Ambiental con la ponencia “Legislación Ambiental” el día 13 de mayo de 2021.

ANEXOS

Anexo 1: Obra a proteger derecho de autor.



Mexicali, Baja California a 06 de enero de 2021.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
PRESENTE. -**

Por este medio hago constar mi participación en la elaboración de la obra intitulada **“Obtención y evaluación de extractos de la hoja de Neem (Azadirachta indica), para aplicaciones antimicrobianas en biodiesel”** en la rama de obra *literaria*; realizada en coautoría con: **Conrado García González, Marcos Alberto Coronado Ortega, José Ramón Ayala Bautista, Jesús Manuel Armenta Gálvez**, misma que fue encomendada por la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y elaborada en los términos del artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor aquí citada:

Artículo 83.- Salvo pacto en contrario, la persona física o moral que comisione la producción de una obra o que la produzca con la colaboración remunerada de otras, gozará de la titularidad de los derechos patrimoniales sobre la misma y le corresponderán las facultades relativas a la divulgación, integridad de la obra y de colección sobre este tipo de creaciones.

La persona que participe en la realización de la obra, en forma remunerada, tendrá el derecho a que se le mencione expresamente su calidad de autor, artista, intérprete o ejecutante sobre la parte o partes en cuya creación haya participado.

Así como lo dispuesto por los artículos 5, 6, 9, 11 y 23 del *Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad Autónoma de Baja California*.

Por lo que reconozco que los derechos patrimoniales, así como los correspondientes a la divulgación, integridad de la obra y de colección les pertenecen a la UABC, en virtud de la remuneración que recibí de ésta para su realización.

Hago constar que el contenido de la obra es original, y que la UABC se libera de cualquier responsabilidad respecto de objeciones o controversias sobre la misma.

Firmo de conformidad la presente para los efectos legales y administrativos necesarios, sin que medie vicio alguno que impida su celebración, plena validez y existencia.

Samuel Lepe de Alba
Instituto de Ingeniería, Campus Mexicali

Universidad Autónoma de Baja California

Anexo 2: Certificado curso de protección de derechos de autor impartido por la OMPI.



Academia de la OMPI

CERTIFICADO

Por el presente se certifica que

Samuel Lepe De Alba

ha completado satisfactoriamente
el curso de enseñanza a distancia titulado

CURSO GENERAL DE PROPIEDAD INTELECTUAL

impartido del 13 de abril al 31 de mayo de 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Saadallah", is written over a light blue circular graphic element.

Sherif Saadallah
Director Ejecutivo
Academia de la OMPI



RHJboH7AVI

Anexo 3: Propuesta de artículo de revisión (review).

Extraction methods and applications of neem (*Azadirachta indica*) in different areas: A review

Samuel Lepe de Alba¹, Conrado García González^{1*}, Macos A. Coronado Ortega¹, José R. Ayala¹.

¹Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería

Abstract: The use of medicinal plants is an ancestral tradition and about 3000 species are used for this purpose. Evidence of this been left in documents older 3500 years. The neem (*Azadirachta Indica*) is a plant native to India, its use and properties have been described in the ancient Sanskrit for 4000 years, they refer to it as the “village pharmacy” due to its many medicinal purposes to prevent and treat various diseases. It is described as anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, laxative, blood purifier, antibacterial, anthelmintic, astringent, emollient antiseptic and wound healer. The leaves are pounded and applied in inflammation. In the case of wounds there are washed with leaves boiled in water or sprinkled with powdered leaves. Dried flowers are used as a tonic after fever. Leaves are used in traditional medicine for diabetes and malaria treatment. Neem represent a feasible and ecological alternative in the control of agricultural pests; use for reforestation, to reduce erosion and restore soil fertility. Various studies shown different application areas of neem such as health, food, agriculture, cattle raising among others. The review highlights a literature on pharmacological, antimicrobiological, food and industrial discussion of neem.

Keywords: Neem, *Azadirachta indica*, extracts.

1. Introduction

The neem is used traditionally in India, its use and properties have been described in the ancient Sanskrit for 4000 years, they refer to it as the “village pharmacy” of “town botica” due to its many medicinal purposes to prevent and treat various diseases (1). Medicinal plants products have a long history of use in India, China and other regions of the world, although scientific research validate their use has not been carried out in all cases (2).

The biological activity of Neem had been known for centuries, to date more than 300 natural products and preparations have been used in traditional Indian medicine since ancient times (3). The essential oil and plant extracts can be an option sustainable, there complex mixtures of secondary metabolites (4), cover a wide spectrum of pharmacological effects showing a diversity of biological properties (5). Essential oils and plants extracts cover a wide spectrum of pharmacological effect showing various properties as anti-inflammatory (6), antioxidant (7) and anticancer (8). Antimicrobial activity has been proven against a wide range of microorganism such as bacteria; *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (9), fungi; *Sclerotium rolfsii*, *Pleurotus ostreatus* (10), viruses; *dengue virus*, *yellow fever virus* (11), protozoa; *Leishmania sp.*, *Trichomonas vaginalis* (12), insects; *Anthrenus verbasci* (13), and plants (5).

*Corresponding author: cnrdgarcia@uabc.edu.mx

Anexo 4. Constancia por participación como ponente en el Coloquio Internacional Responsabilidad Social y Gestión Ambiental.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y NEGOCIOS, GUADALUPE VICTORIA

OTORGAN LA
PRESENTE

CONSTANCIA

Al: Ing. Samuel Lepe de Alba

Por su valiosa participación como ponente con el tema:
“Legislación Ambiental”

Dentro del Coloquio Internacional Responsabilidad Social y Gestión Ambiental

“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”
Mexicali, B.C. a 13 de mayo de 2021



DRA. ANA MARÍA VÁZQUEZ ESPINOZA
DIRECTORA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y NEGOCIOS
GUADALUPE VICTORIA
Folio. 6080