

## Determinación del Azadiractina de los aceites esenciales del árbol de Neem (*Azadirachta Indica*)

Daniel Arias\*, Greta Vázquez, Willmer Acosta, Laura Montañez, Ruth Álvarez, Víctor Pérez

Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Avenida Salvador Allende, Ciudad Universitaria, Bárbula-Carabobo. Tele-Fax 0058 241 8678805

### Resumen.-

El azadiractina es el componente activo en la propiedad repelente de insectos de los aceites esenciales del árbol de neem (*Azadirachta indica*). En el presente trabajo, se realiza la extracción del aceite de las semillas, hojas y corteza del árbol Neem del estado Carabobo, por las técnicas de extracción con solventes, arrastre con vapor y CO<sub>2</sub> Supercrítico; adicionalmente se extrajo aceite vegetal de las semillas por prensado al frío. Se cuantificó el azadiractina presente en los aceites por la técnica de HPLC, empleando el patrón correspondiente. La extracción con solventes fue el método que mostró los mejores rendimientos tanto para el aceite obtenido ( $8,35 \pm 0,01$ ) % en las semillas, como de la cantidad de azadiractina ( $2434,46 \pm 0,01$ ) ppm en las hojas. Para el aceite del prensado al frío se encontraron ( $1127,38 \pm 0,01$ ) mg de azadiractina/Kg de semilla con un ( $38,00 \pm 0,01$  %) en peso de rendimiento, este aceite vegetal presenta propiedades fisicoquímicas que le permiten ser propuesto como una potencial materia prima para la industria de jabón.

**Palabras clave:** Neem, Aceite de Neem, Azadiractina, extracción de aceite, prensado al frío

## Determination of the azadirachtin of the essential oils of Neem tree (*Azadirachta Indica*)

### Abstract.-

The azadirachtin is the active component in the repellent property of insects of the essential oils from the neem tree (*Azadirachta indica*). In this work, extraction of oil from seeds, leaves and bark of the tree neem, is carried out using the haulage methods with vapor, solvents and supercritical carbon dioxide; additionally extraction is done by cold press of seeds. Azadirachtin is characterized by HPLC. The extraction with solvents should the best yields for the obtained oil ( $8,35 \pm 0,01$ ) % in the seeds, as well for the quantity of azadirachtin ( $2434,46 \pm 0,01$ ) ppm in leaves. For the cold pressed oil, ( $1127,38 \pm 0,01$ ) mg de azadirachtin for each Kg. of seeds, with a yield of ( $38,00 \pm 0,01$ ) %, this vegetable oil presents physiochemical properties that allow him to be proposed, as a potential available raw material for the soap industry

**Keywords:** Neem, Neem oils, Azadirachtin, Oil Extraction, cold pressed

### 1. Introducción

La gran cantidad y biodiversidad de flora que existe en Venezuela permitiría un aprovechamiento de éstos a nivel nacional, de tal manera que impulse el desarrollo del país convirtiéndolo en productor de bienes (aceites esenciales), para el consumo interno y exportación. El incremento de los costos de producción y los daños irreversibles que ocasiona al hombre y al medio ambiente el uso de plaguicidas sintéticos, hace importante el desarrollo de campañas ecológicas para promover el uso de productos de origen natural que sea

más ecológicamente amigable [1]. El árbol de neem (*Azadirachta indica* A. Juss), es una especie de gran importancia y potencialidad, que ha despertado la atención del mundo científico por sus múltiples propiedades y usos de sus componentes: semillas, cáscara de la semilla, hojas, corteza y madera. Desde hace varios siglos, las diversas partes del neem o sus aceites, han sido utilizados en medicina para tratar diversos males, desde malestares estomacales y fiebre, hasta enfermedades tales como viruela y malaria; también se le ha empleado como material para construcción, combustible, lubricantes y como repelente de insectos. Por ejemplo el aceite que se extrae de algunas partes del árbol de neem (hojas, semillas, corteza, etc) posee

\*Autor para correspondencia

Correo-e: dariast@uc.edu.ve (Daniel Arias)

como agente activo el azadiractina, el cual se ha comprobado que funciona como insecticida natural que compite ventajosamente con los insecticidas sintéticos, ya que algunos insectos han desarrollado resistencia a estos últimos, y son controlados por derivados del aceite de neem, de esta manera, extractos con alta concentración de azadiractina podrían ser los precursores de una nueva generación de productos insecticidas, fungicidas, acaricidas y protectores de las cosechas sin contaminar el entorno [2–4].

En Venezuela existen más de dos millones de árboles de neem sembrados, lo que demuestra su buena adaptación a nuestros suelos, por lo que establecer los mejores métodos de extracción del aceite de neem y caracterizar la presencia de azadiractina, se plantea como una excelente alternativa, con miras a obtener un producto de gran calidad que a futuro pueda ser industrializado. Es por ello que este trabajo tiene como objetivo principal extraer los aceites esenciales de las hojas, semillas y corteza del árbol de neem y cuantificar el azadiractina presente. Con esta investigación se espera contribuir al conocimiento del árbol de neem y sobre los procesos de extracción de sus aceites y que al mismo tiempo se brinde información sobre la composición química de éstos, a fin de aprovechar al máximo su potencial.

## 2. Metodología

### 2.1. Material vegetal:

La zona de estudio seleccionada fue las inmediaciones del municipio San Diego, estado Carabobo. Se escogieron árboles sanos y de tamaño similar entre ellos, aislados de posibles fuentes de contaminación (vías de circulación, aguas residuales, etc), se realizó la recolección de partes del árbol: hojas verdes y frutos verde-amarillentos tomados directamente del árbol y la corteza de la zona media del tronco. Lo colectado se colocó en bolsas, se etiquetaron y se llevaron al laboratorio donde se lavaron cuidadosamente. Se verificó su estado antes de comenzar a procesarlas. Los frutos se lavaron y despulparon, las semillas se secaron a la sombra por tres días, una vez secas se desconchan antes de ser procesadas

### 2.2. Extracciones:

Se utilizaron las técnicas de extracción con solventes, hidrodestilación y fluidos supercríticos, para extraer los aceites esenciales de las hojas, semillas y corteza. Adicionalmente se realizó la extracción de aceite

vegetal de las semillas por la técnica del prensado al frío. Todos los procesos se efectuaron por triplicado.

### 2.3. Extracción por solventes

Se utilizó el procedimiento descrito por Williams. D., del 2004 [14]. Hojas: se colocaron 100 g en 200 ml de hexano y se agitó por 24 h, se filtra y al filtrado se le separa en un equipo rota evaporador, recuperándose el hexano. La fracción aceitosa se recogió y guardó en refrigeración hasta su caracterización

#### *Semillas y corteza:*

Se trituran 100 g y se mezclaron con metanol por 24 h, se filtró y al filtrado se le separó en un rota evaporador, recuperándose el metanol de la fracción aceitosa. Al aceite se le agregó un pequeña cantidad de agua y se agitó, se le agregó luego diclorometano en una relación de 4:3; se gitó por 45 min. Finalmente se recuperó la fase orgánica y se guardó, lavando nuevamente la fase acuosa con diclorometano en la misma proporción, dos veces más. Los tres lavados se mezclaron, esta mezcla se seca con sulfato de magnesio, se pasó por el rota evaporador recuperando el solvente y un extracto aceitoso que se guardó en refrigeración hasta su caracterización.

### 2.4. Hidrodestilación:

Se colocaron 100 g de material vegetal en un sistema Kettles de 4 l con un refrigerante con trampa tipo Clevenger a la salida. el destilado se conectó en una trampa fría. Al líquido colectado se le realizaron extracciones con diclorometano de manera similar al punto anterior, obteniéndose un aceite que se guardó en refrigeración hasta su caracterización. La extracción por prensado al frío, se realiza a semillas secas y descascaradas en lotes de 100 g aproximadamente, los cuales se colocan de forma continua y separada en una prensa provista de un tornillo sin fin, el cual moviliza, corta y prensa las semillas que se van adicionando, obteniéndose así el aceite, este sale a través de unos pequeños agujeros y se colecta en recipientes de vidrio. A este aceite se le determinaran sus características fisicoquímicas, para ello se emplearán los métodos indicados en las normas COVENIN, para el índice de acidez se utiliza el método de la norma 325:2001, para el índice de saponificación se utiliza la 323:2001, para el índice de peróxido la 508:2001, para el índice de refracción la 702:2001, para la densidad la 703:2001 y para impurezas insolubles la norma 509:2001. Para la determinación de punto de ebullición y viscosidad

se utiliza el procedimiento descrito por Montañez [9]. Para la determinación del porcentaje de rendimiento de aceite obtenido, se divide el peso del aceite crudo entre el peso inicial de material.

### 2.5. Fluidos supercríticos:

El proceso de extracción en condiciones críticas se realizó en una planta de extracción a escala de laboratorio que utiliza dióxido de carbono supercrítico como solvente extractivo, según las condiciones reportadas por Mukhopadhyay [15] usadas para optimizar la extracción del azadiractina de los aceites de neem (presión: 375 bar, temperatura 55 °C, flujo: 3 l/min, tiempo estático: 30 min). Se utilizaron 30 g de material vegetal por extracción y el aceite colectado se guardó en refrigeración hasta su caracterización.

### 3. Prensado en frío:

El procedimiento se realizó a las semillas secas y descascaradas en lotes de 100 g. Las mismas se colocaron en una prensa provista de un tornillo sin fin, el cual moviliza, corta y prensa las semillas que se van adicionando, obteniéndose así un aceite que se colecta y se filtra para eliminar el particulado. El aceite fue pesado y guardado en refrigeración hasta su caracterización.

### 4. Caracterización:

A los aceites esenciales y al aceite vegetal se les determinó el contenido de azadiractina por la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), según lo reportado por Giraldo [16]. El equipo fue facilitado por el Laboratorio Químico del Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Maracay, estado Aragua, este es de marca Dionex modelo 170 uvd, con bomba cuaternaria, con una columna empacada de sílica C<sub>18</sub> y dimensiones de 25 cm de largo, 4,6 mm de diámetro y 5 μm tamaño de poro, con un detector UV-Visible. Para la cuantificación se usó una curva de calibración, preparada a partir de un estándar puro de azadiractina. Al aceite vegetal se le determinaron sus características fisicoquímicas, empleando los métodos indicados en las normas COVENIN, tales como: índice de acidez [17- a], índice de saponificación [17- b], índice de peróxido [17- c], índice de refracción [17- d], densidad [17- e] e impurezas insolubles [17- f]. Para la determinación de punto de ebullición y viscosidad se utilizó el procedimiento descrito por Montañez [18].

## 5. Análisis y discusión de resultados

### 5.1. Rendimientos y concentraciones obtenidas por los métodos de extracción seleccionados

En la Tabla 1, se muestra la media de los rendimientos de aceite esencial obtenidos por las distintas técnicas de extracción empleadas de las diversas partes vegetales evaluadas, así como la concentración de Azadiractina determinada por HPLC.

Tabla 1: Rendimiento obtenido y concentración de Azadiractina determinada por HPLC

Técnica de extracción	Material vegetal evaluado	Rendimiento de aceite esencial (±0,01 %)	Concentración de Azadiractina determinada (±0,01) μg/g de materia vegetal
Solventes	Semilla	8,35	2416,11
	Hoja	2,37	2434,46
	Corteza	2,74	1013,94
Hidrodestilación	Semilla	3,60	152,42
	Hoja	0,68	32,94
	Corteza	0,89	17,39
Fluido supercrítico	Semilla	2,64	5,68
	Hoja	0,64	6,38
	Corteza	0,07	131,98

En los resultados presentados, se observa que por la técnica de extracción por solventes, se logró obtener un mayor rendimiento en aceite esencial que con las otras dos técnicas empleadas. Esto podría explicarse por la afinidad que presentan los solventes con los aceites esenciales, lo que permite un fácil arrastre de estos aceites de las células vegetales que lo contienen. El rendimiento por la técnica de hidrodestilación es relativamente bajo, aunque es mejor que el del CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas. En todos los casos, se observa que para las semillas se logró el mejor rendimiento, esto es debido a que en éstas, se encuentran concentrados la mayor cantidad de aceites que la planta posee.

En cuanto a la concentración de Azadiractina determinada, la técnica de extracción por solventes presenta los mejores resultados. Esto coincide con lo reportado en la bibliografía para las semillas de neem, que se encuentran en un rango de 2333 – 3300 μg/g, las diferencias con nuestros valores experimentales se pueden deber a las condiciones de humedad, precipitaciones y temperaturas que afectan a la planta, así como a la composición del aceite [15, 19, 20]. Cabe destacar, que a pesar de haber encontrado menor

cantidad de aceite en las hojas, con respecto a las semillas, la conetracción de azadiractina resultó en un valor muy similar a lo encontrado con las semillas. Sin embargo, estos valores no se encuentran reportados en la literatura consultada.

### 5.2. Prensado al frío de las semillas

En el proceso de extracción por esta técnica, se logró un rendimiento en aceite vegetal de  $38,00 \pm 0,01$  % en peso. La concentración de azadiractina obtenida para este aceite vegetal extraído, fue de  $1127,28 \pm 0,01 \mu g/g$  de semilla. Al aceite obtenido se le realizó una caracterización fisicoquímica a fin de conocer sus propiedades generales. Los resultados obtenidos de esta caracterización se muestran en las Tablas 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2: Propiedades físicas del aceite prensado al frío

Propiedad	Valor
Densidad 20°C/agua 20°C ( $\pm 0,0001$ )	0,9332
Índice de refracción ( $\pm 0,0001$ )	1,4559
Punto de ebullición ( $\pm 1^\circ C$ )	159 – 161
Viscosidad ( $\pm 0,1 cP$ )	51,3

La densidad del aceite de neem, es menor a la densidad del agua, lo cual es característico en los aceites vegetales, el índice de refracción, el punto de ebullición y la viscosidad coincide con lo reportado en la literatura, según Montañez [9].

Tabla 3: Propiedades químicas del aceite prensado al frío

Propiedad	Valor
Índice de acidez (mg KOH/g muestra)	8.86
Índice de saponificación (mg KOH/g muestra)	169.33
Índice de peróxidos (meq O <sub>2</sub> /Kg muestra)	3.74
Impurezas insolubles (%)	0.69

Dentro de las características químicas, los valores encontrados para el índice de acidez y el de peróxidos son altos, en comparación con lo reportado en la industria alimentaria para aceites vegetales, el cual no debe superar el índice de acidez de 5,00 mg KHO/g de muestra, según Romero [21]. Este aceite debe ser refinado para poder ser comercializado como aceite

vegetal para consumo humano. Con respecto al valor encontrado del índice de saponificación, se puede catalogar como un aceite altamente factible para la industria del jabón. El valor de las impurezas insolubles es bajo  $< 1$  %, estos corresponden a sustancias que no fueron solubles en hexano, y consideramos que son restos de cáscara o semilla que psan en el proceso de prensado, las cuales no fueron eficientemente eliminadas con el filtrado. Se puede considerar que el aceite vegetal obtenido por prensado al frío, presenta buenas propiedades físicas y químicas, que permiten que sea propuesto para su uso en la industria de jabones. Aunque también para el consumo humano, con previos procesos de refinación. En cuanto a su uso en la industria de pesticidas, habría que concentrar la cantidad de azadiractina, eliminando los ácidos grasos presentes y estabilizar el aceite restante para que no se descomponga rápidamente.

## 6. Conclusiones

La técnica de extracción por solvente del aceite esencial presentó los mejores rendimientos. De las partes vegetales estudiadas, la hoja fue la que presentó la mayor concentración de azadiractina con  $2434,6 \pm 0,01 ppm$ , seguido por las semillas con  $38,00 \pm 0,01$  % en peso en aceite vegetal y  $1127,38 \pm 0,01 \mu g$  de azadiractina/g de semilla. Las propiedades fisicoquímicas del aceite vegetal lo perfilan como una potencial materia prima disponible para la industria del jabón.

## 7. Agradecimientos

Los autores quieren agradecer el financiamiento otorgado por el CDCD-UC en el proyecto de inversión menor (PI-M) número CDCH-0700-05. Al Laboratorio Químico del Ministerio de Salud y Desarrollo Social de Maracay, estado Aragua, en la persona del Lic. Juan Uztariz, a los Laboratorios de Cromatografía y Elucidación Espectroscópica y al de Análisis Instrumental del Departamento de Química de la FACYT-UC

## Referencias

- [1] Biswas K., Chattopadhyay I., Banerjee R.K. and Bandyopadhyay U. (2002). «Biological activities and medical properties of neem (*Azadirachta indica*)» *Current Science*, Vol. 82, No. 11, pp. 1336-1346.

- [2] Schmutterer, H. (ed., 1.995). «The Neem Tree *Azadirachta indica* A. Juss. and other meliaceous plants—sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes». Edit. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, pp. 696.
- [3] Sara J. Boeke and Col.(2.004). «Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides» *Journal Of Ethnopharmacology*. Vol. 94, Núm. 1, pp 25–42.
- [4] Bandoni, A. (2.000). «Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica». Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- [5] Williams, David Michael (2.004) United Status Patent Application 20040116719.
- [6] Mamata Mukhopadhyay (2.000). «Extractos naturales usando Dióxido de Carbono en condiciones críticas», CRC editorial.
- [7] Giraldo, F. y col. (2.002).«Determinación de *Azadirachta* por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en semillas de árbol de neem (*A. Indica*) cultivadas en Colombia». *Vitae*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Vol. 9 N° 1, Universidad de Antioquia, Medellín – Colombia. pp. 59–63
- [8] Normas Covenin a) 325:2001; b)323:2001; c) 508:2001; d) 702:2001; e) 703:2001; f) 509:2001.
- [9] Montañez, L. (2.005). «Desarrollo de un Bioinsecticida a partir de la *Azadirachta* presente en el aceite de neem (*Azadirachta Indica*)». Trabajo Especial de Grado, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo, Venezuela
- [10] Romero. C. (2.003). «Evaluación de la extracción de la semilla de neem». Trabajo de Ascenso para optar al título de Profesor Agregado, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo, Venezuela.