

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Elaboración de bebidas a base de hojas de neem (*Azadirachta indica*) y  
evaluación de su potencial hipoglucemiante

Por:

**ALEIDA RAMOS FERNÁNDEZ**

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Saltillo, Coahuila, México.

Abril 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Elaboración de bebidas a base de hojas de neem (*Azadirachta indica*) y evaluación de su potencial hipoglucemiante

Por:

**ALEIDA RAMOS FERNÁNDEZ**

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

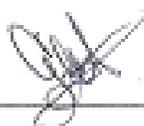
**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Aprobada:



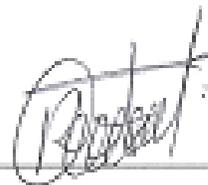
M. C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui

Presidente del Jurado



Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Sinodal



Dr. Armando Robledo Olivo

Sinodal



Dr. José Dueñez Alanís

Coordinador de la División de Ciencia Animal



Saltillo, Coahuila, México.

Abril 2017

Trabaja duro en silencio y deja que tu éxito haga  
todo el ruido.

## DEDICATORIAS

### A DIOS PADRE

Por existir, porque cuando yo te pedí todo para disfrutar la vida, tú me diste vida para disfrutarlo todo, teniendo el privilegio de gozar de la herencia más apreciable de la vida como lo es el estudio, impulsándome día a día a conseguir mis metas con la frente siempre en alto.

### A MIS PADRES

*José Ramos Vargas y Marta Fernández Matías,*

Por darme la vida, en la cual me han apoyado para poder llegar a esta estancia de mis estudios.

A usted papá, porque me ha mostrado que la vida es un reto, un desafío, por estar siempre conmigo, por ser mi guía, mi maestro, mi inspiración, por ser la luz en mis momentos de oscuridad, la esperanza en mis peores momentos, y mi coraje cuando el miedo me supera.

A usted mamá, por ayudarme a buscar la belleza dentro de mí y mantenerme siempre de pie, por asegurarme que podía crecer y alcanzar el éxito en cualquier cosa que me propusiera si creía en mí de la misma manera que usted lo hace, por corregirme cuando fue necesario, porque esos regaños fueron parte de la mujer que ahora soy, gracias por guiar mis pasos.

### A MI HERMANO

*Josué Ramos Fernández*

Aunque en la mayoría de las veces pareciera que estuviéramos en una batalla, hay momentos que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos, ha sido uno de los cimientos para la construcción de mi carrera profesional, sentó en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación en él tengo el espejo en el cual me quiero reflejar pues sus virtudes infinitas y su gran corazón me llevan a admirarlo cada día más.

## A MIS PADRINOS

*Rubén Ramos Vargas y Abel Vargas Ramos*

Por el valioso apoyo moral que he recibido de ustedes durante el transcurso de mi formación profesional, por la confianza y cariño que he recibido durante mi vida, por haberme enseñado que la humildad y sencillez nos hacen más grandes y mejores seres humanos.

*He logrado concluir con éxito un proyecto que en un principio podría parecer tarea  
títánica e interminable.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) por ser la casa de estudios que acogiera mi sueño de formarme profesionalmente como Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos y por todo lo que me ofreció, es y seguirá siendo mi segundo hogar. “*Búitre por Siempre*”

A la M. C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui por brindarme su amistad, tiempo y asesoramiento al realizar este trabajo, así como su conocimiento brindado en mi educación como profesionista.

A los maestros del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos así como de otros departamentos, que me ayudaron a forjarme como profesionista durante mi estancia en esta institución, por transmitirme los conocimientos que ellos poseen.

A mi novio Juvenal Rodríguez Villa, por su apoyo constante y su amor incondicional, ha sido amigo y compañero inseparable, fuente de sabiduría, calma y consejo en todo momento, impulsándome a ser mejor día a día durante toda mi carrera y siendo el pilar principal para la culminación de la misma.

A mis primas Mayra Urdiano Fernández e Imelda Alejandra Fernández, lo mejor que me puede suceder en la vida es encontrar con quien reír, con quien llorar, con quien hablar, y saber que alguien se preocupa por mi felicidad y con ustedes tengo todo eso, gracias por todo su apoyo.

A mi mejor amiga Yesica Yazmin Aceves Tinajero, ha sido siempre mi mano derecha, el tiempo sigue pasando, y ahí está, cerca de mi ofreciéndome lo mejor que tiene; agradezco por su desinteresada ayuda, por su apoyo, por su esfuerzo, por echarme una mano cuando lo necesité, por aportar considerablemente a mi proyecto, agradezco no solo por la ayuda prestada, sino también por los buenos momentos que convivimos, gracias por mantener siempre viva la amistad.

A mis amigos Luis David, Jorge Adith, agradezco por su desinteresada ayuda, por su apoyo, por su esfuerzo, por su amistad y también por los buenos momentos que convivimos, a Fernando, José Luis, Edgar, Yazmin, Érica Cecilia y a todos mis

compañero de la generación CXXII de la carrera de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos, que durante mi estancia en esta gran universidad pude conocer, por los grandes momentos que disfrutamos juntos durante nuestra estancia en la universidad, por su amistad brindada. GRACIAS

## RESUMEN

La diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI y en un reto de salud global. Es una enfermedad crónica de causas múltiples, se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce hasta entre 5 y 10 años. En su etapa inicial no produce síntomas y cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como infarto del corazón, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura. Además de los tratamientos farmacológicos para el control de la Diabetes mellitus, existen también otras alternativas, como lo son las plantas medicinales. En México se ha reportado que 306 especies vegetales son utilizadas para el control y tratamiento de la diabetes las cuales se caracterizan por tener actividad hipoglucemiante. Dentro de las plantas utilizadas tradicionalmente para el control de la diabetes, se encuentra el árbol de neem (*Azadirachta indica*), pertenece a la familia *Meliaceae*, tiene múltiples beneficios medicinales, agroquímicos y económicos debido a varios ingredientes bioactivos presentes en diversas partes del árbol. Cada parte de la cual se está utilizando tradicionalmente en sistemas de medicina para el tratamiento de una de las enfermedades humanas.

El presente trabajo se enfoca en la formulación de tres bebidas a base de hojas secas del árbol de neem (Té, infusión y agua a temperatura ambiente) y cuantificar el efecto hipoglucemiante en cada una para determinar la más adecuada para que funcionen como fitofármacos en el tratamiento de la Diabetes mellitus:

Los extractos acuosos obtenidos a partir de hojas de neem deshidratadas poseen potencial hipoglucemiante al encontrarse compuestos fenólicos y presentar inhibición de la actividad enzimática de alfa amilasa y glucosidasa, por lo que se establece el mecanismo de acción en las tres bebidas evaluadas.

**Palabras claves:** *neem, sustancias hipoglucemiantes, diabetes mellitus, antioxidantes*

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	vi
RESUMEN .....	viii
ÍNDICE GENERAL.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.2. ANTECEDENTES.....	2
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	4
1.4. OBJETIVOS.....	6
1.4.1. Objetivo general .....	6
1.4.2. Objetivos específicos.....	6
1.5. HIPOTESIS.....	6
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. DEABETES MELLITUS .....	7
2.1.1. Principales tipos de diabetes.....	7
2.1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1 .....	7
2.1.1.2. Diabetes mellitus tipo 2.....	8
2.1.1.3. Diabetes Gestacional.....	8
2.1.2. Mortalidad.....	9
2.1.3. Detección .....	10
2.1.4. Prevención .....	10
2.1.4.1. Prevención primaria .....	10
2.1.4.2. Prevención secundaria .....	10
2.1.4.3. Prevención terciaria .....	10
2.1.5. Tratamientos farmacológicos de la Diabetes Mellitus tipo 2.....	11
2.1.6. Tratamientos con plantas medicinales .....	11
2.2. PLANTAS MEDICINALES PARA EL CONTROL DE LA DIABETES .....	11
2.3. GENERALIDADES DE NEEM .....	12

2.3.1.	Origen y distribución.....	12
2.3.2.	Clasificación taxonómica .....	13
2.3.3.	Descripción botánica .....	13
2.3.4.	Propiedades específicas .....	15
2.3.5.	Usos medicinales .....	15
2.3.5.1.	Efecto antioxidante .....	16
2.3.5.2.	Actividad hipoglucémica .....	16
2.4.	ANTIOXIDANTES .....	17
2.4.1.	Fuente de compuestos fenólicos .....	17
2.4.2.	Compuestos fenólicos .....	17
2.4.3.	Flavonoides .....	18
2.5.	SUSTANCIAS HIPOGLUCEMIANTES .....	18
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS .....		19
3.1.	UBICACIÓN .....	19
3.2.	MATERIALES DE LABORATORIO.....	19
3.3.	MANEJO DE CONTROL BIOLÓGICO.....	21
3.3.1.	Obtención de muestras .....	21
3.3.1.1.	Té.....	21
3.3.1.2.	Infusión .....	22
3.3.1.3.	Agua a temperatura ambiente.....	22
3.4.	DETERMINACIÓN BROMATOLÓGICO .....	23
3.4.1.	Determinación de humedad .....	23
3.4.2.	Determinación de cenizas .....	23
3.4.3.	Determinación de carbohidratos totales .....	24
3.4.4.	Determinación de proteína .....	25
3.4.5.	Determinación de grasa .....	26
3.5.	DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES .....	26
3.5.1.	Determinación de fenoles.....	26
3.5.2.	Determinación de flavonoides .....	27
3.6.	DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN DE ENZIMAS.....	28
3.6.1.	Determinación de inhibición de $\alpha$ -amilasa.....	28
3.6.2.	Determinación de inhibición de $\alpha$ -Glucosidasa.....	29

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	29
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	30
4.1. DETERMINACIÓN BROMATOLÓGICA .....	30
4.2. ANÁLISIS DE ANTIOXIDANTES .....	31
4.2.1. Determinación de fenoles totales.....	31
4.2.2. Determinación de flavonoides .....	32
4.3. DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN DE A- AMILASA .....	34
4.3.1. Índice de inhibición de $\alpha$ - Amilasa .....	34
4.2.4. Determinación de inhibición de $\alpha$ - Glucosidasa.....	35
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES .....	37
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA.....	38
7. CAPÍTULO VII: ANEXOS .....	42
7.1. Anexo 1: Análisis estadístico para fenoles totales .....	42
7.2. Anexo 2: Análisis estadístico para flavonoides .....	43
7.3. Anexo 3: Análisis estadístico para inhibición de $\alpha$ - amilasa .....	44
7.4. Anexo 4: Análisis estadístico para inhibición de $\alpha$ - Glucosidasa....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades que el neem ayuda a prevenir o corregir (Conrick, 1994) .	2
Tabla 2. Algunos usos medicinales del neem (Biswas K., 2002). .....	15
Tabla 3. Material de laboratorio utilizado en este trabajo.....	19
Tabla 4. Reactivos de laboratorio utilizado para la realización del presente trabajo .....	20
Tabla 5. Equipos de laboratorio utilizado para la realización del presente trabajo	20
Tabla 6. Caracterización bromatológica a base seca de hoja de neem. ....	30
Tabla 7. Análisis fitoquímico de bebidas de hojas secas de neem. ....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial del neem (INIFAP, 2004) .....	13
Figura 2. Árbol de neem. (INIFAP, 2004).....	14
Figura 3. Hojas de neem, flores de neem (INIFAP, 2004). .....	14
Figura 4. Diagrama de elaboración del té .....	21
Figura 5. Diagrama de elaboración de la infusión .....	22
Figura 6. Diagrama de elaboración del agua a temperatura ambiente. ....	22
Figura 7 Diagrama de la determinación de humedad total de la hoja de neem. ..	23
Figura 8. Diagrama de la determinación de cenizas de hoja de neem.....	24
Figura 9. Diagrama de la determinación de carbohidratos totales de hoja fresca de neem.....	24
Figura 10. Diagrama de la determinación de proteína .....	25
Figura 11. Diagrama de la determinación de grasa por el método Soxhlet.....	26
Figura 12. Diagrama de la determinación de fenoles.....	27
Figura 13. Diagrama de la determinación de flavonoides .....	27
Figura 14. Determinación de la inhibición de $\alpha$ - Amilasa .....	28
Figura 15. Determinación de la Inhibición de $\alpha$ - Glucosidasa. ....	29
Figura 16. Comparativo entre tratamientos de concentración promedio de fenoles totales. ....	31
Figura 17. Comparativo entre tratamientos de concentración promedio de flavonoides.....	32
Figura 18. Comparativo entre tratamientos del índice de inhibición de $\alpha$ -amilasa. ....	34
Figura 19. Comparativo entre tratamientos del índice de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa. ....	35

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido siempre fuente de sustancias farmacológicamente activas y de interés terapéutico, formando parte de la composición de productos para la medicina tradicional y moderna, alimentos y suplementos nutracéuticos. En el 2005 la Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló que más del 80% de la población mundial depende de plantas medicinales para atender problemas de salud en la atención primaria y recomendó mayor investigación en el área, sobre todo en relación al tratamiento de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus.

Es tradicional en los países asiáticos el uso medicinal del neem (*Azadirachta indica*); a su utilidad e importancia, se debe añadir el aspecto económico ya que es un cultivo de fácil manejo agronómico, de rápido crecimiento, fácil de adquirir y de bajo costo, lo cual permite obtener productos naturales de menor precio que los químicos que son aplicados tradicionalmente para combatir enfermedades y plagas que atacan al hombre, animales y vegetales y que por su origen biológico, no ocasiona efectos nocivos al agro ecosistema. (Schmutterer, H. 2008)

Las sustancias hipoglucémicas también llamadas antidiabéticos orales, son sustancias que ayudan a reducir los niveles de azúcar en la sangre, utilizadas para tratar la Diabetes mellitus tipo 2.

La Diabetes mellitus es un conjunto heterogéneo de alteraciones metabólicas caracterizadas por intolerancia a la glucosa e hiperglicemia crónica. Las hojas de neem son prescritas para ayudar a disminuir los niveles de glucosa en la sangre de pacientes diabéticos. El tratamiento oral para diabéticos con extractos de *Allium sativum*, *Azadirachta indica*, *Momordica charantia*, y *Ocimum sanctum*, no solamente disminuye el nivel de glucosa sanguínea sino que también inhibe la formación de peróxidos lipídicos en la sangre y reactiva enzimas antioxidantes en los glóbulos rojos, con restauración de los niveles de glutatión reducido y de metales trazas (González MS, et al. 2010).

## 1.2. ANTECEDENTES

Entre las plantas más importantes con alto contenido de principios activos que se emplean como agentes terapéuticos para la cura efectiva de diferentes enfermedades, se encuentra el árbol neem (*Azadirachta indica*), (González MS, *et al.* 2010). Los antiguos herbarios hindúes descubrieron las propiedades del neem y su uso se encuentra en el antiguo sanscrito desde hace 4000 años. El neem es tradicionalmente empleado para muchos fines medicinales, para curar múltiples enfermedades y dolencias (Tabla 1), (Conrick, 1994).

**Tabla 1.** Enfermedades que el neem ayuda a prevenir o corregir (Conrick, 1994)

---

◦ Artritis	◦ Indigestión	◦ Migrañas
◦ Bronquitis	◦ Inflamaciones	◦ Quemaduras
◦ Cáncer	◦ Infección de garganta	◦ Salpullido
◦ Colesterol	◦ Dolor de cabeza	◦ Úlcera péptica
◦ Conjuntivitis	◦ Problema de riñón	◦ Varicela
◦ Diabetes	◦ Gripe	◦ Resfrío
◦ Fiebre	◦ Trastornos digestivos	◦ Enfermedades de la piel
◦ Gastritis		

---

Tradicionalmente, las hojas y su pasta se utilizan para curar las reacciones alérgicas de la piel y el tratamiento antiviral de la viruela y la varicela. El jugo de las hojas se utiliza como un tónico para aumentar el apetito y para eliminar los gusanos intestinales. También se utiliza para sus actividades hipoglucémicas, hipolipidémicas, hepatoprotectoras e hipotensoras y para controlar la fiebre. En Omán, se utiliza tradicionalmente para el tratamiento de la fiebre y la diabetes. (VK Santhosh, V. Navartnam. 2013).

En un estudio sobre la diabetes inducida en ratas, se evaluaron 30 plantas usadas en medicina en la India, entre las que se incluyó al neem; los resultados obtenidos confirmaron su efecto hipoglucemiante tanto en extracto acuoso como en solvente orgánico. Indujo una disminución significativa de la glucosa en sangre en ayunas, en la prueba de tolerancia de glucosa. La administración oral del extracto acuoso de

Neem a una concentración del 10%. Mostró la capacidad de revertir el proceso diabético. Este hallazgo es valioso tanto en medicina humana como veterinaria, puesto que permitiría el uso terapéutico del neem como agente hipoglucemiante en la Diabetes mellitus, además de su bajo costo. (González MS, et al.2010).

### 1.3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes es un reto de salud global; estimaciones de la OMS indican que en 1995 había en el mundo 30 millones de personas con ésta enfermedad, actualmente se estima que 347 millones de personas viven con diabetes.

La diabetes es una enfermedad crónica de causas múltiples, en su etapa inicial no produce síntomas y cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como infarto del corazón, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura. Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce hasta entre 5 y 10 años.

Durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes en México se ha incrementado y actualmente es la segunda causa de muerte en el país. Del total de la población de adultos en México, 9.17% reportó tener un diagnóstico previo de diabetes por un médico, lo que equivale a 6.4 millones de personas. Por sexo, este porcentaje fue de 8.60% entre los hombres y 9.67% entre las mujeres, lo que equivale a 2.84 millones de hombres y 3.56 millones de mujeres. Por sexo, en el caso de los hombres las entidades con mayor proporción de individuos con diagnóstico de diabetes son el Distrito Federal (12.7%), Estado de México (11.5%), y Veracruz (10.7%), en tanto que para las mujeres, las entidades con mayor proporción de personas con diagnóstico de diabetes son Nuevo León (15.5%), Tamaulipas (12.8%), y Distrito Federal (11.9%) (ENSANUT, 2012).

El desafío para la sociedad y los sistemas de salud es enorme, debido al costo económico y la pérdida de calidad de vida para quienes padecen diabetes y sus familias, así como por los importantes recursos que requieren en el sistema público de salud para su atención. No hay soluciones sencillas para combatir la diabetes, pero mediante intervenciones coordinadas con múltiples componentes pueden lograrse cambios importantes. Todos tienen un papel que desempeñar en la reducción de los efectos de la diabetes en sus diferentes variantes, la ciencia de alimentos y fabricantes de productos alimenticios y los proveedores de medicamentos: todos son partes interesadas. En conjunto pueden hacer una

contribución importante para detener el aumento de la diabetes y mejorar la calidad de vida de las personas que tienen la enfermedad.

Este trabajo pretende ser la base para la elaboración de bebidas (té, infusión y agua de uso) mostrando en cual ocurren mejores resultados y generar una propuesta para la elaboración más factible del producto final, siendo así una opción para las personas interesadas en utilizar medicina alternativa, y así mejorar la calidad de vida de las personas que tienen la enfermedad. Si además le añadimos que no será una presentación convencional y no será como cualquier otro producto ofrecido actualmente, da ese valor extra para sentar las bases de un nuevo producto y posicionarlo en el mercado.

## **1.4. OBJETIVOS**

### **1.4.1. Objetivo general**

Formular tres bebidas a base de hoja seca de neem (*Azadirachta indica*) té, infusión y agua que contenga potencial hipoglucemiante y antioxidantes.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Obtener las tres diferentes formulaciones de bebidas de neem, agua, té e infusión.
- Cuantificar el contenido de sustancias hipoglucemiantes y antioxidantes en cada una de las formulaciones de bebidas.
- Evaluar el efecto hipoglucemiante de las bebidas a base de hoja seca de neem.
- Determinar si las bebidas presentan cambio en las sustancias hipoglucemicas y antioxidantes con la aplicación de temperatura.

## **1.5. HIPOTESIS**

Las bebidas formuladas a base de hoja seca de neem poseen efecto hipoglucemiante.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. DEABETES MELLITUS

El término diabetes mellitus describe un trastorno metabólico de etiología múltiple caracterizada por hiperglucemia crónica con alteraciones de carbohidratos, grasas y proteínas, metabolismo resultante de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina, o ambos. Los efectos de la diabetes mellitus incluyen daño a largo plazo y disfunción en diversos órganos.

La diabetes mellitus puede presentarse con síntomas característicos como sed, poliuria, borrosidad de la visión, y la pérdida de peso. En sus formas más severas, la cetoacidosis o un estado hiperosmolar no cetoide, desarrolla y conduce a estupor, coma y, en ausencia de tratamiento efectivo, muerte (K.G.M.M. Albertl, et al. 1998)

#### 2.1.1. Principales tipos de diabetes

Según el origen de la enfermedad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) agrupa la diabetes mellitus en tres tipos:

##### 2.1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1

Esta forma de Diabetes Mellitus corresponde a la entidad anteriormente denominada insulino dependientes o juvenil, se caracteriza por la ausencia de síntesis de insulina. En la clasificación actual se divide en dos subtítulos: Diabetes mellitus tipo 1A autoinmune y Diabetes mellitus tipo 1B o idiopática (OMS, 2016).

Ignacio Conget (2002) señala que, aunque el pico de nuevos casos se produce entre los 10-12 años, la mitad de los mismos se diagnostican en pacientes mayores de 15 años. Es una enfermedad inmunoinflamatoria crónica en la que existe una destrucción selectiva de las células  $\beta$  del páncreas mediada por linfocitos T activados. En ella, y tras un período preclínico de duración variable, en el que el paciente permanece asintomático, cuando la masa de células productoras de insulina llega a un valor crítico, el paciente presenta la sintomatología clásica generada por la insulinopenia y la hiperglucemia: poliuria, polidipsia, polifagia,

pérdida de peso y una irrefrenable tendencia a la cetosis si no se instaura tratamiento con insulina exógena.

#### **2.1.1.2. Diabetes mellitus tipo 2**

La Diabetes mellitus tipo 2 es la forma más común de diabetes. En este caso, esta forma corresponde a lo que anteriormente se denominaba diabetes mellitus no insulino dependiente o del adulto (por encima de los 40 años) y tiene su origen en la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina, lo que a menudo es consecuencia del exceso de peso o la inactividad física.

El carácter no insulino dependiente de la enfermedad únicamente hacía referencia al tratamiento requerido a lo largo de la historia natural de la enfermedad. En nuestros días sabemos, además, que cada vez son más frecuentes los casos de Diabetes mellitus tipo 2 diagnosticados en jóvenes, adolescentes y niños. La Diabetes mellitus tipo 2 supone el 80-90% de todos los casos de Diabetes mellitus, lo que contribuye un problema sociosanitario y económico de primera magnitud que en los próximos años va a adquirir características epidémicas, sobre todo en los países occidentales (Conget I. 2002).

Existe una serie de premisas que caracterizan la patogenia de la Diabetes mellitus Tipo 2:

- Se encuentra determinada por componentes genéticos y ambientales (dieta occidental, sedentarismo, etcétera).
- Su herencia es claramente poli génica, lo que significa que es necesaria la presencia de varias anomalías genéticas para que aparezca.
- La obesidad, especialmente la de localización abdominal, genera perse resistencia a la insulina y está bajo control genético. Sin embargo, también puede diagnosticarse en sujetos no obesos, específicamente en ancianos.

#### **2.1.1.3. Diabetes Gestacional**

Por diabetes gestacional se entiende toda aquella alteración del metabolismo hidrocarbonado que se diagnostica por vez primera durante el embarazo. Los

criterios para su diagnóstico han variado a lo largo de los últimos años y aún hoy día existen diversas recomendaciones al uso (García G. C. 2008).

En la diabetes mellitus gestacional existe una amplia gama de opiniones en cuanto a su detección y hay discrepancias acerca del tratamiento. Por lo demás, existe evidencia de que incluso hiperglucemias leves son un factor de riesgo para la morbilidad y mortalidad materno-fetal (García G. C. 2008).

En la segunda mitad de la gestación se requiere un estado fisiológico de resistencia a la insulina para dirigir los nutrientes almacenados en la madre hacia la unidad fetoplacentaria y dar un crecimiento adecuado al feto; sin embargo, cuando las mujeres desarrollan diabetes mellitus gestacional, la resistencia a la insulina es más acentuada, lo cual modifica el medio intrauterino y causa crecimiento acelerado del feto, con riesgo elevado de macrosomía. Aunque existen varios factores que se consideran de riesgo para este trastorno los más importantes son: mayor edad en la madre, familiares de primer grado con diabetes y mayor índice de masa corporal pre-gestacional (García G. C. 2008).

### **2.1.2. Mortalidad**

La Diabetes mellitus se sitúa entre la cuarta y octava causa de muerte en los países desarrollados.

La mortalidad de los diabéticos ocurre principalmente por causas distintas de la propia diabetes cuando se asocia a afecciones tan frecuentes como las enfermedades cardíacas, la insuficiencia renal, y, con frecuencia por sus complicaciones; la mortalidad de los adultos con diabetes es más alta que los no diabéticos (Ruiz-Ramos M, et al).

Aunque no todos los estudios identifican los mismos factores de riesgo para la mortalidad, éstos incluyen la edad al comienzo de la diabetes, el sexo y los factores de riesgo cardiovascular como tabaquismo, hipertensión o elevada presión sistólica, hiperlipemia y sedentarismo; pueden también incluirse la obesidad, el uso de la insulina y la falta de control de la glucemia (Ruiz-Ramos M, et al).

### **2.1.3. Detección**

La detección de la prediabetes y de la diabetes mellitus tipo 2 se debe realizar en la población general a partir de los 20 años de edad o al inicio de la pubertad si presenta obesidad y factores de riesgo con periodicidad de cada 3 años, a través del Programa de Acción específico de Diabetes mellitus vigente (NOM-015-SSA2-2010).

Es recomendable que la detección de diabetes, se haga de manera integrada con otros factores de riesgo cardiovascular, como hipertensión arterial, dislipidemias, tabaquismo, sedentarismo y circunferencia abdominal anormal, sobrepeso y obesidad familiares de primer grado con diabetes, así como otras condiciones clínicas asociadas a la resistencia a la insulina (NOM-015-SSA2-2010).

### **2.1.4. Prevención**

La prevención de la diabetes mellitus se realiza en tres niveles: primaria, secundaria y terciaria (NOM-015-SSA2-2010).

#### **2.1.4.1. Prevención primaria**

Tiene como objetivo evitar el inicio de la enfermedad. En la práctica, prevención es toda actividad que tiene lugar antes de las manifestaciones de la enfermedad con el propósito específico de prevenir su aparición.

#### **2.1.4.2. Prevención secundaria**

Estará encaminada a pacientes ya confirmados con diabetes mellitus y cuyos objetivos son evitar la aparición de complicaciones agudas, y evitar o retrasar las complicaciones crónicas.

#### **2.1.4.3. Prevención terciaria**

Estará dirigida a pacientes que presentan complicaciones crónicas y tiene como objetivo evitar la discapacidad por insuficiencia renal, ceguera, pie diabético y evitar la mortalidad temprana por enfermedad cardiovascular.

### **2.1.5. Tratamientos farmacológicos de la Diabetes Mellitus tipo 2**

Es necesario entender los principios fisiopatológicos de la Diabetes Mellitus para la correcta administración de los fármacos disponibles. La diabetes Mellitus tipo 2 como se ha expuesto anteriormente, representa un complejo trastorno metabólico en el que coexiste una disminución de la secreción pancreática de la insulina y una disminución de su acción biológica (insulinorresistencia), en los tejidos muscular, hepático y adiposo. (Bañales, 2013). Cada una de estas alteraciones es un blanco para el tratamiento farmacológico (Trinajstic, 1011).

### **2.1.6. Tratamientos con plantas medicinales**

Además de los tratamientos farmacológicos para el control de la Diabetes mellitus, existen también otras alternativas, como lo son las plantas medicinales. En México la población utiliza más de 306 plantas en el control empírico de la Diabetes mellitus, que se caracterizan por tener actividad hipoglucemiante, algunas de ellas están siendo ampliamente estudiadas (Bailey & Day, 1989).

Entre las especies vegetales conocidas y utilizadas para el control de la diabetes están: *Cecropia obtusifolia*, *Cucurbita ficifolia*, y *Agarista mexicana*, las cuales fueron estudiadas ampliamente e identificados algunos de sus principales metabolitos secundarios que pudieran intervenir en el mecanismo de acción hipoglucemiantes (Andrade & Heinrich, 2005). La naturaleza química de los compuestos hipoglucemiantes que más frecuentemente se ha aislado de plantas antidiabéticas son carbohidratos, alcaloides, glucopéptidos, terpenoides, péptidos, flavonoides, esteroides y compuestos de naturaleza lipídica (Marles & Farnsworth, 1994).

## **2.2. PLANTAS MEDICINALES PARA EL CONTROL DE LA DIABETES**

Desde tiempos remotos, las plantas son usadas para tratar muchos padecimientos, en la India hay cerca de 45 mil especies de plantas y algunos cientos han sido consideradas como poseedoras de propiedades medicinales, mientras que 389 especies vegetales son utilizadas para el control y tratamiento de la diabetes. Las plantas medicinales para tratar las condiciones de hipoglucemia y de hiperglucemia

son de considerable interés para la comunidad etnobotánica, ya que son reconocidas por contener propiedades medicinales valiosas en diferentes partes de la planta (Ajay, 2006).

Se han realizado investigaciones sobre el efecto de diversos compuestos en el control de los niveles de glucosa en la sangre después de la ingestión de los alimentos, tales como los almidones modificados, las antocianinas, los poli fenoles, la fibra dietética. Particularmente algunas plantas utilizadas tradicionalmente para el control de la diabetes, se encuentran: el nopal, el chilacayote y el guarumbo (Garibay y Martínez, 2006).

### **2.3. GENERALIDADES DE NEEM**

#### **2.3.1. Origen y distribución**

El neem (*Azadirachta indica*), pertenece a la familia *Meliaceae*, a la cual también pertenece el “cedro” y la “caoba”, es originario de las zonas áridas de India, Pakistán y África, donde se ha cultivado por miles de años (Orozco-Sánchez, F, 2007). En las áreas rurales de India y África tiene amplio uso medicinal. (Vietmeger 1992, Norten 1999). El término neem proviene del sánscrito *Nimba* y era conocido como *Sarva Roga Nivarini* o curador de todas las enfermedades. Esta planta tiene propiedades insecticidas, controla plagas de campo y almacén; además tiene uso medicinal, forestal y farmacológico (Schmutterer 1995). Debido a estas características muchos países han hecho el esfuerzo por importarla, así en México fue introducido en el año 1989 (INIFAP, 2004).

Así mismo, en los escritos del antiguo Sanscrito se menciona que sus propiedades farmacológicas fueron tan populares, que virtualmente era la botica del pueblo. (Norten 1999).

El neem crece en diferentes condiciones climáticas, actualmente se cultiva en zonas semiáridas con precipitaciones pluviales de 200 a 1200 mm H<sub>2</sub>O y tolera temperaturas de 0 a 49°C. *A. indica* es cultivado en más de 50 países (Figura 1) en Asia, África, el Caribe, Centro y Sur América y se han establecido pequeñas plantaciones en Norteamérica (Brechelt y Fernández, 1995).



Figura 1. Distribución mundial del neem (INIFAP, 2004)

### 2.3.2. Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

Subreino: *Trachaeophyta*

División: *Pterophyta*

Subdivisión: *Angiosperma*

Clase: *Dicotiledonea*

Orden: *Geraniales*

Familia: *Meliaceae*

Subfamilia: *Melioideae*

Género: *Azadirachta*

Especie: *indica*

### 2.3.3. Descripción botánica

El neem es un árbol robusto, siempre verde, de rápido crecimiento, de tronco recto que llega a medir hasta 2.5 metros de circunferencia, corteza moderadamente

gruesa; alcanza una altura de 30 metros y un diámetro de copa de 25 metros (Schmutterer 1995), puede vivir por más de 200 años. (Conrick 2003). Es una planta de hoja perene. Todo el año, las hojas de neem se mezclan, jóvenes y maduras; las hojas maduras son de color verde brillante, mientras que las jóvenes son de color rojizo. Las hojas de neem se compone de pecíolo, lámina, y la base que se adhiere a las hojas del tallo y puede llevar dos hojas pequeñas laterales como estructuras llamadas estípulas ( Norten, 1996 ). El neem es siempre verde, frondoso, con flores y normalmente comienza a fructificar después de 3-5 años, (Figura 2) (Zainab Saif Saleh Al-Hashemi, 2016).



*Figura 2. Árbol de neem. (INIFAP, 2004)*

La hoja es peciolada de forma aserrada y de alrededor de 7 cm de largo, cuando son jóvenes son de color rojo cobrizo pero posteriormente cambian a verde oscuro, se agrupan en foliolos; la caída de hojas del árbol ocurre sólo bajo extrema sequía o después del daño por heladas. La flor es pequeña (4 mm) blanca, crema o amarillenta, bisexual, actinomorfa, que crece en racimos de manera axilar; en plena floración su aroma y néctar facilitan su polinización (Figura 3). (Schmutterer 1995).



*Figura 3. Hojas de neem, flores de neem (INIFAP, 2004).*

### 2.3.4. Propiedades específicas

*Azadirachta indica* o neem (familia *Meliaceae*) es un árbol de la selva tropical valiosa que tiene múltiples beneficios medicinales, agroquímicos y económicos debido a varios ingredientes bioactivos presentes en diversas partes del árbol. (Priyanka Srivastava & Rakhi Chaturvedi, 2011).

El neem es una planta medicinal versátil, casi cada parte de la cual se está utilizando tradicionalmente en sistemas de medicina para el tratamiento de una de las enfermedades humanas. Tradicionalmente, la mayoría de los nepalíes limpian sus dientes con ramas de neem, tomar su jugo como un tónico para aumentar el apetito y usarlo en fiebre o para gusanos intestinales.

### 2.3.5. Usos medicinales

El árbol de neem es una planta increíble que ha sido declarado el "Árbol del siglo 21", de las Naciones Unidas (ONU, 2012).

Los muchos beneficios del árbol de Neem, se han aprovechado durante siglos por la medicina tradicional de la India, el extracto de sus hojas, semillas, frutos y corteza se aprovechan con distintos fines que van desde el tratamiento de problemas respiratorios, hasta úlceras gástricas. Además, el aceite de neem también se puede emplear externamente para tratar picores, ardor, úlceras de la piel, entre otros.

*Tabla 2. Algunos usos medicinales del neem (Biswas K., 2002).*

Parte	Uso medicinal
Corteza	Fiebres palúdicas, inflamaciones e irritaciones cutáneas, curar heridas, hemorroides y encías sangrientas.
Savia	Cura diversas dermatosis, úlceras de lepra.
Goma	Emulgente para el dolor de garganta.
Flor	Usado como vermífugos, para aliviar la tos, dolencias oculares (entre ellas las cataratas).
Fruto	Trata los trastornos urinarios, purifica la sangre.
Aceite	La lepra y los gusanos intestinales.
Hoja	Infecciones cutáneas, tratar la diabetes, aliviar síntomas de viruela y sarampión, úlceras

#### **2.3.5.1. Efecto antioxidante**

Este árbol es conocido por sus propiedades medicinales en humanos (Kausik et al., 2002). El efecto medicinal, se atribuye a sus propiedades antioxidantes, las cuales dependen en gran parte de la presencia de compuestos fenólicos debido a la reactividad del grupo fenol (Kähkönen, M, *et al.* 2001).

Diversos estudios han indicado que los extractos y fracciones purificadas de diferentes partes de la planta del neem poseen compuestos con actividad biológica tales como, 2,6-Bis-(1,1)-dimetiletil-4-metil fenol y ácido gálico, mismos que son los responsables de la actividad antioxidante (Sunday, E. A. y Joy, C. A. 2009).

#### **2.3.5.2. Actividad hipoglucémica**

El extracto acuoso de hojas de neem disminuye significativamente el nivel de azúcar en la sangre y previene la adrenalina así como la hiperglucemia inducida por glucosa (Murty, K. S., *et al.*, 1978). El extracto acuoso de hojas cuando se administra por vía oral, también produce hipoglucemia en ratas normales y disminución de los niveles de glucosa en sangre en la diabetes inducida experimentalmente en ratas (El-Hawary, Z. M. and Kholief, T. S., 1990).

El extracto acuoso de hoja también reduce la hiperglucemia en la diabetes de estreptozotocina y el efecto es posiblemente debido a la presencia de un flavonoide, quercetina (Chakraborty, T. *et al.*, 1989). También se observó un efecto hipoglucémico significativo alimentando de aceite de neem a los conejos de ayuno (Pillai, N. R. *et al.*, 1981). Recientemente se observó efecto hipoglucémico con extracto foliar y Aceite de semilla, en conejos diabéticos tanto normales como inducidos por aloxano (Khosla, P., *et al.*, 2000). También se han discutido los posibles mecanismos subyacentes a la actividad hipoglucémica del extracto acuoso de hoja (Chattopadhyay, R. R., 1996).

## **2.4. ANTIOXIDANTES**

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de la reacción de oxidación. Los antioxidantes pueden clasificarse en naturales o sintéticos, estando estos últimos en desuso debido que se les atribuyen efectos carcinógenos (Wang H, *et al.* 1996).

### **2.4.1. Fuente de compuestos fenólicos**

La mayoría de las plantas, contienen poli fenoles los cuales están presentes en cantidades diferentes según la planta y del grupo de compuesto fenólico, diferenciándose estos contenidos de acuerdo a la parte del vegetal que se trate, bien sea fruto, hojas, o parte leñosa de la planta. En general, las hojas, flores, frutas y otros tejidos contienen glicósidos (Shahidi F, *et al.* 1995).

### **2.4.2. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos constituyen una clase de metabolitos secundarios biosintetizados por el reino vegetal y entonces encontrados en alimentos derivados de fuentes vegetales (Wood, 2001). Los polifenoles comprenden un amplio rango de sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos con por lo menos un grupo hidroxilo. Entre ellos podemos mencionar a los flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas y xantonas, a los ácidos fenólicos y a los fenoles simples, a los ácidos hidroxicinámicos, a los fenilpropenos, a las ligninas, etc. Los mismos actúan generalmente como capturadores y estabilizadores de radicales libres, pudiendo producir quelación de metales aquéllos que poseen en su estructura grupos carboxílicos (Romero, Ana M. *et al.*, 2003).

Los suplementos antioxidantes o los alimentos que contienen antioxidantes pueden ser usados para reducir los daños oxidativos relacionados a la edad y a enfermedades como arteriosclerosis, diabetes, cáncer, cirrosis, etc. (Siddhuraju., 2002). En estos casos es importante el estudio de las propiedades antioxidantes de los fenólicos totales obtenidos de distintas fuentes, antes que la de los compuestos individuales, debido a la posible interacción antagonista o sinergista entre todos los compuestos presentes (Kim, 2003). Entre los compuestos fenólicos con una

reconocida actividad antioxidante destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos (hidroxicinámico, hidroxibenzónico, cafeico, clorogénico), taninos, calconas, cumarinas (Pratt DE, *et al.* 1992).

### **2.4.3. Flavonoides**

Los flavonoides son un tipo de compuestos fenólicos naturales que se distribuyen en las plantas y estos compuestos son agentes potenciales antidiabéticos debido a que ejercen múltiples acciones como hipoglucemiante (acción insulino mimético) y antihiper glucémico (secretagogo de insulina).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Havsteen B, 1983).

## **2.5. SUSTANCIAS HIPOGLUCEMIANTES**

Las sustancias hipoglucemiantes son aquellas capaces de disminuir los índices de glucosa en la sangre.

Existen sustancias hipoglucemiantes de origen farmacológico y origen natural.

Las sustancias que poseen actividad hipoglucémica se encuentran en los alimentos que poseen características en común y que son de alto valor nutricional ya que son bajos en grasa, ricos en fibra y carbohidratos, vitamina C y E.

## CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Bromatología ubicado en el departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos (DCTA) perteneciente a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), sede Saltillo; en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Se trabajó con hojas del árbol de Neem (*Azadirachta indica*) procedentes del estado de Veracruz. Las muestras recogidas se envasan en bolsas de plástico en condiciones de congelación y fueron transportados al laboratorio de Bromatología ubicado en el departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos (DCTA) perteneciente a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), sede Saltillo; en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

### 3.2. MATERIALES DE LABORATORIO

A continuación se enlistan los materiales empleados en los diferentes análisis realizados (Tabla 2), así como los reactivos requeridos para las pruebas (Tabla 3) y el equipo utilizado (Tabla 4).

*Tabla 3. Material de laboratorio utilizado en este trabajo.*

- 
- |                               |                                    |
|-------------------------------|------------------------------------|
| ◦ Tubos de ensaye             | ◦ Celdillas para espectrofotómetro |
| ◦ Gradillas                   | ◦ Probetas                         |
| ◦ Charolas de aluminio        | ◦ Vasos de precipitados            |
| ◦ Crisoles                    | ◦ Soporte para bureta              |
| ◦ Pinzas para crisol          | ◦ Bureta                           |
| ◦ Micro pipeta                | ◦ Micro espátula                   |
| ◦ Pintillas para micro pipeta | ◦ Pizeta                           |
| ◦ Baño de agua                | ◦ Matraz aforado                   |
| ◦ Matraz                      | ◦ Desecador                        |
-

**Tabla 4.** Reactivos de laboratorio utilizado para la realización del presente trabajo

---

◦ Folín	◦ Cloruro de Aluminio (AlCl <sub>3</sub> ) al 10%
◦ Carbonato de Sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) al 7.5%	◦ Hidróxido de Sodio (NaOH) 1M
◦ Nitrito de Sodio (NaNO <sub>2</sub> ) al 0.5%	◦ Fenol sulfúrico
◦ Ácido Gálico	◦ Sacarosa
◦ Almidón 1%	◦ Catequina
◦ Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>2</sub> ) al 2.2%	◦ Ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) al 0.025%
◦ Indicador mixto de proteína	◦ Buffer de Acetatos pH 7
◦ α-Amilasa	◦ α-Glucosidasa
◦ DNS	◦ α-Glucopiranosido
◦ Éter de petróleo	

---

**Tabla 5.** Equipos de laboratorio utilizado para la realización del presente trabajo

---

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Espectrofotómetro	Termo Electron Corporation	Genesys 10 UV
Vortex	Benchmark	BPR
Parrilla	Thermo Scientific	Cimaret
Balanza Analítica	Ohaus	Adventurer
Campana de extracción	Loster	
Digestor	Labconco	
Estufa	Quincy Lab	40 Lab Oven
Mufla		
MicroKjeldhal	Labconco	MCH 1-121-13
Soxhlet	Kimax Kimble	45/50 24/40

---

### 3.3. MANEJO DE CONTROL BIOLÓGICO

Una vez ubicados en el laboratorio, se tomó el total de hojas de neem recolectadas para ser lavadas: se lavaron con agua para eliminar el polvo y cualquier partícula extraña presente en ella, posteriormente se colocaron en papel secante para retirar el exceso de agua; logrando de esta manera la limpieza total.

Se colocaron las hojas en charolas de aluminio las cuales fueron llevadas a la estufa a temperatura de 60°C por 24 horas para deshidratarlas y así hacer los análisis en producto seco. Después del secado las hojas se mantuvieron en bolsas de plástico.

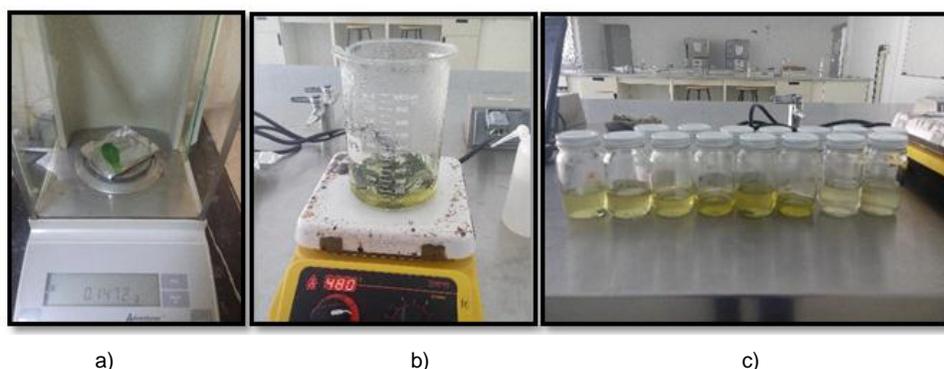
#### 3.3.1. Obtención de muestras

En la realización de las muestras se trabajó con tres tratamientos: Te, infusión y agua de uso con un total de 5 repeticiones de cada tratamiento.

Para la obtención de cada uno de las diferentes muestras se realizó lo siguiente:

##### 3.3.1.1. Té

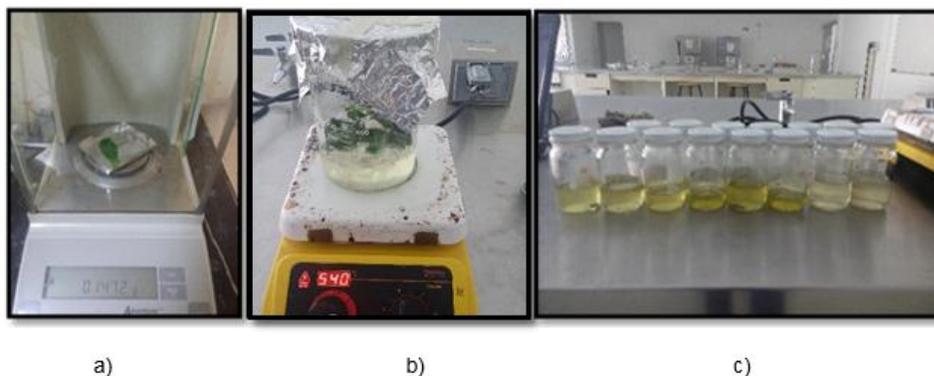
En un vaso de precipitado de 500ml se colocaron 250ml de agua purificada al cual se le agrego 1.5g de muestra seca y se calentó en parrillas de agitación llevando a temperatura de ebullición durante 10 minutos (Figura 4).



**Figura 4.** Diagrama de elaboración del té; a) Pesado de la hoja de neem, b) Calentamiento en parrilla, c) Vertido del té en frascos de vidrio.

### 3.3.1.2. Infusión

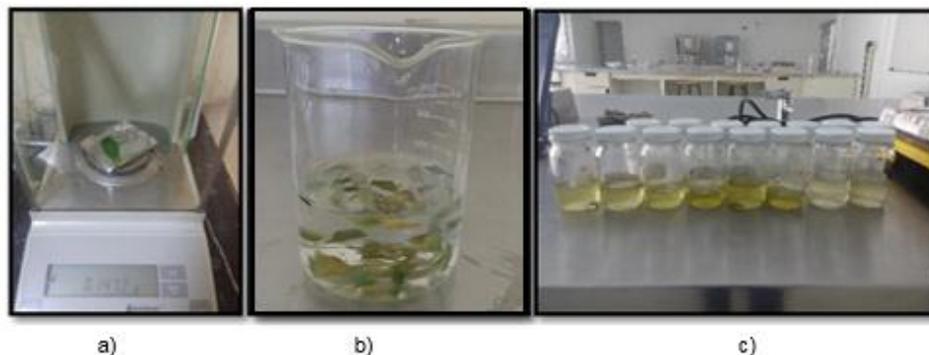
En un vaso de precipitado de 500ml se colocaron 250ml de agua purificada al cual se le agregó 1.5g de muestra seca tapando el recipiente y se calentó en parrillas de agitación llevando a temperatura de ebullición durante 10 minutos con el recipiente tapado (Figura 5).



*Figura 5. Diagrama de elaboración de la infusión; a) Pesado de la hoja de neem b) Calentamiento en parrilla con el recipiente tapado c) Vertido de la infusión en frascos de vidrio.*

### 3.3.1.3. Agua a temperatura ambiente

En un vaso de precipitado de 500 ml se colocaron 250 ml de agua purificada al cual se le agregó 1.5 g de muestra seca y se tuvo en constante agitación durante 15 minutos (Figura 6).



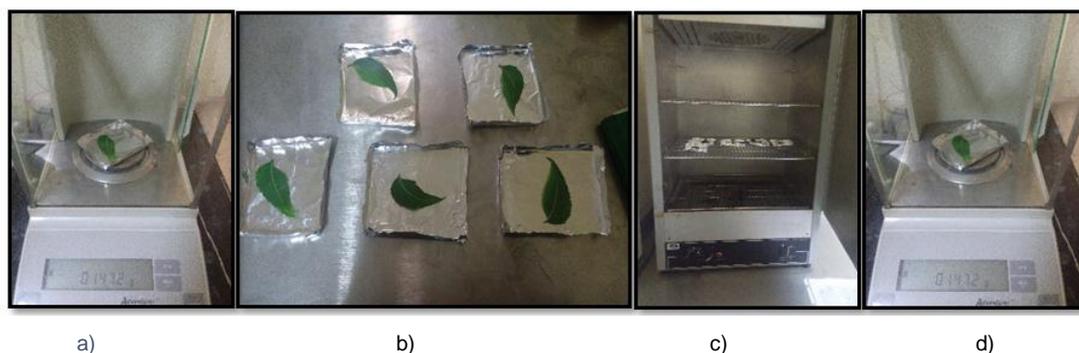
*Figura 6. Diagrama de elaboración del agua a temperatura ambiente; a) Pesado de la hoja de neem b) Agitación de las hojas de neem en agua c) Vertido del agua en frascos de vidrio.*

### 3.4. DETERMINACIÓN BROMATOLÓGICO

#### 3.4.1. Determinación de humedad

Para calcular la humedad de las hojas del árbol de Neem se realizó por método de diferencia de pesos.

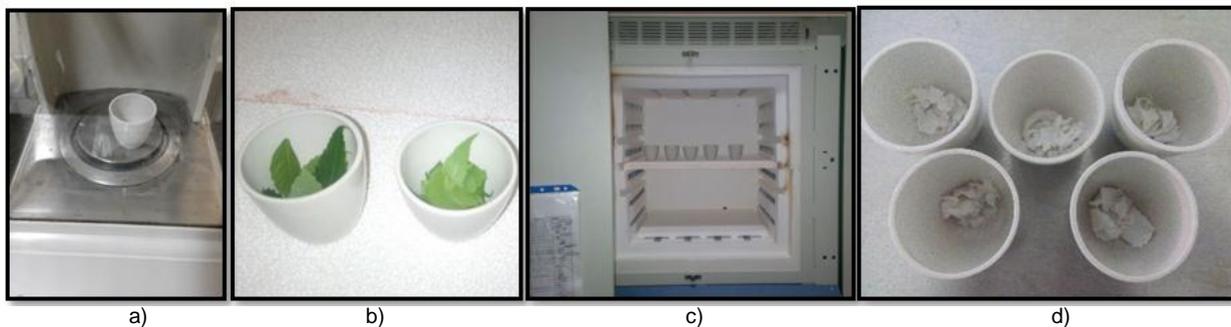
Se colocó una porción de muestra en charolas de aluminio y se colocaron dentro de la estufa de secado a una temperatura de 60°C durante 24 horas, transcurrido el tiempo se sacaron y se colocaron en un desecador hasta tener las muestras a temperatura ambiente se pesaron las charolas con muestra en balanza analítica (Figura 7).



**Figura 7** Diagrama de la determinación de humedad total de la hoja de neem; a) Pesado de la hoja de neem b) Hojas en charolas de aluminio c) Secado en estufa d) Pesado de la hoja seca.

#### 3.4.2. Determinación de cenizas

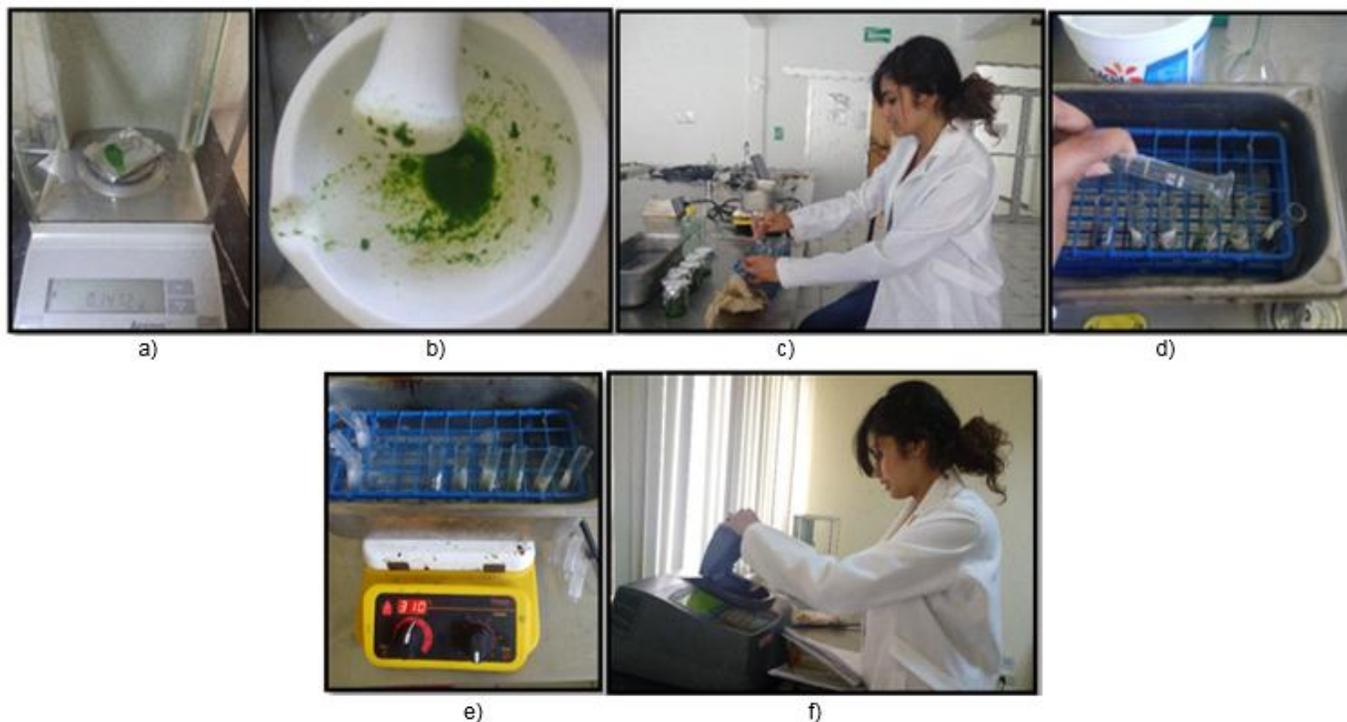
Se colocó 0.5 g de hojas de neem fresca en un crisol de porcelana y se colocaron dentro de la mufla a una temperatura de 500°C durante 2 horas, transcurrido el tiempo se sacaron y se colocaron en un desecador hasta tener las muestras a temperatura ambiente se pesaron los crisoles con muestras en balanza analítica (Figura 8).



**Figura 8.** Diagrama de la determinación de cenizas de hoja de neem; a) Pesado del crisol de porcelana, b) Hojas de neem en los crisoles, c) Secado en mufla, d) Cenizas de las hojas de neem.

### 3.4.3. Determinación de carbohidratos totales

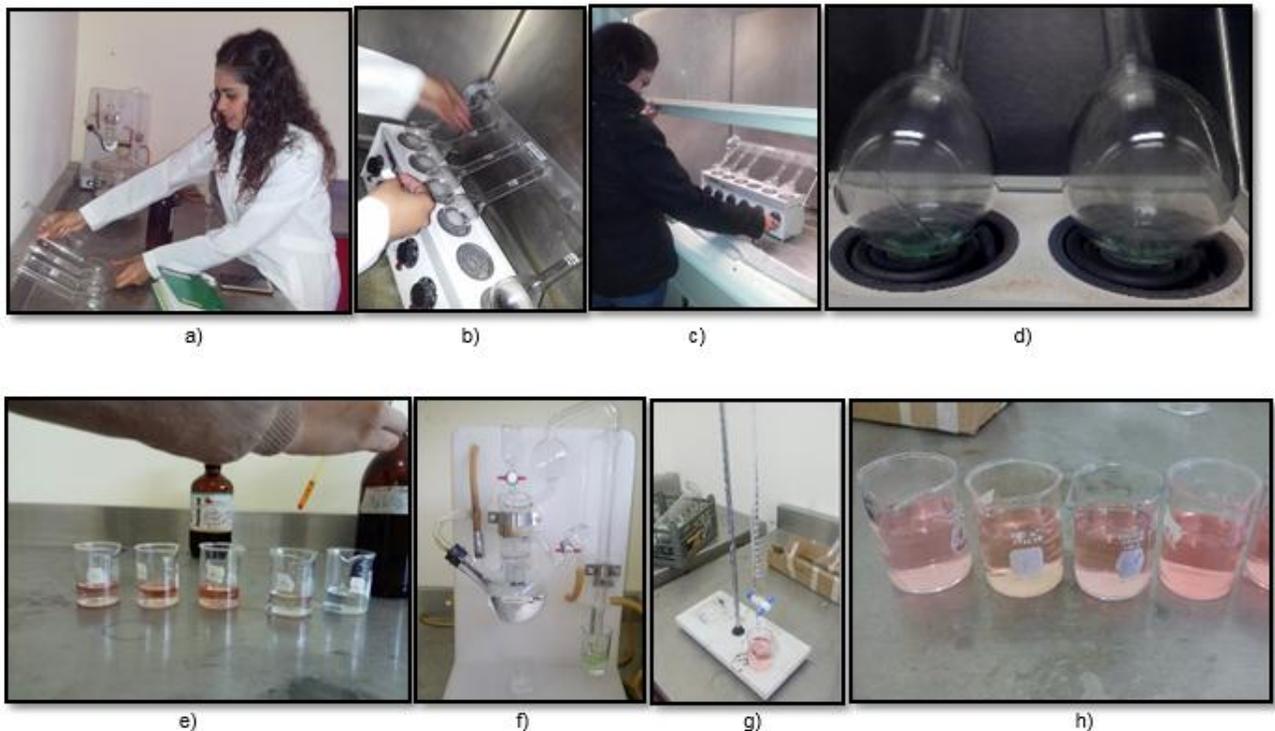
Se pesó 1g de muestra (hoja fresca) se añadió a 10ml de agua destilada y se maceró con ayuda de un mortero de porcelana, se tomó 1ml de macerado y se colocó en un tubo de ensaye, se introdujo el tubo de ensaye con muestra en un baño de agua fría se adicionó 2ml de fenol sulfúrico al 0.1%, se transfirió a un baño de agua en ebullición durante 5 minutos, se retiró del baño de agua y se atemperó después se leyó absorbancia a 480 nm (Figura 9)



**Figura 9.** Diagrama de la determinación de carbohidratos totales de hoja fresca de neem; a) Pesado de la muestra b) hoja macerada, c) Adición de muestra al tubo de ensaye, d) Adición de fenol sulfúrico en baño de agua fría, e) Muestra en baño de agua en ebullición, f) Lectura de absorbancia.

### 3.4.4. Determinación de proteína

Se pesó 0.1g de hojas frescas de neem se realizaron 5 repeticiones. Se colocaron las muestras en un cartucho de celulosa y estos se introdujeron en un matraz Kjeldahl. Dentro del matraz se agregó 4ml de mezcla digestora y se llevaron a la parrilla de calentamiento para digerirlos hasta que se note un cambio de color de tonalidad verdosa. Después se llevaron al micro destilador, se vierte la muestra y 30ml de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 50 %. En el vaso receptor del destilador se colocó 30ml de Ácido Bórico ( $H_3BO_2$ ) al 2.2% y tres gotas de indicador. Cuando se recupera un volumen total de 60ml se vertió el destilado a un matraz Erlenmeyer para ser titulado con Ácido Sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 0.025N, (Figura 10).

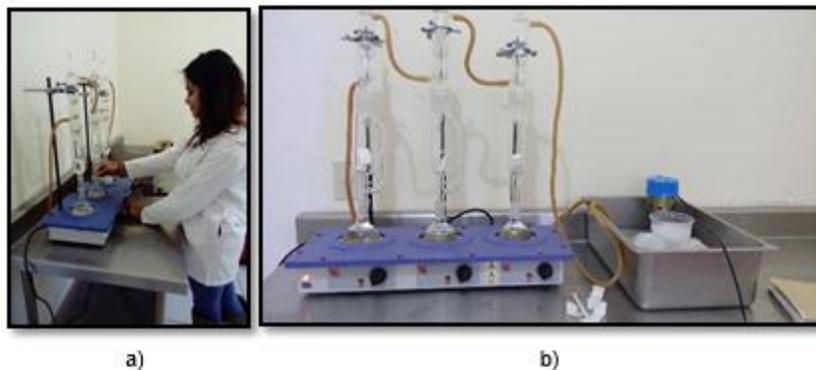


**Figura 10.** Diagrama de la determinación de proteína: a) Colocar cartucho de celulosa con muestra y mezcla digestora al matraz, b) Matraces en parrilla de calentamiento, c) Encendido de parrillas dentro de la campana de extracción, d) Cambio de color de las muestras, e) Adición del indicador mixto de proteínas al  $H_3BO_2$ , f) Destilación de las muestras, g) Titulación de muestras, h) Muestras después de la titulación.

### 3.4.5. Determinación de grasa

Para la determinación de grasa se realizó por el método Soxhlet.

Se tomó 0.1g de muestra previamente secada. Se pesaron los matraces con cuatro perlas de vidrio cada uno. Después se colocó cada muestra en un cartucho de celulosa y se introdujo al tubo sifón, se agregaron 150ml de éter de petróleo para la extracción de grasa y se dejó trabajar durante 6 horas para cada muestra (Figura 11).



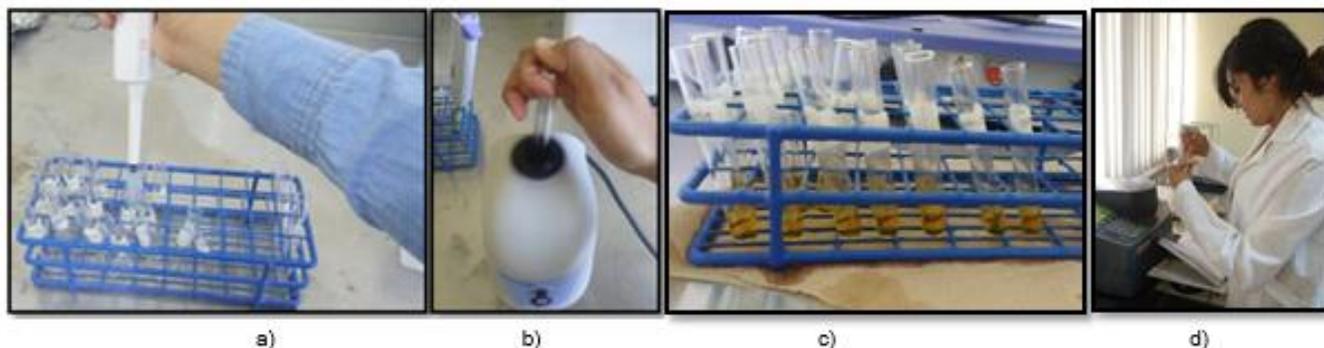
*Figura 11. Diagrama de la determinación de grasa por el método Soxhlet. a) Acomodo de muestras en el equipo Soxhlet, b) Equipo Soxhlet en funcionamiento.*

## 3.5. DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES

### 3.5.1. Determinación de fenoles

Para realizar la determinación de fenoles se trabajó de la siguiente manera:

Se colocó 1ml de muestra en tubos de ensaye se le adicionó 250µl de Folín se homogenizó y se reposo por 5 minutos, se le agregó 1250µl de Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 7.5% se homogenizó en vortex por 30 segundos y se dejó reposar por 30 minutos, transcurrido el tiempo se leyó absorbancia a 760 nm, (Figura 12).

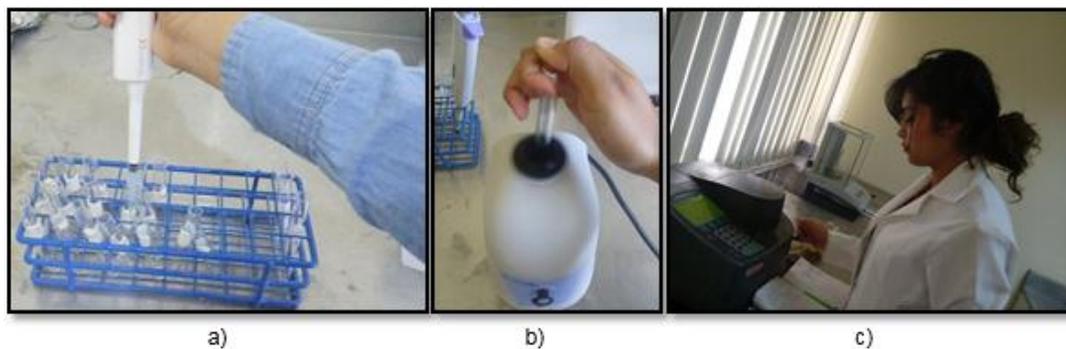


**Figura 12.** Diagrama de la determinación de fenoles; a) Adición de reactivos, b) Homogenización, c) Reposo de muestras d) Lectura de Absorbancia.

### 3.5.2. Determinación de flavonoides

Para realizar la determinación de flavonoides se trabajó de la siguiente manera:

Se colocó 1ml de muestra en tubos de ensaye se le agregó 1250 $\mu$ l de agua destilada y 75 $\mu$ l de Nitrito de Sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) al 0.5% y se dejó reposar durante 5 minutos transcurrido el tiempo se le añadió 150 $\mu$ l Cloruro de Aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) al 10%, y se dejó reposar por 5 minutos al transcurrir el tiempo se le adicionó 500 $\mu$ l de Hidróxido de Sodio ( $\text{NaOH}$ ) 1M y 25 $\mu$ l de agua destilada se homogenizó en vortex para después leer absorbancia a 510nm, (Figura 8).



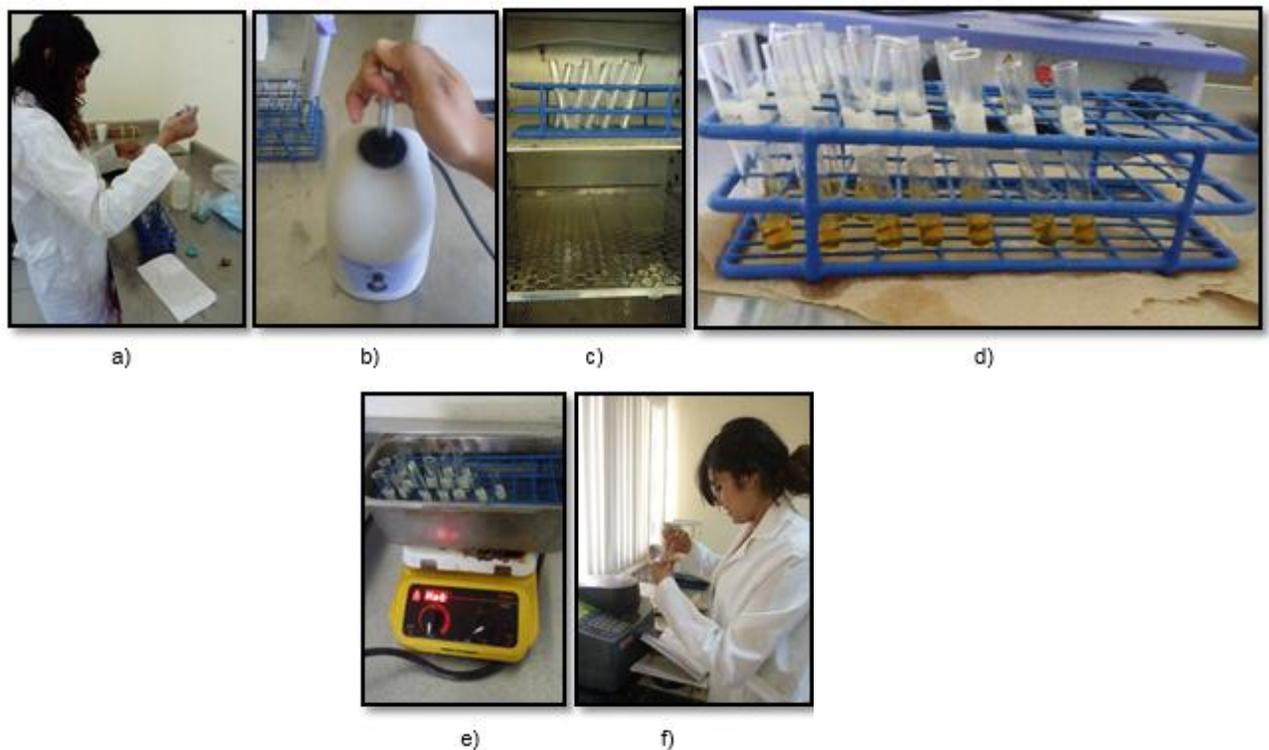
**Figura 13.** Diagrama de la determinación de flavonoides; a) Adición de reactivos, b) Homogenización, c) Lectura de Absorbancia.

### 3.6. DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN DE ENZIMAS

#### 3.6.1. Determinación de inhibición de $\alpha$ -amilasa

En un tubo de ensaye se le agregó 100 $\mu$ l de muestra, 100 $\mu$ l de Buffer de Acetatos de pH 7, 100 $\mu$ l de  $\alpha$ -amilasa pre encubada a 25°C durante 10 minutos y almidón al 10%, se homogenizó en vortex por 30 segundos y posteriormente se llevó a encubar a 25°C durante 30 minutos, después se atemperó a temperatura ambiente.

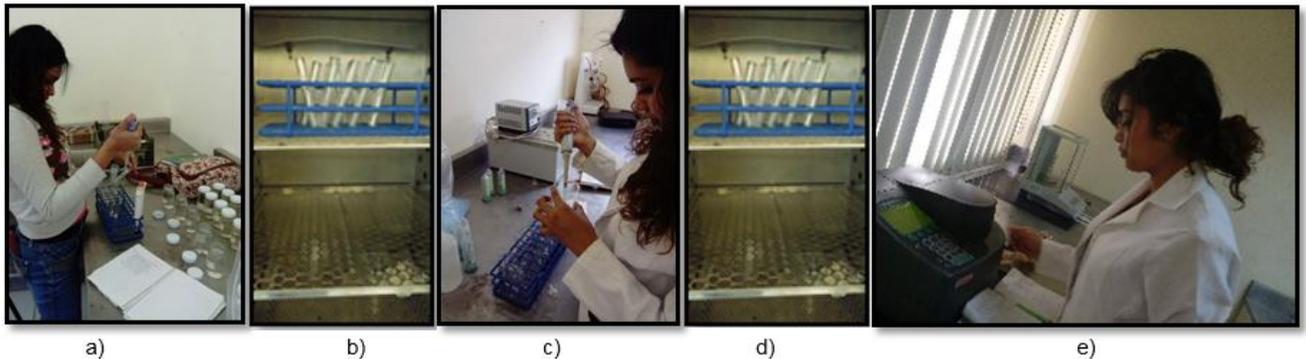
Posteriormente se agregó 1000 $\mu$ l de DNS y se homogenizó en vortex por 30 segundos y se llevó a baño de agua en ebullición durante 5 minutos, se retiró, se atemperó y se leyó absorbancia a 540nm. Se utilizó como blanco la muestra de Buffer de Fosfatos y como control muestra de agua destilada (figura 14).



**Figura 14.** Determinación de la inhibición de  $\alpha$ - Amilasa; a) Adición de muestra y reactivos a tubos de ensaye, b) Homogenización, c) Incubación a 25°C durante 30 minutos, d) Adición de DNS, e) Baño de agua en ebullición durante 5 minutos, f) Lectura de Absorbancia.

### 3.6.2. Determinación de inhibición de $\alpha$ - Glucosidasa

En un tubo de ensaye se le agregó 100 $\mu$ l de muestra, 100 $\mu$ l de Buffer de Acetatos de pH 7, 100 $\mu$ l de  $\alpha$ - Glucosidasa, posteriormente se llevó a encubar a 25°C durante 5 minutos, transcurrido el tiempo se agregó 100 $\mu$ l de  $\alpha$ - D Glucopiranosido y nuevamente se incubo a 25°C durante 10 minutos y finalmente se leyó absorbancia a 405nm. Se utilizó como blanco la muestra de Buffer de Fosfatos y como control muestra de agua destilada (Figura 15).



**Figura 15.** Determinación de la Inhibición de  $\alpha$ - Glucosidasa; a) Adición de muestras y reactivos a tubos de ensaye, b) Incubación a 25°C durante 5 minutos, c) Adición de  $\alpha$ - D Glucopiranosido, d) Incubación a 25°C durante 5 minutos, e) Lectura de Absorbancia.

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los tratamientos realizados para los estudios bioquímicos: Te, infusión y agua de uso se realizaron un total de 5 repeticiones de cada tratamiento y fueron expresados como la media aritmética  $\pm$  desviación estándar. Los datos se compararon por análisis de varianza (ANOVA) con un diseño completamente al azar y una prueba de medias por el método de Tunkey, en variables con distribución normal. Las diferencias estadísticas entre las medias se identificaron con el 95 % de nivel de confianza.

## CAPITULO IV. RESULTADOS

### 4.1. DETERMINACIÓN BROMATOLÓGICA

Las hojas de neem se deshidrataron para realizar una caracterización bromatológica en base seca para la elaboración de bebidas y su análisis antioxidante e hipoglucemiante. En la tabla 6 se muestra los porcentajes obtenidos de humedad, materia seca, cenizas, carbohidratos, proteína y lípidos presentes en la hoja.

*Tabla 6. Caracterización bromatológica a base seca de hoja de neem.*

Caracterización						
	Humedad	Materia seca	Cenizas	Carbohidratos	Proteína	Lípidos
Hoja de neem	73.1522%	26.847%	1.51%	15.9318%	9.0273%	0.3785%

Espinoza A, MM. En 1998 reporta que las hojas de neem contienen 70.53% de humedad, 29.43% de materia seca 18.65% de carbohidratos, 10.95% de Proteína, 0.43% de lípidos. Lo anterior muestra una similitud con lo encontrado en este proyecto (Tabla 6). La presencia de estos compuestos están influenciados por el grado de madurez, el procesamiento y almacenaje, entre otros (Recalde, A., 2007).

Las bebidas de neem (Té, infusión y agua) se utilizaron para realizar diferentes estudios bioquímicos. Los resultados mostraron que los fenoles, los flavonoides, inhibición de  $\alpha$ -amilasa e inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa estaban presentes en todos los tratamientos obtenidos a partir de hojas secas de neem (tabla 7).

*Tabla 7. Análisis fitoquímico de bebidas de hojas secas de neem.*

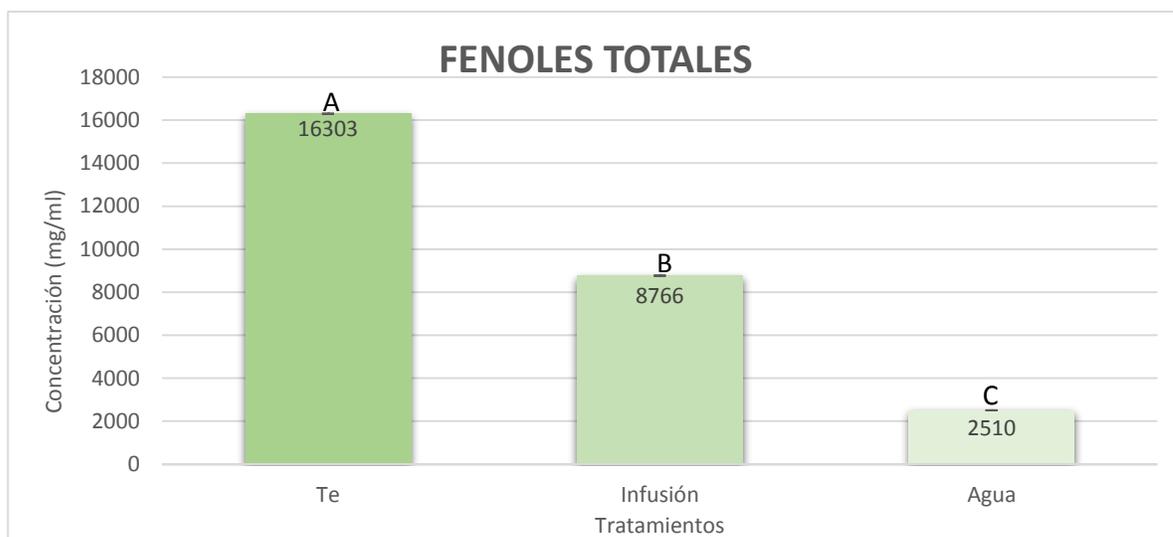
Bebidas a base de neem	Inferencia fitoquímica			
	Fenoles totales	Flavonoides	Inhibición de $\alpha$ -amilasa	Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa
Té	+	+	+	+
Infusión	+	+	+	+
Agua	+	+	+	+

+ Presencia - Ausencia

## 4.2. ANÁLISIS DE ANTIOXIDANTES

### 4.2.1. Determinación de fenoles totales

De acuerdo al análisis de varianza realizado se encontró diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos en la concentración de fenoles totales (figura 16), el efecto de los diferentes tratamientos en relación con la cuantificación de fenoles, fue corroborado con la prueba de Tukey (Anexo 1).



**Figura 16.** Comparativo entre tratamientos de concentración promedio de fenoles totales.

Los datos de la figura 16 muestran la cuantificación de fenoles obtenidos de cada uno de los tratamientos a base de hoja de neem: té, infusión y agua a temperatura ambiente entre los cuales existe diferencia significativa, al someterlos al calor, por lo que la aplicación de calor puede ser un método viable para el contenido fenólico de las bebidas de hoja de neem. La elevada concentración de compuestos fenólicos del té e infusión es mayor con respecto a la concentración de la bebida a base de agua a temperatura ambiente sin aplicación de calor debido a la reducción de agua en los tratamientos.

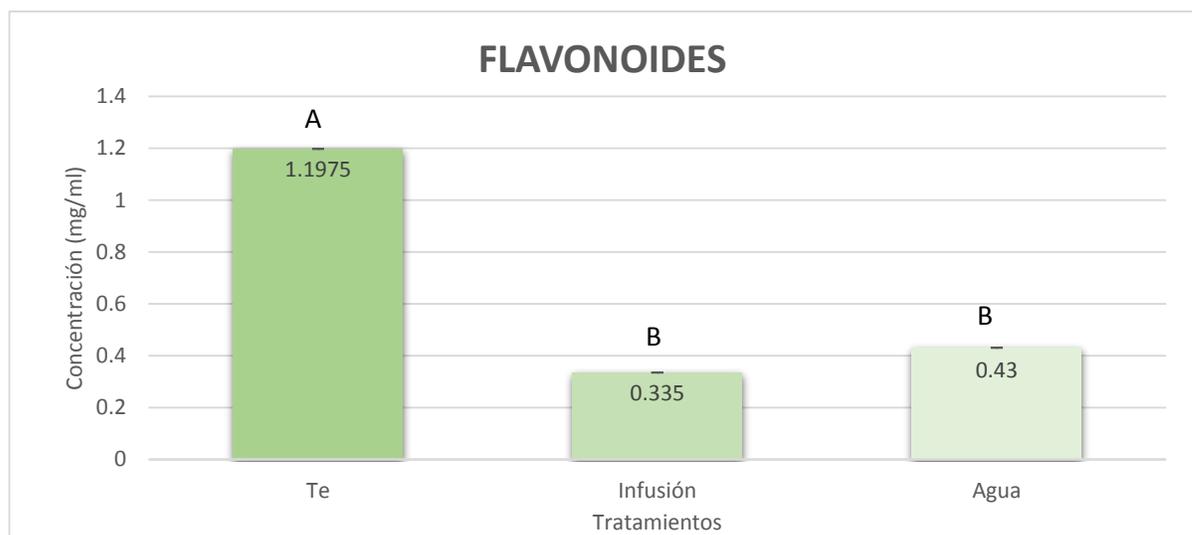
En el 2015 R Al Akeel y colaboradores reportan el contenido fenólico de diferentes extractos de corteza del árbol de neem; en el cual se muestra que el extracto acuoso contiene un 0.762 mg/ml de poli fenol reportado como ácido gálico, el extracto de metanol 2.680 mg/ml, mientras que el extracto de acetona 0.592 mg/ml y el extracto

de etanol contiene 1.462 mg/ml. De los datos anteriores reportados no se acercan al contenido de fenoles de las bebidas evaluadas ya que están por debajo en un 95% del contenido que se reporta en la figura 16.

En el 2016 Z.S. Saleh Al-Hashemi y M.A. Hossain reportaron el contenido de fenoles total entre 420 mg/ml y 3580 mg/ml en extractos brutos de hojas de neem. Lo anterior muestra una similitud con lo encontrado en este proyecto en el tratamiento de agua a temperatura ambiente, a diferencia del contenido en la infusión y té que están por encima de lo que reportan Z.S. Saleh y M.A. Hossain. Sin embargo los niveles de contenido de fenoles totales varían considerablemente entre cultivos de la misma especie. La presencia de estos compuestos están influenciados por el grado de madurez, el procesamiento y almacenaje, entre otros (Recalde, A., 2007).

#### 4.2.2. Determinación de flavonoides

De acuerdo al análisis de varianza para la variable flavonoides se presenta una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos evaluados, es decir entre las bebidas obtenidas; con agua a temperatura ambiente, con agua en ebullición y con agua en infusión. El tratamiento con el contenido más alto de flavonoides se observó en el tratamiento con agua en ebullición (té) con un valor de 1.1975 mg/ml, como se observa en la figura 17.



*Figura 17. Comparativo entre tratamientos de concentración promedio de flavonoides*

La prueba de medias de Tukey muestra que no existe diferencia significativa entre el contenido de flavonoides de los tratamientos de infusión y agua a temperatura ambiente (0.335 mg/ml y 0.43 mg/ml, respectivamente); pero, ambos tratamientos muestran diferencia significativa entre la concentración de flavonoides de la bebida denominada té que presenta un contenido de 1.1 mg/ml (Anexo 2).

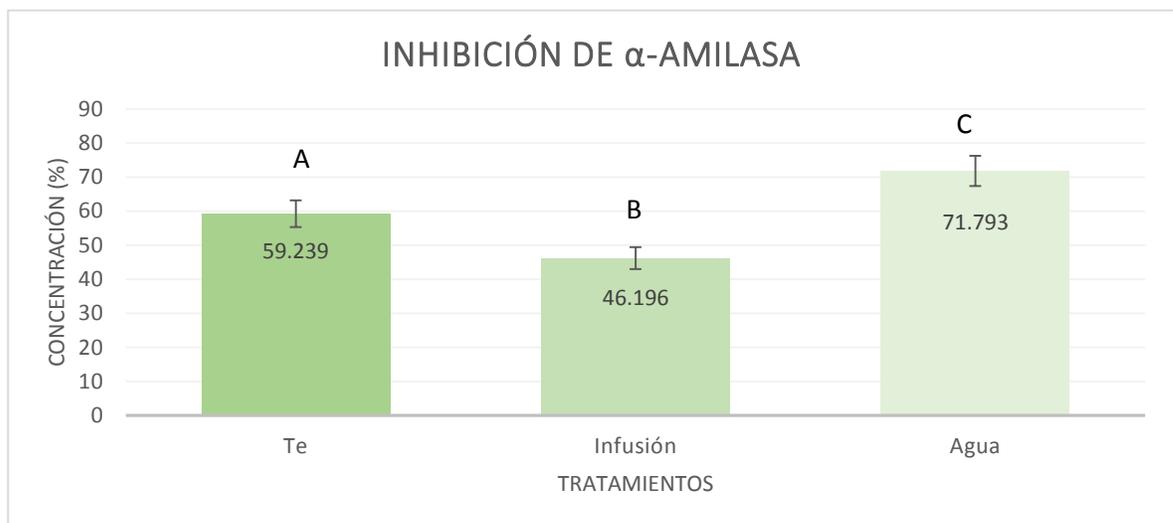
R Al Akeel y colaboradores en el 2015 reportaron el contenido de flavonoides de diferentes extracto de corteza del árbol de neem; encontrándose en el cual muestra que el extracto acuoso contiene un 6.22 mg/ml, el extracto de metanol 1.14 mg/ml, el extracto de acetona 0.92 mg/ml y el extracto de etanol 0.46 mg/ml; del contenido de flavonoides presente en los extractos de etanol reportada por Akeel y colaboradores comparados con los resultados obtenidos en las bebidas denominadas infusión y agua a temperatura ambiente en este proyecto se observa que la concentración de flavonoides es similar. Mientras que el contenido en la bebida denominada té es superior a lo encontrado por ellos en extractos con solventes orgánicos. Los resultados obtenidos fueron comparados de diferentes estructuras del árbol de neem, lo cual determina la diferencia en cuanto a la concentración de flavonoides.

Los fitoquímicos, en especial los compuestos fenólicos (dentro de los cuales se encuentran los flavonoides) están recibiendo creciente atención debido a sus actividades biológicas. Cho y colaboradores en 2003, han reportado que este tipo de compuestos juegan un papel importante en la modulación de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa, por lo tanto, pueden contribuir al manejo de la diabetes tipo 2, en este estudio los compuestos fenólicos constituyen el principal grupo de compuestos que actúan como antioxidantes.

### 4.3. DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN DE $\alpha$ -AMILASA

#### 4.3.1. Índice de inhibición de $\alpha$ - Amilasa

En el análisis de varianza para el índice de inhibición de  $\alpha$ - Amilasa se presenta una diferencia significativa entre los tratamientos evaluados. Todas las bebidas exhibieron capacidad de inhibición de actividad enzimática de la  $\alpha$ - Amilasa, el valor más alto se observó en el tratamiento de agua a temperatura ambiente con un valor de 71.793%, mientras que el tratamiento de agua en infusión mostró la menor actividad con un valor de 46.196%. Esto sugiere, que la bebida de agua a temperatura ambiente puede reducir más de la mitad de la ruptura de los enlaces Glucosídicos  $\alpha$  1,4 de los carbohidratos tales como la maltosa, sacarosa, almidones, por actividad de esta enzima.



**Figura 18.** Comparativo entre tratamientos del índice de inhibición de  $\alpha$ -amilasa.

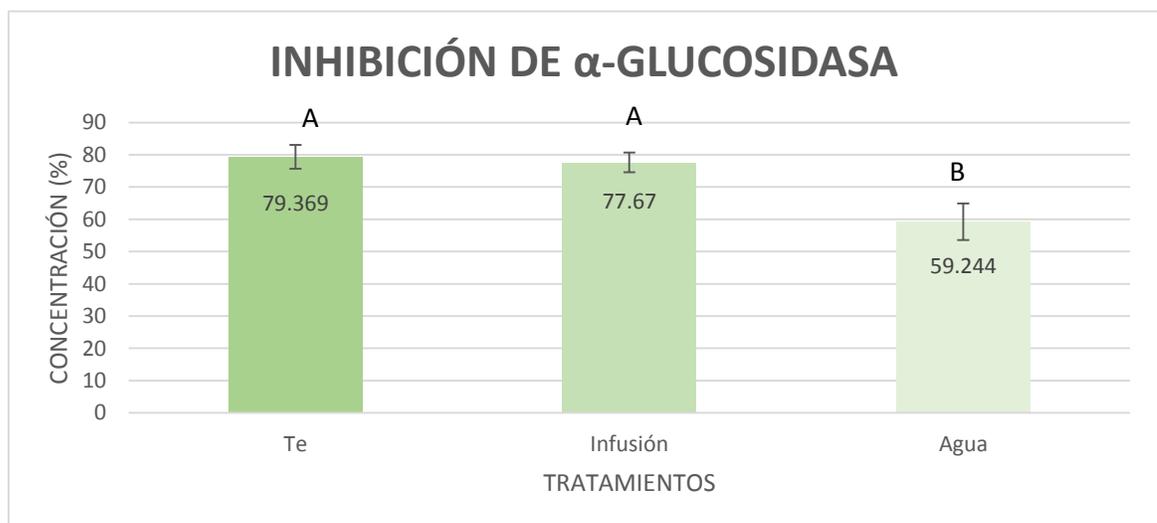
El índice de inhibición de actividad reportado en la figura 18 es mayor en un 6% a lo reportado por DL Mendoza y R Medina en el 2015 en extractos de hoja de yaco (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), en el cual obtienen porcentajes de inhibición mayores al 40 %.

El potencial de inhibición de la actividad enzimática retrasará la degradación de polisacáridos y oligosacáridos, que a su vez causará un decremento de glucosa libre

en sangre (Arrumugan, A. *et al.* 2014). La inhibición de  $\alpha$ -amilasa tiene beneficios sobre la resistencia a la insulina y el control del índice glucémico en las personas diabéticas puesto que reducirá la glucosa libre y la absorción de ésta hacia el torrente sanguíneo (Nizam, M. *et al.* 2014).

#### 4.2.4. Determinación de inhibición de $\alpha$ -Glucosidasa

En el análisis de varianza para el índice de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa se presenta una diferencia significativa entre los tratamientos evaluados. Todos los tratamientos exhibieron capacidad de inhibición de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -glucosidasa el valor más alto se observó en el tratamiento de té con un valor de 79.369%, mientras que el tratamiento de agua a temperatura ambiente mostró la menor actividad con un valor de 59.244%.



**Figura 19.** Comparativo entre tratamientos del índice de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa.

La prueba de medias Tukey muestra que no existe diferencia significativa entre índice de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa de los tratamientos llamados té e infusión (79.369% y 77.67%, respectivamente); sin embargo, dichos tratamientos muestran diferencia significativa con respecto a la actividad inhibitoria presentada por la bebida de agua a temperatura ambiente (59.244%) (Anexo 4).

En 2014 López- Martínez, L y colaboradores, reportaron que los extractos de cebolla morada y amarilla exhibieron actividades inhibitorias de 51% y 34% respectivamente. La actividad de inhibición reportada por López- Martínez, L, y colaboradores. Es inferior a la actividad de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa de las bebidas evaluadas; ya que están por debajo en un 20% de la actividad de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa que se reporta en la figura 19.

Lo anterior establece el modo de acción de las bebidas desarrolladas en este estudio, por lo que pueden clasificarse como alimentos con potencial hipoglucemiante.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se concluye que:

Los extractos acuosos obtenidos a partir de hojas de neem deshidratadas poseen potencial hipoglucemiante al encontrarse compuestos fenólicos en las tres bebidas evaluadas.

El té, la infusión y el agua a temperatura ambiente a base de neem presentan inhibición de la actividad enzimática de alfa amilasa y glucosidasa, por lo que se establece el mecanismo de acción.

Por lo anterior se acepte parcialmente la hipótesis planteada en la presente investigación, dado que las bebidas formuladas a base de hoja seca de neem poseen efecto hipoglucemiante.

## CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

1. Atawodi SE, Atawodi JC. *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. *Phytochem Rev.* 2009(8):601-620.
2. Brechelt, A. y Fernández C. L. (1995). El nim, un árbol para la agricultura y el medio ambiente. Experiencias en la República Dominicana. Fundación Agricultura y Medio Ambiente. Amigo del hogar, San Cristobal, República Dominicana. 133p.
3. Chakraborty, T., Uerotta, L. and Poddar, G., *Phytother. Res.*, 1989, 3, 30–32.
4. Conget I. (2002) Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol*; 55(5):528-535. Disponible en: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org).
5. Cruz, F. M y R. del Ángel S. (2004). El Árbol de Nim, Establecimiento y Aprovechamiento en la Huasteca Potosina INIFAP-CIRNE. Campo experimental Huichihuayán y Campo Experimental Ébano. Folleto Técnico Num. 3. San Luis Potosí. México. 23p.
6. DL Mendoza, R Medina (2015). Inhibición in vitro de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl). *Avances en Química*, 10(1), 33-40.
7. El-Hawary, Z. M. and Kholief, T. S., *Arch. Pharmacol. Res.*, 1990, 13, 108–112.
8. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). (2012). Diabetes Mellitus: la urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para la prevención y control. Disponible en [<http://ensanut.insp.mx>].
9. García G. C. (2008). Diabetes mellitus gestacional. *Medicina Interna de México* Volumen 24, Núm. 2.
10. González MS, Márquez AA, Meléndez CE y López-Ortega AA. (2010). Efecto del extracto de hojas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) en la Diabetes Mellitus inducida por Estreptozotocina en ratones. Vol 15 N° 2 pp 64-71.
11. Havsteen B: Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 1983, 32:1141-1148.

12. HO Vongtau, J. Abbah, BA Chindo, O. Mosugu, AO Salawu, HO Kwanashie, KS Gamaniel. (2005). Efectos inhibitorios centrales del extracto de metanol de neorautanenia mitis Raíz en ratas y Ratones. *J. Pharm. Biol.*, 43, pp. 113-120.
13. Informe Mundial Sobre la diabetes. 2016. Organización Mundial de la Salud.
14. K.G.M.M. Albertl, et al. (1998). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications
15. Kähkönen, M., Anu, I. C. y Marina, H. (2001). Berry fenolics and their Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4076 – 4082.
16. Kaushik N (2002) Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of Azadirachta indica seeds by HPLC and GLC. *Anal. Bioanal. Chem.* 374:1199-204.
17. Khosla, P., Bhanwra, S., Singh, J., Seth, S. and Srivastava, R. K., *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 2000, 44, 69–74.
18. Kim, D.; Jeung, S y Lee, Ch. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* (81) 321-326.
19. López-Martínez, L. et al. (2014). Actividad antioxidante e inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa de tres variedades de cebolla (*Allium cepa* L.) Antioxidant and inhibitory activity against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase from three varieties of onion (*Allium cepa* L.). *Revista Electrónica Nova Scientia*, N° 12 Vol. 6 (2), 2014. ISSN 2007 - 0705. pp: 234 – 247
20. Mauricio Hernández-Ávila, et all. Diabetes mellitus en México, 2013, El estado de la epidemia, vol. 55, núm. 2, pp. S129-S136 Instituto Nacional de Salud Pública Cuernavaca, México.
21. Murty, K. S., Rao, D. N., Rao, D. K. and Murty, L. B. G., *Indian J. Pharmacol.*, 1978, 10, 247–250.
22. Norma Oficial Mexicana. NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención y control de la diabetes. Segunda sección. Secretaria de Salud.
23. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2016, Temas de Salud: Diabetes. [Consultado 2017 Febrero], Disponible en: [http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/es/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/).

24. Organización Panamericana de la Salud. Situación de la Salud de las Américas, Indicadores Básicos 2011. [Consultado 2017 Enero]. Disponible en: [http://ais.paho.org/chi/brochures/2011/BI\\_2011\\_ESP.pdf](http://ais.paho.org/chi/brochures/2011/BI_2011_ESP.pdf).
25. Orozco-Sánchez, F.; Rodríguez-Monroy, M. (2016) Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 6, núm. 3, pp. 251-258.
26. Pillai, N. R. and Santhakumari, G., *Indian J. Med. Res.*, 1981, 74, 931–933.
27. Pratt DE. Natural antioxidant from plant material. In: Huang. M.T., Ho, C.T and Li, C.Y. eds, *ACS Symposium Series 507. Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants and cancer prevention*. American Chemical Society, Washington, DC. 1992. 54-68.
28. Raid Al Akeel *et al.* (2015). Analysis of anti-bacterial and antioxidative activity of *Azadirachta indica* bark using various solvents extracts.
29. Recalde, A. (2007). Tipo de fermentaciones, en el contenido de poli fenoles totales, alcaloides y ácidos volátiles en dos genotipos de cacao. Tesis de doctorado. Universidad Central del Ecuador.
30. Romero, Ana M. et al. (2003). Propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos de soja fermentada. Facultad de Agroindustrias - UNNE. Páginas 1-2.
31. Ruiz-Ramos M et al. (2006). La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades, *Gac Sanit*; 20(Supl 1):15-24.
32. Schmutterer, H. (2008). The tree and its characteristics. The Neem tree *Zadirachta indica* A. Juss and other meliaceous plants. En: *Neem: a treatise*. Chapt: Geographical distribution, ethnobotany and indigenous uses of Neem. Singh KK, Phogat S, Tomar A, Dhillon RS, editores. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd, New Delhi, India. p 21-41.
33. Shahidi F y Naczk M. *Food phenolics. Sources. Chemistry, Effects, Application*. Tecnnomic, Publishing CO., INC eds. Lancaster, Pennsylvania, USA, 1995.

34. Siddhuraju, P.; Mohan, P y Becker, K. (2002). Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L): a preliminary assesment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chemistry* (79) 61-67.
35. Sunday, E. A. y Joy, C. A. 2009. *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. *Phytochem Rev.* 8: 601–620.
36. VK Santhosh, V. Navartnam. (2013). Neem prehistoria hasta medicinal contemporánea utiliza para la humanidad, Pac asiática. *J. Trop. Biomed.*, 3 (7), pp. 505-519.
37. Whag H, Cao G y Prior RL. Total Antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 701-705.
38. Wood, J.; Senthilmohan, S. y Peskin, A. (2001). Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry* (77) 155-161.
39. Z.S. Saleh Al-Hashemi, M.A. Hossain. (2016). Biological activities of different neem leaf crude extracts used locally in Ayurvedic medicine *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering* 18, 128 e 13.
40. Zainab Saif Saleh Al-Hashemi, Mohammad Amzad Hossain. (2016). Biological activities of different neem leaf crude extracts used locally in Ayurvedic medicine, *Volumen 18, Número 2, páginas 128-131.*

## 7. CAPÍTULO VII: ANEXOS

### 7.1. Anexo 1: Análisis estadístico para fenoles totales

#### ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Muestral	2	381.589	190.794	917.89	0.000
Error	9	1.871	0.208		
Total	11	383.459			

S = 0.4559    R-Sq = 99.51%    R-Sq(adj) = 99.40%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI Lower	CI Upper
Agua	4	2.510	0.215	(*-)	
Infusion	4	8.766	0.203		(*)
Te	4	16.303	0.732		(-*)

-----+-----+-----+-----+-----  
 4.0            8.0            12.0            16.0

Pooled StDev = 0.456

#### Prueba de tukey

Grouping Information Using Tukey Method

Muestral	N	Mean	Grouping
Te	4	16.303	A
Infusion	4	8.766	B
Agua	4	2.510	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
 All Pairwise Comparisons among Levels of Muestral

Individual confidence level = 97.91%

Muestral = Agua subtracted from:

Muestral	Lower	Center	Upper	CI Lower	CI Upper
Infusion	5.355	6.256	7.156	(*-)	
Te	12.893	13.793	14.693		(-*)

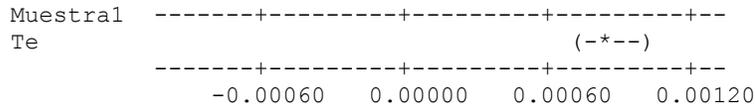
-----+-----+-----+-----+-----  
 -6.0            0.0            6.0            12.0

Muestral = Infusion subtracted from:

Muestral	Lower	Center	Upper	CI Lower	CI Upper
Te	6.637	7.537	8.438	(-*)	

-----+-----+-----+-----+-----  
 -6.0            0.0            6.0            12.0



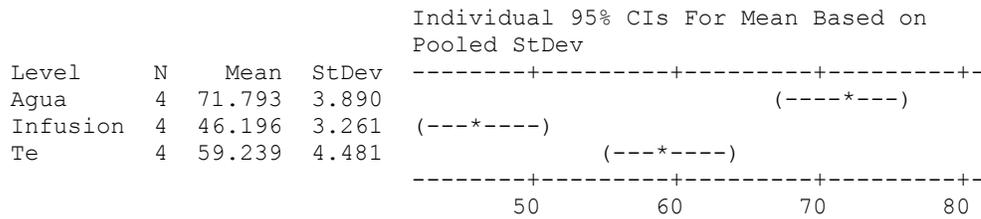


### 7.3. Anexo 3: Análisis estadístico para inhibición de $\alpha$ -amilasa

#### ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Muestral	2	1310.7	655.3	42.88	0.000
Error	9	137.5	15.3		
Total	11	1448.2			

S = 3.909    R-Sq = 90.50%    R-Sq(adj) = 88.39%



Pooled StDev = 3.909

#### Prueba tukey

Grouping Information Using Tukey Method

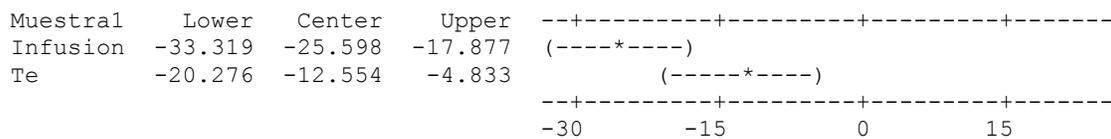
Muestral	N	Mean	Grouping
Agua	4	71.793	A
Te	4	59.239	B
Infusion	4	46.196	C

Means that do not share a letter are significantly different.

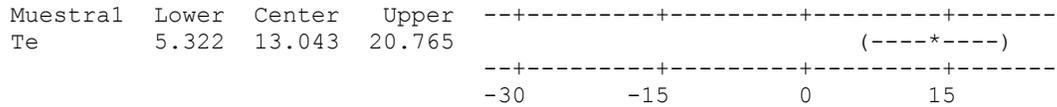
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Muestral

Individual confidence level = 97.91%

Muestral = Agua subtracted from:



Muestral = Infusion subtracted from:

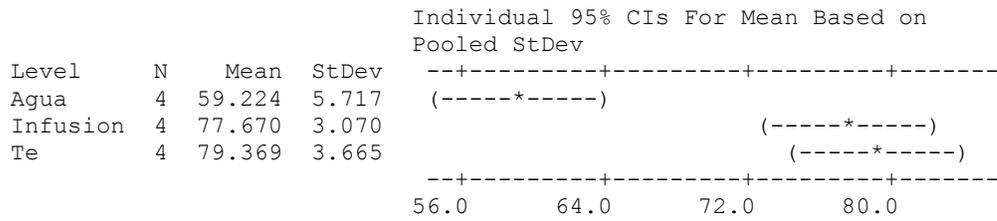


## 7.4. Anexo 4: Análisis estadístico para inhibición de $\alpha$ - Glucosidasa

### ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Muestral	2	998.7	499.3	26.97	0.000
Error	9	166.6	18.5		
Total	11	1165.3			

S = 4.303    R-Sq = 85.70%    R-Sq(adj) = 82.52%



Pooled StDev = 4.303

### Prueba tukey

Grouping Information Using Tukey Method

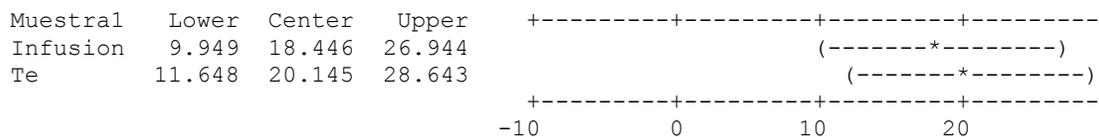
Muestral	N	Mean	Grouping
Te	4	79.369	A
Infusion	4	77.670	A
Agua	4	59.224	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Muestral

Individual confidence level = 97.91%

Muestral = Agua subtracted from:



Muestral = Infusion subtracted from:

