



Compuestos fenólicos totales en hojas de Neem (*Azadirachta indica*) del norte peruano: Efectos del secado y extracción asistida por ultrasonidos

Total phenolic compounds in Neem leaves (*Azadirachta indica*) from Northern Peru: Effects of drying and ultrasound-assisted extraction

-  [Espinoza-Espinoza, Luis Alfredo¹](#)
-  [Muñoz-More, Henry Daniel¹](#)
-  [Nole-Jaramillo, Juliana Maricielo¹](#)
-  [Ruiz-Flores, Luis Alberto¹](#)
-  [Gutiérrez-Valverde, Karina Silvana¹](#)
-  [Moreno-Quispe, Luz Arelis¹](#)
-  [Cornelio-Santiago, Heber Peleg¹](#)

¹Universidad Nacional de Frontera, Sullana, Piura, Perú.

Recibido: 29 Nov. 2024 | Aceptado: 30 Nov. 2024 | Publicado: 15 Oct. 2024

Autor de correspondencia*: lespinozae@unab.edu.pe

Cómo citar este artículo: Espinoza-Espinoza, L.A., Muñoz-More, H.D., Nole-Jaramillo, J.M., Ruiz-Flores, L.A., Gutiérrez-Valverde, K.S., Moreno-Quispe, L.A. y Cornelio-Santiago, H.P. (2024). Compuestos fenólicos totales en hojas de Neem (*Azadirachta indica*) del norte peruano: Efectos del secado y extracción asistida por ultrasonidos. *Revista Científica Aypate*, 3(3), 60-73. <https://doi.org/10.57063/ricay.v3i3.118>

RESUMEN

Introducción: Las hojas de *Azadirachta indica* (Neem) son reconocidas por sus propiedades bioactivas. Este estudio evaluó el impacto de la temperatura de secado y la extracción asistida por ultrasonidos (EAU) en el contenido fenólico total de las hojas de Neem del norte del Perú. **Métodos:** Se recolectaron hojas de Neem del campus de la Universidad Nacional de Frontera. Estas se lavaron, secaron a temperaturas controladas (50, 60, 70 y 80 °C), molieron y almacenaron. La EAU se realizó utilizando etanol al 96% (2:40 p/v), frecuencias de 37 y 80 kHz durante 20, 30 y 40 minutos. También se realizó una extracción convencional por agitación para comparación. El contenido fenólico total se cuantificó usando el método de Folin-Ciocalteu. Se empleó un diseño factorial 4x2x3, analizando los datos mediante ANOVA y prueba de Tukey. **Resultados:** La temperatura de secado y las condiciones del ultrasonido influyeron significativamente en el contenido fenólico total. El mayor contenido (2177.3 ± 50.5 mg de GAE/100 g de hoja) se obtuvo con secado a 50 °C y ultrasonido a 37 kHz durante 30 minutos. El contenido más bajo se registró a 80 °C de secado y ultrasonido a 80 kHz por 20 minutos. **Discusión:** Los resultados sugieren que temperaturas de secado más bajas y tiempos de ultrasonido moderados son más efectivos para preservar los compuestos fenólicos en las hojas de Neem. La EAU es una alternativa prometedora para la obtención de extractos bioactivos que podrían emplearse para el desarrollo de ingredientes o envases funcionales. Se requieren más estudios para optimizar el proceso.

Palabras Clave: Compuestos bioactivos, compuestos fenólicos, EAU, Frecuencia, kHz, extracción convencional.

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia de atribución de Creative Commons, que permite el uso sin restricciones, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que se cite debidamente la obra original.



ABSTRACT

Introduction: *Azadirachta indica* (Neem) leaves are recognized for their bioactive properties. This study evaluated the impact of drying temperature and ultrasound-assisted extraction (UAE) on the total phenolic content of Neem leaves from northern Peru. **Methods:** Neem leaves were collected from the Universidad Nacional de Frontera campus. They were washed, dried at controlled temperatures (50, 60, 70, and 80 °C), ground, and stored. UAE was performed using 96% ethanol (2:40 w/v), frequencies of 37 and 80 kHz for 20, 30, and 40 minutes. Conventional extraction by agitation was also performed for comparison. Total phenolic content was quantified using the Folin-Ciocalteu method. A 4x2x3 factorial design was employed, analyzing data using ANOVA and Tukey's test. **Results:** Drying temperature and ultrasound conditions significantly influenced the total phenolic content. The highest content (2177.3 ± 50.5 mg GAE/100 g of leaf) was obtained with drying at 50 °C and ultrasound at 37 kHz for 30 minutes. The lowest content was recorded at 80 °C drying and 80 kHz ultrasound for 20 minutes. **Discussion:** Results suggest that lower drying temperatures and moderate ultrasound times are more effective in preserving phenolic compounds in Neem leaves. UAE is a promising alternative for obtaining bioactive extracts that could be used for the development of functional ingredients or packaging. Further studies are needed to optimize the process.

Keywords: Bioactive compounds, phenolic compounds, UAE, frequency, kHz, conventional extraction.

1.INTRODUCCIÓN

La biodiversidad de las plantas medicinales forma parte de la comunidad biológica que lucha contra las enfermedades y brinda la oportunidad de aprovecharlas como fuente de formulaciones farmacéuticas (Hamad et al., 2021). Entre las plantas medicinales, la especie *Azadirachta indica* A.Juss (Neem) tiene un alto valor biológico al combatir enfermedades, inhibir microorganismos y evitar los efectos negativos de los antioxidantes sintéticos (Abdulkadir et al., 2017). El árbol Neem pertenece a la familia Meliaceae, sus semillas, hojas, flores, frutos, raíces y corteza se han utilizado para tratar enfermedades debido a su alto valor terapéutico; sin embargo, la mayor concentración de compuestos bioactivos se encuentra en sus semillas y hojas (Braga et al., 2018). El Neem está compuesto por dos clases de compuestos fitoquímicos: isoprenoides y no isoprenoides; la primera clase consiste en vilasininas, limonoides, C-secomeliacinas, triterpenoides y diterpenoides; de este grupo se han detectado la presencia de 64 triterpenoides entre las semillas, corteza y hojas (Godfrey, 1994); mientras que la segunda clase está conformada por carbohidratos, proteínas, compuestos de ácidos fenólicos y taninos (Soma y Satarupa, 2021).

Los estudios informan de que ambas clases actúan contra problemas del cuerpo humano y sobre plagas que afectan a la biodiversidad. En la literatura se ha informado la identificación de 41 metabolitos en el extracto de hojas de Neem, mostrando actividad parasitaria contra *Z. Arugamensis* (Dawood Shah et al., 2021), principalmente los isoprenoides (Salanina, Azadiractina, Nimbolina, Nimbina) presentes en el Neem han demostrado actividad inhibitoria de hasta un 80% de *A. albopictus* (Benelli et al., 2016); los compuestos fenólicos por su parte, son capaces de inhibir el crecimiento fúngico, específicamente en el sistema enzimático de *F. Graminearum* (Heidtmann Bemvenuti et al., 2016). También se informó, que los extractos de hojas de Neem con acetato de etilo concentran la mayor cantidad de terpenos e inhiben el crecimiento de células tumorales como NCI-H460, MCF-7, HeLa y HepG2, reflejando las propiedades anticancerígenas y

antitumorales (Santos et al., 2018). Las hojas de Neem tienen un alto contenido fenólico (Fenoles Totales, $54,87 \pm 1,82$ mg Ácido Tánico/g; Flavonoides 9,85 mg Quercetina/g y Cap Antioxidante; $215 \mu\text{mol}$ Ácido Ascórbico/g) y propiedades antioxidantes (Fong-Lores et al., 2014), propiedades antidiabéticas (Abdel Moaty et al., 2022), antiinflamatorias (Rinaldi et al., 2022) y anti-covid; lo que destaca al Neem como una plata con potencial para el desarrollo de nuevos fitofármacos (Eze et al., 2022).

A pesar de todas las propiedades beneficiosas presentes en el Neem, es caracterizado como "Anti-alimentario", debido al alto contenido de limonoides que le confieren un sabor amargo e indeseable al paladar (Datta et al., 2017; Pijoan, 2004); no obstante, para reducir o aumentar la concentración de compuestos de Neem se han utilizado métodos eficaces como: extracción en fase sólida que promueve la reducción del contenido de limonoides (Datta et al., 2017; Ji-Won et al., 2013), la absorción mediante resinas poliméricas para reducir el sabor amargo (Fayoux et al., 2007) y la extracción asistida por ultrasonidos para lograr mayores concentraciones de compuestos bioactivos extraídos del Neem (Tiwari, 2015).

La extracción asistida por ultrasonidos (EAU) es una técnica moderna de extracción sólido-líquido; demuestra ventajas en la transferencia de masa, mejora el rendimiento del proceso, es eficiente en el tiempo y fácil de usar (S. P. Shewale et al., 2022). La transferencia de masa se produce en la pared celular externa de la muestra debido al proceso de cavitación acústica, responsable de la separación y ruptura de las burbujas de aire (Shirsath et al., 2012). El resultado de la cavitación presenta turbulencias y corrientes de fluido en el sistema, provocando un aumento significativo de la tasa de transferencia y del rendimiento de extracción (Rokhina et al., 2009; Yang y Zhang, 2008). El movimiento de las ondas ultrasónicas a través de la fase fluida genera burbujas de cavitación causadas por el llenado de vacío; la presión y la temperatura tienden a aumentar en función de la disrupción de las burbujas con ciclos crecientes de compresión y expansión de la fase. Los efectos causados por el aumento de la temperatura dan lugar a un aumento de la velocidad de movimiento del disolvente, la ruptura de la pared celular, la difusión del disolvente en el sólido celular, la disminución del tamaño de las partículas, la velocidad de colisión de las partículas y la transferencia de masa y la eficiencia de extracción (Charpe y Rathod, 2012; Rao y Rathod, 2015; Vetel et al., 2013).

Estudios sugieren que tanto las condiciones preparación de la muestra y de extracción afectan significativamente el contenido fenólico recuperado de las hojas de Neem (Patil et al., 2022; Sejali y Anuar, 2011; S. Shewale y Rathod, 2018; Vats, 2015). De hecho, en la etapa de secado se promueve descomposición térmica de los ingredientes activos; así también, durante el proceso de molienda (Sejali y Anuar, 2011; Vats, 2015); un estudio reveló que un proceso de secado rápido a 110°C seguido de un secado al aire ayudaba a lograr la máxima retención de compuestos bioactivos y actividad antioxidante, en comparación a un secado a temperaturas de 4°C , 20°C y temperatura ambiente (Vats, 2015). No obstante, también se reportó contenidos de fenólicos mayores en el polvo obtenido de hojas de *Azadirachta indica* secadas a la sombra en comparación con las hojas secadas al horno a 45°C o 70°C (Sejali y Anuar, 2011).

Por su parte, durante la extracción asistida por ultrasonido de hojas de Neem, el tamaño de las partícula del polvo, seguido por la temperatura, el tiempo de irradiación y la relación sólido-líquido, son los factores que afectan significativamente el rendimiento de extracción, considerando las condiciones óptimas se podría obtener la extracción de 30 mg GAE/g de compuesto fenólicos (Patil et al., 2022). Otros estudios revelaron, la extracción de compuesto fenólicos de hojas de Neem de hasta 10.8 mg GAE/g y 11,87 mg de GA/g respectivamente en condiciones optimizadas (S. P. Shewale et al., 2022; S. Shewale y Rathod, 2018). En definitiva, la extracción asistida por ultrasonidos, disminuye

eficientemente el tiempo de extracción y mejoró marginalmente el rendimiento de TPC de las hojas de *A. indica* (S. P. Shewale et al., 2022).

En la región Piura abunda una producción de árboles de Neem y por sus propiedades beneficiosas se ha extraído el aceite esencial para su uso como repelente natural (Llanos Gonzáles et al., 2020) y bioinsecticida frente a los repelentes o insecticidas químicos convencionales, pero no se ha estudiado las técnicas de extracción de los compuestos fenólicos de las hojas de Neem de esta región. Por esta razón, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la temperatura de secado y la extracción asistida por ultrasonidos en la cuantificación del contenido fenólico total de las hojas de Neem en el norte de Perú.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestra y reactivos

Las hojas de Neem fueron recolectadas en la Universidad Nacional de Frontera (UNF) - Sullana, en los meses de febrero y marzo del año 2023. Las hojas fueron seleccionadas y trasladadas al laboratorio de Alimentos Funcionales y Bioprocesos de la UNF, para el desarrollo del estudio. Se obtuvieron, ácido gálico, Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio de Sigma-Aldrich (ACS, Lima, Perú) y etanol (96% de pureza).

2.2. Preparación de la muestra y secado

Las hojas de Neem se lavaron 3-4 veces continuamente con agua potable y se deshidrataron en un secador de bandeja (Deshidratador ST-01, 40-90°C) a cuatro temperaturas diferentes (50, 60, 70 y 80°C) durante 6 horas. Las hojas secas se sometieron a molienda en un molino triturador (A-S 3000 cap. 11kg) durante 4 minutos con una pausa cada 2 minutos. El polvo de hoja de Neem se almacenó en recipientes de vidrio herméticamente cerrados.

2.3. Extracción de compuestos fenólicos

Preparación de muestras

La extracción se realizó utilizando alcohol al 96%, en una proporción 2:40 p/v con respecto a la muestra, la homogeneización se realizó en frascos de vidrio con tapas metálicas, el proceso fue por triplicado.

2.3.1. Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)

Los frascos conteniendo el polvo de hojas de Neem (2g) y etanol (20 mL) se sumergieron en la canasta de alambre de acero inoxidable del baño de ultrasonido (P 30 H-ELMA), el proceso se realizó a 2 frecuencias (37 y 80 khz); durante 3 tiempos (20, 30 y 40 minutos); a 100% de potencia y temperatura ambiente (25 °C). Al final del proceso de baño de ultrasonidos, los extractos se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 minutos, se recuperó el sobrenadante. Los extractos se homogeneizaron según cada tratamiento y se protegieron de la luz con papel de aluminio, se etiquetaron y se almacenaron en congelación hasta su análisis.

2.3.2. Extracción por agitación convencional (EAC)

El polvo de hojas de Neem (2g) y etanol al 96% (20 mL) fueron sometidos a agitación magnética a 2500 rpm durante tres tiempos diferentes (20, 30 y 40 minutos). Cada tratamiento fue centrifugado a 4500 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante fue recuperado y homogenizado (extracto). Los extractos fueron protegidos de la luz con papel aluminio, etiquetados y almacenados en congelación hasta su análisis.

2.4. Determinación del contenido de Compuestos Fenólicos Totales (TPC)

El ensayo colorimétrico se realizó mezclando 1.364 mL de agua destilada; 0.3 mL de extracto y 136 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, la solución resultante se dejó reposar a

temperatura ambiente durante 8 min en un lugar oscuro. A continuación, se añadieron 1,2 mL de descarbonato sódico al 7,5% y la reacción se completó tras 2 h en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se registró en un espectrofotómetro UV-Visible (Genesys, S-150, 6287015) a 760 nm. La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración de ácido gálico en el rango de 10 a 60 ppm ($R^2 = 0.9998$). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por cada 100 gramos de muestra.

2.5. Análisis de datos

En el desarrollo de la investigación se empleó un diseño estadístico factorial con arreglo 4x2x3; factor temperatura (50,60,70 y 80°C), frecuencia (37 y 80 kHz) y tiempo de extracción por ultrasonidos (20, 30 y 40 minutos) como se muestra en la Tabla 4.

3.RESULTADOS

3.1. TPC de polvo de cladodios de nopal, utilizando diferentes temperaturas de secado, frecuencia y tiempo de ultrasonidos.

El contenido fenólico total de *Azadirachta indica* se obtuvo a partir de los diferentes factores establecidos; los resultados se expresaron en mg GAE/100g. El diagrama de Pareto mostró los resultados del efecto estandarizado entre cada factor; se utilizó el análisis de varianza ANOVA para demostrar la significancia e interacción de los factores; finalmente, mediante las comparaciones por pares de Tukey, se estableció la diferencia significativa entre los tratamientos; la Tabla 1 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 13.

*Valores de compuestos fenólicos totales (mg GAE/100 g) en *Azadirachta indica* (Neem)*

Tipo de extracción	N°	Condiciones de extracción				TPC
		Secado	Agitación	Ultrasonidos		
		T(°C)	t (min)	F (Khz)	T (min)	
ECA	1	50	20	-	-	1745.3 ± 54.4 ^b
	2	50	30	-	-	1041.0 ± 36.5 ^{hij} kl
	3	50	40	-	-	1037.0 ± 30.2 ^{hij} kl
	4	60	20	-	-	822.0 ± 21.1 ⁿ
	5	60	30	-	-	929.0 ± 30.8 ^{klmn}
	6	60	40	-	-	1284.7 ± 21.5 ^{def}
	7	70	20	-	-	1307.0 ± 65.8 ^{de}
	8	70	30	-	-	976.0 ± 45.0 ^{ijklm}
	9	70	40	-	-	1346.3 ± 69.9 ^d
	10	80	20	-	-	855.0 ± 20.8 ^{mn}
	11	80	30	-	-	1065.0 ± 48.1 ^{hij} k
UEA	12	80	40	-	-	996.0 ± 40.8 ^{ijkl}
	13	50	-	37	20	1707.4 ± 25.1 ^b
	14	50	-	37	30	2177.3 ± 50.5 ^a
	15	50	-	37	40	1057 ± 29.4 ^{hijk}
	16	50	-	80	20	1070.88 ± 15.16 ^{hi} j

17	50	-	80	30	1765.7±68.4 ^b
18	50	-	80	40	977.5±44.5 ^{jk l m}
19	60	-	37	20	1342.2±41.0 ^d
20	60	-	37	30	1495.7±78.0 ^c
21	60	-	37	40	1528.6±71.7 ^c
22	60	-	80	20	1239.3±18.3 ^{d e f}
23	60	-	80	30	808.4±18.9 ⁿ
24	60	-	80	40	1231.1±30.9 ^{d e f g}
25	70	-	37	20	1000.7±39.9 ^{jk l}
26	70	-	37	30	1073.3±46.5 ^{h i j}
27	70	-	37	40	1734.9±74.6 ^b
28	70	-	80	20	827.7±34.1 ⁿ
29	70	-	80	30	1096.7±40.2 ^{g h i j}
30	70	-	80	40	1146.4±54.7 ^{f g h i}
31	80	-	37	20	1018.59±6.36 ^{i j k}
32	80	-	37	30	1172.1±17.9 ^{e f g h}
33	80	-	37	40	1302.7±37.3 ^{d e}
34	80	-	80	20	1287.8±28.5 ^{d e}
35	80	-	80	30	916.3±21.7 ^{l m n}
36	80	-	80	40	1094.2±19.3 ^{g h i j}

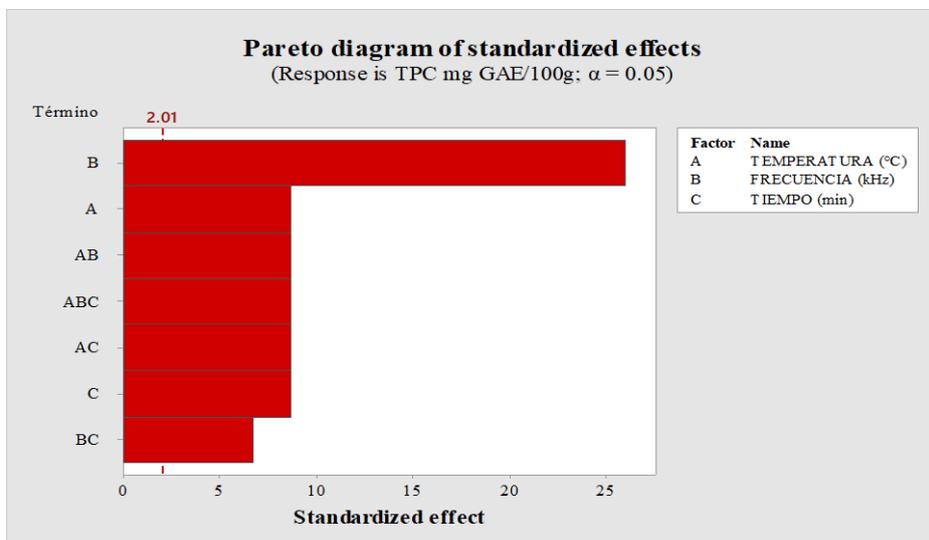
*Diferentes superíndices (a-n) en la columna TPC, indican diferencia significativa entre los tratamientos. EAU= Extracción asistida por ultrasonidos, CSE= Extracción convencional, N°=Número de tratamiento.

T: Temperatura; t: tiempo; F: Frecuencia; TPC: Compuestos Fenólicos Totales expresados en mg GAE/100 gr.

La Figura 1 muestra los efectos estandarizados de cada factor sobre la variable de respuesta en condiciones de valor absoluto, del menor al mayor efecto, mientras que la figura 2 muestra el efecto específico generado por cada factor según el mejor resultado del contenido fenólico total; por último, la figura 3 muestra la interacción de los factores, demostrando la significación resultante del análisis de la varianza.

Figura 13.

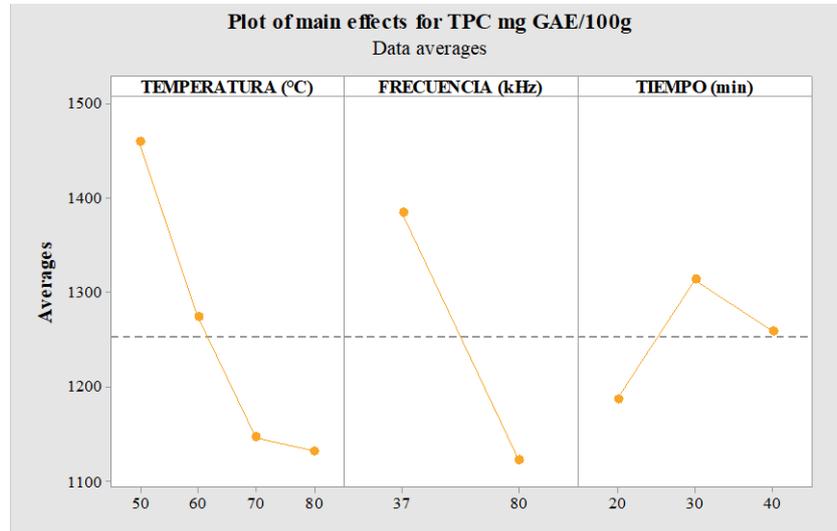
Diagrama de Pareto de los efectos normalizados en el contenido de TPC



El factor que presenta el mayor efecto normalizado es la frecuencia de los ultrasonidos (37 y 80 kHz), la intervención de las dos medidas modifica significativamente el mayor valor absoluto del diagrama de Pareto; sin embargo, la relación entre el tiempo y la frecuencia muestra el menor efecto normalizado.

Figura 2.

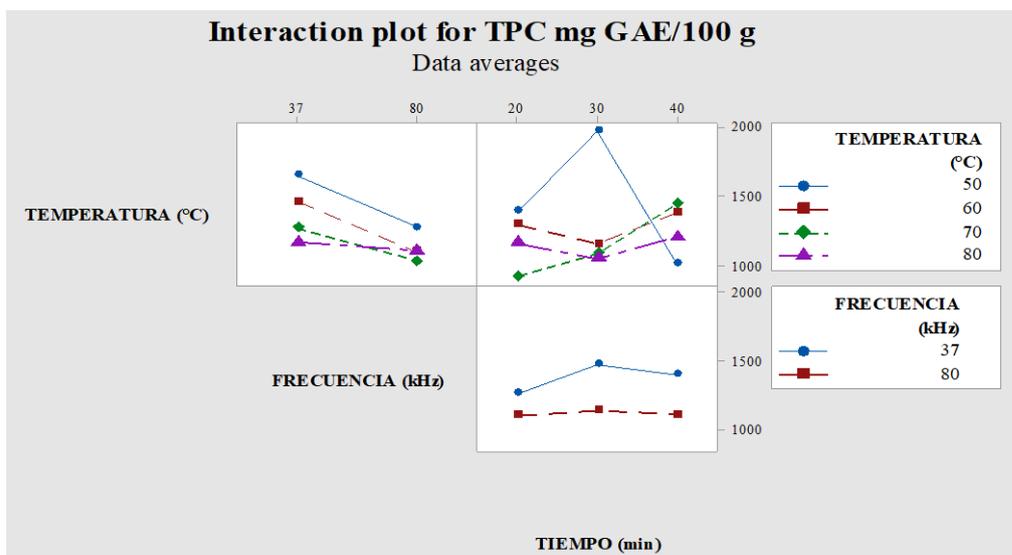
Efecto de los factores (temperatura, frecuencia y tiempo de ultrasonidos) en el TPC de las hojas de Azadirachta indica



Se obtiene un mayor contenido de TPC a 50°C, a medida que aumenta la temperatura, el contenido de TPC disminuirá progresivamente; paralelamente, la frecuencia a 37 kHz muestra eficiencia en la extracción del mayor contenido fenólico; sin embargo, el tiempo muestra un comportamiento particular, el TPC aumenta a los 30 minutos y disminuye a los 20 y 40 minutos.

Figura 3.

Interacción de los factores (temperatura de secado, frecuencia y tiempo de ultrasonidos) sobre el TPC en hojas de Neem.



4.DISCUSION

El análisis de compuestos fenólicos totales se realizó en polvo de hoja de *Azadirachta indica* A.Juss, los principales metabolitos secundarios presentes en la hoja son: nimbineno, nimbandiol, nimocinal, quercetina, rutina, nimbolide, vilasinina, β -sitosterol y glicoproteína (Paul et al., 2011); la concentración de todos los metabolitos determina la cantidad de TPC, los resultados de la Tabla 1 evidencian que la cuantificación se encuentra en un rango de 2177,3 y 808,4 mg GAE/100 gramos, mayor contenido mostrado por (Khairy et al., 2022) al identificar 23 compuestos fenólicos en hojas de *Neem* con un valor promedio total de 8101. 01 μ g/100 g; en cuanto a (Hamad et al., 2021) los valores oscilaron entre 174,1 y 52,6 mg GAE/ gramos y en la investigación de (Fong-Lores et al., 2014) el valor fue de 54,87 \pm 1,82 mg ácido tánico/ gramos en hojas de *Neem* secadas a temperatura ambiente; sin embargo, el resultado de (Hismath et al., 2011) fue dos veces superior (4661. 17 mg GAE/ 100 g) que el valor del tratamiento 14; este comportamiento está relacionado con la polaridad de la acetona-agua y los compuestos fenólicos polares, cumpliéndose el principio de "Lo semejante disuelve lo semejante" descrito por el químico Alfredo Pérez Rubalcaba y confirmado por (Saha Tchinda et al., 2021), explicando que los compuestos fenólicos son más solubles con disolventes polares; bajo etanol obtuvieron 37,5 \pm 0,2 mg GAE/g de aceite de semilla de *Neem*, mientras que con Hexano obtuvieron 16,80 \pm 0,05 mg GAE/g de aceite de semilla de *Neem*; sin embargo, los procesos de extracción de compuestos fenólicos en su forma sólida y aplicaciones alimentarias disminuyen el contenido total, causado por los tratamientos térmicos utilizados en el proceso; los resultados de extracción de (Braga et al., 2018) fueron de 40.415 \pm 0.566 y 45.200 \pm 0.569 mg GAE/gramos; mientras que en miel de *Neem* fue de 20.31 \pm 0.05 mg GAE/100 gramos (Devi et al., 2018) y en té de hojas seca fue de 12 mg GAE/gr (Datta et al., 2017); sin embargo, distintas partes de la planta de *Neem* presentan un contenido favorable de TPC; (Hossain et al., 2014) , determinó que las semillas de *Neem* son una fuente abundante de compuestos fenólicos, el máximo contenido fue de 238.81 \pm 0.98 mg/g de GAE de extracto seco; sin embargo, (Abdulkadir et al., 2017) comparó el contenido de TPC de hojas, semillas y corteza de *Neem*, lo cual resultan tener 136.45 \pm 0.99, 30.43 \pm 1.16 y 285.77 \pm 4.49 mg GAE/g.

a) Efecto de la temperatura de secado

La temperatura y el tiempo son parámetros fundamentales que participan del proceso de extracción debido que, el aumento de temperatura estimula la aceleración del movimiento celular, solubilidad y penetración de los componentes extraído, sin embargo algunos de los componentes biológicamente activos son termolábiles debido a la degradación química o erosión química (S. Shewale y Rathod, 2018). La figura 02 indica que se obtiene una alta concentración de compuestos fenólicos totales al dejar secar las hojas de *Neem* a 50°C, este comportamiento se evidencio en la investigación de (Sejali y Anuar, 2011) al comparar tres sistemas de secado (bajo sombra, en horno a 45°C y 70°C) la mayor concentración de compuestos fenólicos se vio reflejada en el método secado a la sombra (135 mg/g) seguido del secado al horno a 45°C (120mg/g) y finalmente a 70°C (76mg/g); este efecto térmico no solo ocurre en hojas de *Neem*; Hidar et al. (2020), demostraron que la temperatura de secado afecta significativamente la cantidad de contenido fenólico y flavonoides en la hoja de *Stevia* al someterlas a 50, 60, 70 y 80°C (84 mg GAE/gr, 81 mg GAE/gr, 55 mg GAE/gr y 43 mg GAE/gr) disminuyendo más del 50% del total (271 mg GAE/gr en hojas frescas); la investigación similar de (Castillo Téllez et al., 2018) agrega que el incremento de temperatura no solo afecta el contenido total de compuestos fenólicos sino también el color y el contenido de flavonoides.

b) Extracción asistida por ultrasonido frente a la extracción convencional por agitación

La cavitación es uno de los responsables de elevar la tasa de extracción asistida por ultrasonido debido que, los tejidos biológicos están expuestos a sufrir cizallamientos significativos, aumentando su permeabilidad y facilidad de liberación de compuestos intracelulares (Yu et al., 2016), según la tabla 1 se evidencia que la intervención de ultrasonido ha mejorado los valores de TPC (2177.3 ± 50.5 mg GAE/100gr) frente a una extracción por agitación convencional (1041.0 ± 36.5 mg GAE/100gr). La concentración máxima asistida por ultrasonido de TPC se obtiene a 30 minutos, mientras que, por agitación convencional la máxima concentración es de 1745.3 ± 54.4 mg GAE/ 100 gr se obtuvo por 20 minutos; en este caso la temperatura de extracción es la responsable de romper las paredes celulares y extraer la mayor cantidad de compuestos bioactivos.

c) Condiciones de extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido, es considerada una tecnología verde, debido a la eficacia, reducción significativa del tiempo y su viabilidad económica (Rokhina et al., 2009). La figura 1 (Diagrama de Pareto de efectos estandarizados) señala que la frecuencia de ultrasonido ocasiona un efecto significativo sobre el contenido de fenólicos totales debido a que el ultrasonido promueve una mejor penetración del disolvente en los tejidos celulares, ocasionando el cizallamiento de los tejidos que conducen la liberación de compuestos bioactivos; (Saha Tchinda et al., 2021).

A pesar que no se ha considerado la temperatura de extracción del baño de ultrasonidos como un factor; juega un papel importante al tener una relación directa con el tiempo de extracción; mientras el tiempo de extracción sea mayor, progresivamente incrementara la temperatura, según la figura 2, el tiempo adecuado para obtener la mayor cantidad TPC es durante 30 minutos de extracción, al alcanzar los 40 minutos provoca la erosión química de algunos componentes biológicos; este efecto térmico ocurre en función a la disrupción de las burbujas con el aumento de los ciclos de compresión y expansión de la fase, provocando una penetración elevada en el medio celular primario y liberando rápidamente moléculas ácidas (Taralkar et al., 2016). El incremento de temperatura ocasiona un aumento en la velocidad de movimiento del disolvente, debido a que su viscosidad disminuye y facilita la expansión del disolvente a través de los poros celulares (S. P. Shewale et al., 2022); sin embargo, por el efecto térmico se incrementa la presión de vapor del disolvente, provoca rupturas en las burbujas formadas, obstruye los poros y la tensión superficial de las burbujas de cavitación; produciendo su ruptura al mínimo esfuerzo (Gogate et al., 2003; Panda y Manickam, 2019).

En consecuencia los valores de enriquecimiento disminuyen de la transferencia de masa por acción de las burbujas a elevadas temperaturas que colapsan a una intensidad menor; por lo tanto, la extracción debe realizarse a temperaturas y tiempos adecuados con el fin de obtener resultados de cavitación óptimos; (S. P. Shewale et al., 2022) realizo un calentamiento exterior mínimo para la UAE a 20, 30, 40 y 50°C obteniendo durante 4 minutos 7.96; 8.76; 9.78 y 10.15 mg GAE/gr de polvo y durante 14 minutos 9.93, 10.75, 11.47 y 11.82 mg GAE/ gr de polvo de hojas de Neem; mientras que, el resultado con más alto contenido fenólico fue durante 30 minutos de extracción y a 50°C como temperatura de secado 2177.3 ± 50.5 mg GAE/100 gr de polvo de hoja de Neem.

5. CONCLUSIONES

La investigación demostró que la EAU es un método eficaz para obtener compuestos fenólicos de las hojas de Neem del norte peruano. Los resultados revelaron que la combinación de factores que produjo el mayor TPC fue una temperatura de secado de

50°C, una frecuencia de ultrasonido de 37 kHz y un tiempo de extracción de 30 minutos, alcanzando 2177.3 ± 50.5 mg GAE/100 g de polvo de hoja de Neem. Se observó que temperaturas de secado superiores a 50°C resultaban en una disminución del contenido fenólico total, debido a la degradación térmica de los mismos. La EAU demostró ser más eficiente que la extracción convencional por agitación, presentándose como una alternativa prometedora para la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos que podrían emplearse como conservantes naturales o ingredientes funcionales en alimentos. Estos hallazgos son particularmente relevantes en el contexto actual, donde existe una creciente demanda de aditivos alimentarios naturales y soluciones de envasado sostenibles. Para futuras investigaciones, se recomienda evaluar la optimización del proceso, la actividad antimicrobiana y antioxidante específica de los extractos obtenidos en sistemas alimentarios reales y explorar su eficacia en la extensión de la vida útil de los alimentos.

6. CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran que la investigación se ha llevado a cabo en ausencia de relaciones comerciales o financieras que pudieran interpretarse como un posible conflicto de intereses.

6. CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

HDM-M y JMN-J: Redacción: Borrador original, Redacción: revisión y edición, Conceptualización, Investigación; **LAR-F:** Redacción: borrador original, Redacción: revisión y edición, Conceptualización, Metodología, Investigación, Curación de datos, Análisis formal; **KSG-V, LAM-Q y HPC-S:** Redacción: revisión y edición, Supervisión, Validación, Análisis formal, Curación de datos, Visualización; **LAE-E:** Redacción: Borrador original, Redacción: revisión y edición, Conceptualización, Investigación, Análisis formal, Curación de datos, Supervisión.

7. FINANCIAMIENTO

Esta investigación no recibió apoyo financiero.

8. DECLARACIÓN ÉTICA: INVESTIGACIÓN CON SERES HUMANOS Y ANIMALES

Los autores declaran que no se realizaron experimentos en seres humanos ni en animales durante la presente investigación

9. ABREVIATURAS

EAU: Extracción Asistida por Ultrasonidos

GAE: Equivalente de Ácido Gálico

TPC: Total Compounds Phenolic

10. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Frontera por facilitar el acceso a sus laboratorios de investigación, lo que permitió llevar a cabo el presente estudio.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abdel Moaty, A. A., El-Kholie, E. A., y Adarous, R. A. (2022). The Anti-Diabetic Effect of Neem Leaves (*Azadirachta indica*,) in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Journal of Home Economics*, 32(2), 19-31.

- Abdulkadir, A. R., Mat, N., y Jahan, S. (2017). In-vitro Antioxidant Potential in Leaf , Stem and Bark of *Azadirachta indica*. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci*, 40(4), 497-506.
- Benelli, G., Canale, A., Toniolo, C., Higuchi, A., Pavela, R., y Nicoletti, M. (2016). Neem (*Azadirachta indica*): Towards the ideal insecticide ? *Natural Product Research*, 6419, 1-18. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1214834>
- Braga, D. L., Mota, S. T. S., Zoia, M. A. P., Lima, P. M. A. P., Orsolin, P. C., Vecchi, L., Nepomuceno, J. C., Fürstenau, C. R., Maia, Y. C. P., Goulart, L. R., y Araujo, T. G. (2018). Ethanolic Extracts from *Azadirachta indica* Leaves Modulate Transcriptional Levels of Hormone Receptor Variant in Breast Cancer Cell Lines. *Molecular Sciences*, 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19071879>
- Castillo Téllez, M., Pilatowsky Figueroa, I., Castillo Téllez, B., López Vidaña, E. C., y López Ortiz, A. (2018). Solar drying of *Stevia* (*Rebaudiana Bertoni*) leaves using direct and indirect technologies. *Solar Energy*, 159, 898-907. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2017.11.031>
- Charpe, T. W., y Rathod, V. K. (2012). Extraction of glycyrrhizic acid from licorice root using ultrasound: Process intensification studies. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 54, 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.002>
- Datta, A., Grün, I. U., Kwasniewski, M. T., y Fernando, L. N. (2017). Comparison of Two Adsorbent Based de-Bittering Procedures for Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Tea- Effect on Polyphenols , Anti-Oxidant Capacity , Color and Volatile Profile. *Plant Foods for Human Nutrition*, 10-17. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0595-9>
- Dawood Shah, M., Venmathi Maran, B. A., Maran, V., Kit Tan, J., Soon Yong, Y., Fui Fui, C., Muhamad Shaleh, S. R., y Shapawi, R. (2021). The anti-leech potential of the solvent extract of Bornean neem leaves and ultra-high performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry profiling. *Journal of King Saud University - Science*, 33(6), 101541. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101541>
- Devi, A., Jangir, J., y K.A., A. A. (2018). Chemical characterization complemented with chemometrics for the botanical origin identification of unifloral and multifloral honeys from India. *Food Research International*, 107, 216-226. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.017>
- Eze, M. O., Ejike, C. E. C. C., Ifeonu, P., Udeinya, I. J., Udenigwe, C. C., y Uzoegwu, P. N. (2022). Anti-COVID-19 potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract. En *Scientific African* (Vol. 16, p. e01184). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01184>
- Fayoux, S., Hernandez, R., y Holland, R. (2007). The Debittering of Navel Orange Juice Using Polymeric Films. *Food Engineering and Physical Properties*, 72. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00283.x>

- Fong-Lores, O., Berenguer-Rivas, C., de la Vega Acosta, J., Wawoe-Díaz, N., y Puente-Zapata, E. (2014). Antioxidant potential of an aqueous leaf extract of Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(2), 205-207.
- Godfrey, C. R. A. (1994). *Agrochemicals from natural products*. CRC Press. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(95\)90095-0](https://doi.org/10.1016/0167-8809(95)90095-0)
- Gogate, P. R., Wilhelm, A. M., y Pandit, A. B. (2003). Some aspects of the design of sonochemical reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(6), 325-330. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(03\)00103-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(03)00103-2)
- Hamad, G. M., Mohdaly, A. A. A., El-Nogoumy, B. A., Ramadan, M. F., Hassan, S. A., y Zeitoun, A. M. (2021). Detoxification of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A Using *Salvia farinacea* and *Azadirachta indica* Water Extract and Application in Meat Products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(10), 3098-3120. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03581-1>
- Heidtmann Bemvenuti, R., Moser Tralamazza, S., Jorge Ferreria, C. F., Correa, B., y Badiale Furlong, E. (2016). Effect of natural compounds on *Fusarium graminearum* complex. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 3998-4008. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7591>
- Hidar, N., Ouhammou, M., Mghazli, S., Idlimam, A., Hajjaj, A., Bouchdoug, M., Jaouad, A., y Mahrouz, M. (2020). The impact of solar convective drying on kinetics, bioactive compounds and microstructure of stevia leaves. *Renewable Energy*, 161, 1176-1183. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.124>
- Hismath, I., Wan Aida, W. M., y Ho, C. W. (2011). Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves. *International Food Research Journal*, 18(3), 931-939.
- Hossain, M. D., Sarwar, M. S., Dewan, S. M. R., Hossain, M. S., Shahid-Ud-Daula, A., y Islam, M. S. (2014). Investigation of total phenolic content and antioxidant activities of *Azadirachta indica* roots. *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(2), 97-102.
- Ji-Won, L., Cho-Long, J., Ki Chang, J., Geun-Hyoung, C., Hee-Dong, L., y Jin Hyo, K. (2013). *Investigation on the insecticidal limonoid content of commercial biopesticides and neem extract using solid phase extraction*. 2(4), 81-85.
- Khairy, D., Osman, M. A., y Mostafa, F. A. M. (2022). Combined use of Aqueous Plant Extracts for Controlling *Meloidogyne incognita* and Modulating Chemical Constituents in Tomato under Greenhouse Conditions. *Pakistan Journal of Nematology*, 40, 1-11. <https://doi.org/10.17582/JOURNAL.PJN/2022/40.1.1.11>
- Llanos Gonzáles, A., Sánchez Suárez, H., Ochoa Mogollón, G., Peralta Ortiz, T., y Ordinola-Zapata, A. (2020). Repellent effect of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) against mosquitoes (*Anophelex* spp) in piglets. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 31(1), 1-11. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17544>

- Panda, D., y Manickam, S. (2019). Cavitation technology-the future of greener extraction method: A review on the extraction of natural products and process intensification mechanism and perspectives. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/app9040766>
- Patil, S. S., Deshannavar, U. B., Ramasamy, M., y Hegde, P. G. (2022). Modeling and optimisation studies on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Azadirachta indica*. *Chemical Engineering Communications*, 209(10), 1423-1438. <https://doi.org/10.1080/00986445.2021.1976164>
- Paul, R., Prasad, M., y K.Sah, N. (2011). *Anticancer biology of Azadirachta indica (Neem): A mini review*. 4047. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.6.16850>
- Pi Joan, M. (2004). Neem, The Village Pharmacy. *Ethnopharmacy*, 23.
- Rao, P. R., y Rathod, V. K. (2015). Mapping study of an ultrasonic bath for the extraction of andrographolide from *Andrographis paniculata* using ultrasound. *Industrial Crops y Products*, 66, 312-318. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.046>
- Rinaldi, F., Hanieh, P. N., Maurizi, L., Longhi, C., Uccelletti, D., Schifano, E., Del Favero, E., Cantù, L., Ricci, C., Ammendolia, M. G., Paolino, D., Froiio, F., Marianecchi, C., y Carafa, M. (2022). Neem Oil or Almond Oil Nanoemulsions for Vitamin E Delivery: From Structural Evaluation to in vivo Assessment of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity. *International Journal of Nanomedicine*, 17, 6447-6465. <https://doi.org/10.2147/IJN.S376750>
- Rokhina, E. V, Lens, P., y Virkutyte, J. (2009). Low-frequency ultrasound in biotechnology: State of the art. En *Trends in Biotechnology* (Vol. 27, Número 5, pp. 298-306). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.001>
- Saha Tchinda, J. B., Mbitnkeu Fetngna Tchebe, T., Abdou, T., Cheumani Yona, A. M., Fauconnier, M. L., Ndikontar Kor, M., y Richel, A. (2021). Fatty acid profiles, antioxidant, and phenolic contents of oils extracted from *Acacia polyacantha* and *Azadirachta indica* (Neem) seeds using green solvents. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(2), 0-3. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15115>
- Santos, K. S., Barbosa, A. M., Freitas, V., Muniz, A. V. C. S., Mendonça, M. C., Calhelha, R. C., Ferreira, I. C. F. R., Franceschi, E., Padilha, F. F., Oliveira, M. B. P. P., y Dariva, C. (2018). Antiproliferative activity of neem leaf extracts obtained by a sequential pressurized liquid extraction. *Pharmaceuticals*, 11(3), 76. <https://doi.org/10.3390/ph11030076>
- Sejali, S. N. F., y Anuar, M. S. (2011). Effect of drying methods on phenolic contents of *Neem (Azadirachta indica)* leaf powder. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 17(2), 119-131. <https://doi.org/10.1080/10496475.2011.584293>
- Shewale, S. P., Kapadia, M., y Rathod, V. K. (2022). Process Intensification Intensification of total phenolic compounds extraction from *Azadirachta indica* (Neem) leaves by ultrasound. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 181(January), 109099. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2022.109099>

- Shewale, S., y Rathod, V. K. (2018). Extraction of total phenolic content from Azadirachta Indica or (Neem) leaves: Kinetics study. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 6068. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1431784>
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., y Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering y Processing: Process Intensification*, 53, 10-23. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003>
- Soma, M., y Satarupa, M. (2021). Neem: Treasure of Natural Phytochemicals. *Chem Sci Rev Lett*, 10(39), 369-401. <https://doi.org/10.37273/chesci.cs205205351>
- Taralkar, S. V., Chattopadhyay, S., y Gaikar, V. G. (2016). Parametric optimization and modeling of batch extraction process for extraction of betulinic acid from leaves of Vitex Negundo Linn. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 51(4), 641-652. <https://doi.org/10.1080/01496395.2015.1105822>
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Vats, S. (2015). Effect of Initial Temperature Treatment on Phytochemicals and Antioxidant Activity of Azadirachta indica A. Juss. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(3), 504-512. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1890-x>
- Vetal, M. D., Lade, V. G., y Rathod, V. K. (2013). Extraction of ursolic acid from Ocimum sanctum by ultrasound: Process intensification and kinetic studies. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 69, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2013.01.011>
- Yang, Y., y Zhang, F. (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. 15, 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.05.001>
- Yu, X., Gouyo, T., Grimi, N., Bals, O., y Vorobiev, E. (2016). Ultrasound enhanced aqueous extraction from rapeseed green biomass for polyphenol and protein valorization partir de biomasse verte Valorisation des polyph eines a de colza par extraction aqueuse assist ee par ultrasons. 19, 766-777. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.03.007>