

Caracterización física y química de aceite esencial de *Azariadachta indica* A Juss expuesto a radiación gamma

Physical and chemical characterization of essential oil of Azariadachta indica A Juss exposed to gamma radiation

MSc. Yosvanis Labrada-Hechavarría^I, MSc. Juan Manuel Cordoví-Velázquez^{II},
MSc. José Leonardo Ledea-Rodríguez^{III}, MSc. Manuel Rapado-Paneque^{IV},
MSc. Úrsula Margarita Rosabal-Cordoví^{II}
ledea1017@gmail.com

^I Universidad de Granma, Granma, Cuba; ^{II} Laboratorio Farmacéutico Líquidos Orales (MEDILIP), Granma; ^{III} Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", Granma, Cuba; ^{IV} Centro de Aplicaciones Tecnologías y Desarrollo Nuclear (CEADEN), La Habana, Cuba.

Recibido: 17 de enero de 2018

Aprobado: 5 de abril de 2018

Resumen

El presente estudio evalúa diferentes niveles de radiación gamma (1, 5, 10, 20 y 25 kGy) sobre características organolépticas físicas y químicas y algunos parámetros de calidad del aceite esencial de frutos de *Azariadachta indica* A. Juss, extraído empleando la técnica de prensado al frío. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con seis repeticiones, y se comprobó la distribución y normalidad de los datos. Los niveles de irradiación evaluados estimularon variaciones en función de las dosis aplicadas, sin embargo, no modificaron significativamente ($p \geq 0,05$) ninguna de las variables contempladas en el estudio y las características organolépticas se mantuvieron invariables con respecto al control. Se comprueba la formación de otros compuestos utilizando cromatografía HPLC. Se concluye que los niveles de radiaciones establecidas no modifican significativamente las propiedades físicas y químicas del aceite esencial de *A. indica* y tampoco se forman moléculas más complejas que puedan alterar las propiedades del mencionado aceite.

Palabras clave: elementos radiolíticos, aceite esencial, neem, *Azariadachta indica*.

Abstract

The study evaluate different levels of gamma radiation (1, 5, 10, 20 and 25 kGy) on organoleptic characteristics and some quality parameters of the essential oil of fruits of *Azariadachta indica* A. Juss extracted using the technique cold pressing. Organoleptic, physical and chemical variables for the evaluation of the quality of the irradiated oil were considered. A completely randomized design with six replicates is applied. The distribution and normality of data were taken into account. The irradiance levels evaluated stimulated variations according to the doses applied. However, none of the variables contemplated in the study were modified significantly ($p \geq 0,05$) and the organoleptic characteristics remained unchanged with respect to the control. Nor did it stimulate the formation of more complex compounds according to the chromatogram developed on HPLC.

Keywords: radiolytical elements, essential oil, neem, *Azariadachta indica*.

Introducción

El árbol del neem es una planta de amplio espectro farmacológico [1], declarada en 2012 “Árbol del siglo”, por las potencialidades que presenta y que han sido aprovechadas en las ramas de la medicina veterinaria y agricultura [2]. Los principales compuestos que han sido aislados son: limonoides, triterpenos y tetranortriterpenoide [3]. Un ejemplo de ellos es la *azadirachtina*, que interfiere en la metamorfosis de las larvas de los insectos interrumpiendo su desarrollo [4]. Debashri y Tamal, refirieron que el aceite es utilizado en la preparación de cremas y geles corporales, como fungicida, repelente de insectos y hasta como espermicida [4].

Los aceites esenciales son mezclas complejas constituidas por hidrocarburos de la serie polimetilénica, del grupo mono y sesquiterpenos, junto a otros compuestos oxigenados, tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres y óxidos. Estos productos son utilizados frecuentemente como digestivos, expectorantes, diuréticos y antiinflamatorios. También tienen importantes aplicaciones en la industria de la perfumería y en la preparación de determinados tipos de alimentos y bebidas [5]. Poseen un uso destacado en la industria farmacéutica y constituye hoy en día una necesidad para lograr medicamentos alternativos, más efectivos y menos costosos, que pueden sustituir algunos de los fármacos sintéticos utilizados actualmente en esta industria, cuando sus potencialidades químicas se incrementan.

Una forma de incrementar el potencial químico de los productos naturales, es el uso de las radiaciones (α , β , γ y Rx). Estas posibilitan modificaciones moleculares en las que se forman compuestos más complejos y de mayor peso molecular, según Noriega *et al.* [6], que les atribuyen nuevas propiedades químicas y biológicas a los aceites y pueden ser usadas para incrementar la efectividad del proceso en el que se les destine [7].

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de diferentes niveles de radiación en las características organolépticas, físicas y químicas del aceite esencial del fruto del *Azadirachta indica*.

Materiales y métodos

Selección y procesamiento del material vegetal:

El material vegetal utilizado fue el neem (*Azadirachta indica* A. Juss), cultivado en los organopónicos de la Ciudad de Bayamo, provincia de Granma. Las muestras tomadas se

identificaron taxonómica en el Laboratorio de Botánica perteneciente al Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma, según la NRC 311 [9], donde se confirmó el género y la especie en cuestión.

Se seleccionaron los frutos (figura 1) y su colecta se realizó en horas de la mañana (8:00 - 9:00 am), en el mes de agosto, con una temperatura ambiente de 31 °C y una humedad relativa de 85 %, controladas con un psicrómetro de Hoffman, de procedencia alemana. Los frutos se acopiaron durante 30 días, y fueron sometidos a un secado de forma natural en el área de almacenamiento del Centro de Estudios de Química Aplicada, CEQA, de la Universidad de Granma, UDG.



Fig. 1. Fotografía del material vegetal empleado

Extracción del aceite esencial (AE) de los frutos de Azaridachta indica:

La extracción del aceite esencial se realizó utilizando la técnica “prensado al frío” [10], y el producto extraído se almacenó en frascos de color ámbar clase III, tapa de 18 de polietileno HD, a temperatura ambiente.

Procedimiento para realizar la Irradiación gamma del AE:

Las muestras se sometieron al proceso con la ayuda de un irradiador auto-, modelo “ISOGAMMA LL-Co”, de fabricación húngara (figura 2), con fuentes de Cobalto-60 (Co^{60}), ubicado en el Centro de Aplicaciones Tecnologías y Desarrollo Nuclear (CEADEN) de La Habana, Cuba [11].



Fig. 2. Irradiador autoblindado, modelo “ISOGAMMA LLCo”

Nota: foto tomada con autorización del Departamento de Radiobiología de CEADEN

El AE se colocó en ampulas de vidrio de 20 y 12 mL de capacidad respectivamente, selladas con parafina. Posteriormente fueron irradiadas a: 1, 5, 10, 20 y 25 kG durante 4 h. La energía de los cuantos de radiación gamma fue de 1,25 MeV y la tasa de dosis absorbida en el momento de la irradiación fue de 6,476 kGy.h⁻¹. El tiempo de exposición a las radiaciones se calculó utilizando el programa “CalipMMA” y el proceso de irradiación fue controlado empleando el sistema dosimétrico cérico-ceroso [12].

Las muestras irradiadas, de acuerdo con la dosis recibida, fueron identificadas como: B (1 kGy), C (5 kGy), D (10 kGy), E (20 kGy) y F (25 kGy), y fueron contempladas como tratamientos. Como control se utilizó una muestra de AE sin irradiar, denominada A.

Análisis sensorial, físico y químico del aceite esencial del *Azadirachta indica*

Olor y sabor:

Se mezclaron 3 gotas del AE con 5 mL de alcohol al 90 % v/v, agitándolo con 10 g de sacarosa en polvo.

Índice de refracción:

Se procedió, según lo establecido en la USP35 [13] y la Norma Cubana NC 90 [14], utilizando un refractómetro “ABBE WYA-2S” de fabricación China que se calibró a 22 °C, con precisión de $\pm 0,1$ ° Brix.

Densidad relativa:

Se determinó según lo establecido por la USP35, 2012 [15], mediante un micropicnómetro “BRAND WERTHEIM” de 0,382 mL, de precisión 0,1 ppmil de fabricación alemana. Para realizar las mediciones se mantuvo la temperatura en 20 °C, haciendo uso de un baño de hielo.

pH:

Este parámetro se determinó por el método potenciométrico, según las recomendaciones de la NC 90 [15]. Se empleó un pH-metro CRISON, modelo “GLP”, con electrodos Crison, modelo “ACT Probet pt 1000”, precisión $\pm 0,01$, de procedencia española.

Ésteres:

Se efectuó según las recomendaciones de la USP 35, 2012 [13]. Se calentó 1,0 mL del aceite esencial durante 2 min en un baño de agua (Precistern, Alemania), con 3,0 mL de

solución alcohólica de KOH 0,5 mol/L⁻¹ (Merck, Alemania). Luego se añaden 3,0 mL de cloroformo y se agita y se deja en reposo. La presencia de ésteres debe dar lugar a la formación de precipitados.

Solubilidad en alcohol:

Se tomó 1,0 mL del AE en una probeta “POBEL” clase A con escala de división de 0,1 mL, tapa esmerilada y una capacidad de 25 mL, calibrada a temperatura de 20 ± 0,2 °C. Se añadieron 20 mL de alcohol 96 % (Merck, Alemania) a intervalos de 0,1 mL con la ayuda de una bureta, luego se agitó continua y enérgicamente hasta la desaparición de opalescencias [14].

Determinación cuantitativa:

Se realizó por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), empleando un cromatógrafo de la firma “KONIK –TECH” de procedencia española, con bomba gradiente de 3 canales (560 Gradient Pump), detector de arreglo de fotodiodo (DAD 560) con *Fast Scan* de 16 longitudes de ondas (190 a 900 nm) y horno para cuatro columnas (Jet Stream), con regulación de 0 a 80 °C ± 1 °C. Los cromatogramas obtenidos se procesaron con el Software “Konikrom Plus”, versión 2.6.3.313., editado sobre plataforma “Clarity” 2005 de procedencia española.

El procedimiento cromatográfico se llevó a cabo usando una columna de acero inoxidable (250 L x 4,6 ID mm), empacada con relleno octilsilicagel (C8) para cromatografía y proceso de *end capped*, con partículas irregulares de 10 μm de diámetro promedio (ProntoSil C8), de la firma KNUER de procedencia alemana.

La fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de 70 volúmenes de acetronitrilo (AcN) y 30 de agua con caudal a 1,5 mL.min⁻¹ y detección a una longitud de onda de 230 nm (λ = 230 nm). Como material de referencia química (MRQ) se utilizó un estándar interno de trabajo de procedencia nacional, caracterizado en el Laboratorio de Líquidos Orales de Bayamo, con código MR-15036.

Diseño experimental:

Se tomaron cinco muestras y se expusieron a diferentes niveles de radiación Gamma (1 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 20 kGy y 25 kGy) como fuentes de variación y como variable de respuesta las concentraciones del marcador biológico (azaradictina). Como control

se utilizó una muestra de aceite sin irradiar, distribuidos en un diseño completamente aleatorizado, mediante el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu_i + ER_j + e_{ij} \quad (1)$$

donde:

Y_{ij} = variable respuesta

μ = constante común para todas las observaciones

ER_j = Efecto del i-ésimo nivel exposición a radiación Gamma

E_{ij} = Error aleatorio $\sim N(0, \sigma^2 e)$.

Procesamiento estadístico

La distribución normal de los datos se determinó según los criterios de Shapiro-Wilks y la homocedasticidad a través de la prueba de Levene. Se aplicó como criterio de aceptación, desviaciones relativas que fueran $\leq 1,5$ % para resultados obtenidos por métodos cromatográficos, establecido como aceptable en la Resolución 40/2014 del Centro Estatal para el Control de Medicamentos y Dispositivos Médicos (CECMED) [15, 16]. Se aplicó análisis de varianza a algunas variables relacionadas con la calidad del aceite (Índice de refracción, densidad relativa y pH) y a la determinación de la concentración de ingrediente farmacéutico activo. Las medias se compararon mediante la mínima significativa de Fisher. Se utilizó el paquete STAGRAPHICS Centurion XV.II versión 15.02.6 (2014) [17].

Resultados y discusión

El aceite extraído se evaluó organolépticamente y se observó que mantiene un color marrón más o menos oscuro, y su sabor es amargo, con un olor fuerte que asemeja el del [cacahuete](#) y el [ajo](#) pardo, descripción que coincide con la realizada por el CECMED [16].

La solubilidad en 20 mL de etanol (figura 3) mostró opalescencia y coincidió con el señalamiento de Finar en el 1985 [18]. Sin embargo, no coinciden con los reportes de Martínez *et al.* en el 2016 [19], quienes evaluaron el aceite del neem de diferentes localidades de Venezuela y obtuvieron, utilizando métodos espectrofotométricos, picos de absorción a los 470 nm que se corresponden con el color amarillo, según lo reportado para el método colorimétrico de LOVIBOND (COVENIN, 0325) [20].

Esto puede estar dado por la presencia de pigmentos en el aceite esencial debido al método de extracción utilizado por Martínez *et al.* [19].

Los promedios obtenidos (figura 3) estuvieron cercanos a 1,457 0, expuesto por Finar [18] como el valor promedio más repetido en los análisis de esta variable en AE y oscilaron en el rango de 1,473 2 – 1,473 6 referidos por Gé [21] como aceptables para aceites esenciales, las medias no alcanzaron la significación.

Martínez *et al.* [19] definió diferentes rangos para varios tipos de aceites de diferentes orígenes que oscilaron entre 1,440 – 1,477 0, estos autores señalaron índice de refracción superior de forma ascendente se relaciona con las características de los constituyentes y la forma en que se extraen los AE, actividad que determina su grado de pureza.

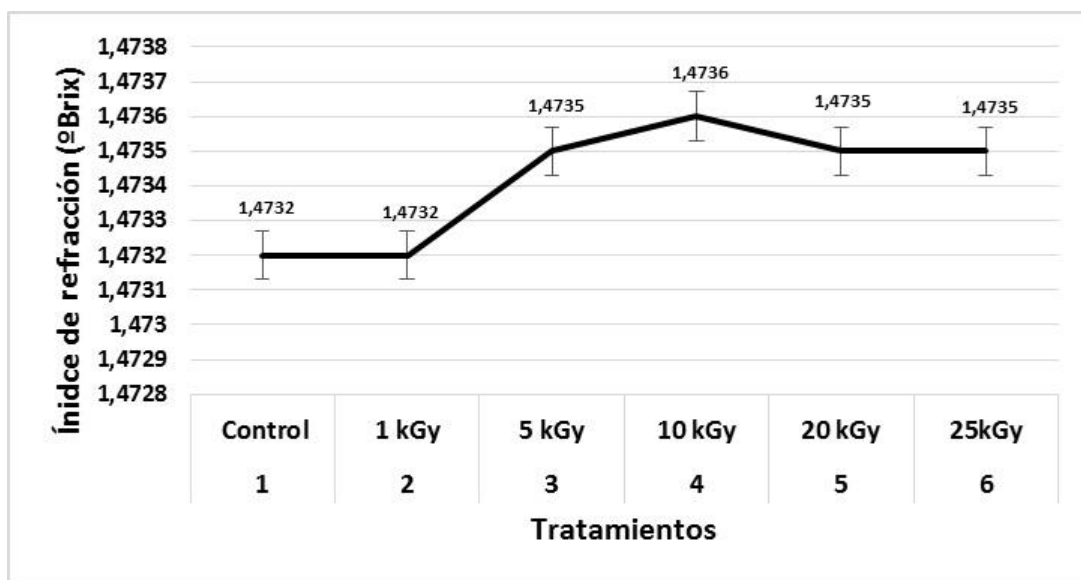


Fig. 3. Efecto de la radiación gamma sobre el índice de refracción del AE del *Azaridactha indica*

El comportamiento que se ilustra en la figura 3, coincide con el precisado por Gé [21] en el AE de *E. pellita* F. Muell, empleando la radiación gamma. Según Martínez *et al.* [19] las oscilaciones en los índices de refracción se condicionan por cambios estructurales en los componentes del AE por el efecto de la irradiación gamma. Sin embargo, en la presente investigación no se muestran cambios significativos en el componente activo principal (azaridactina). Noriega *et al.* [6] en aceite esencial, provenientes de hojas de *Piper pubinervulum* y Martínez *et al.* [20] en algunos aceites vegetales comerciales, obtuvieron valores superiores a los referidos en este estudio, influidos seguramente por las diferencias climáticas regionales y las técnicas de extracción utilizadas. Campo *et al.* [22], evaluaron el efecto que guarda la radiación con el nivel de pureza del aceite y su

calidad. Martínez *et al.* [19] refirió que esta variable se altera cuando existen indicios de oxidación del aceite, adjudicado en este caso al efecto de la radiación.

Por otra parte, el efecto de la radiación en la densidad relativa (figura 4), aunque el comportamiento en función de los niveles de radiación fue variable, tampoco las medias de este parámetro fueron significativas.

El nivel de radiación que más incrementó la densidad relativa fue el de 20 kGy, lo que no coincide con lo expuesto por Ramírez *et al.* [23]. Estos autores refirieron que los cambios que observaron con bajas dosis de irradiación, fueron los que dieron lugar a la aparición del efecto estimulante, sin embargo, guarda relación con el efecto no significativo del índice de refracción. En este sentido García [24] refirió que la variable en análisis, está definida por alteraciones o variaciones en la concentración del líquido, lo que significa que la radiación no estimuló la formación de moléculas más complejas en el aceite esencial que incidiera en su densidad.

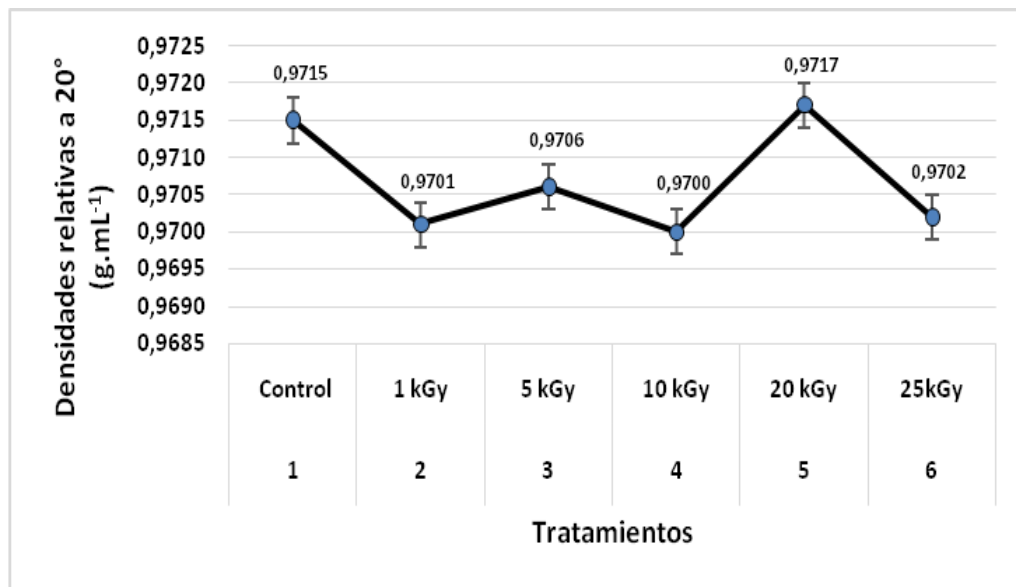


Fig. 4. Efecto de la radiación gamma sobre la densidad relativa del AE

Sin embargo, Gé [21] relaciona el incremento de la densidad relativa con la formación de nuevos compuestos sesquiterpénicos en el aceite esencial de *E. pellita*, cuando observó el mayor pico en la dosis de 25 kGy, efecto que no coincidió con lo obtenido en el presente ensayo. Este autor asoció la formación de moléculas más complejas, a la riqueza en terpenos que posee este aceite esencial, efecto que pudo propiciar la síntesis de moléculas más complejas, criterio que en este trabajo no se puede asegurar, ya que no se desarrollaron estudios que justifiquen la presencia de este tipo de compuestos.

Los promedios que se obtuvieron superaron los señalados por Finar [19], Gé [21] en *AE* de *Eucalipto pellita* F. Muell. Estos autores obtuvieron valores inferiores y comportamiento diferente en función de las dosis utilizadas. Las diferencias pueden estar dadas por los orígenes de los aceites (*E. pellita* Vs *A. indica*) y como resultado de ello de sus constituyentes.

En otro orden, el pH se mantuvo en un rango entre 4,12 - 4,14 para las muestras irradiadas y 4,24 para el control, sin ser significativa la diferencia obtenida. Los resultados pueden observarse en la figura 5.

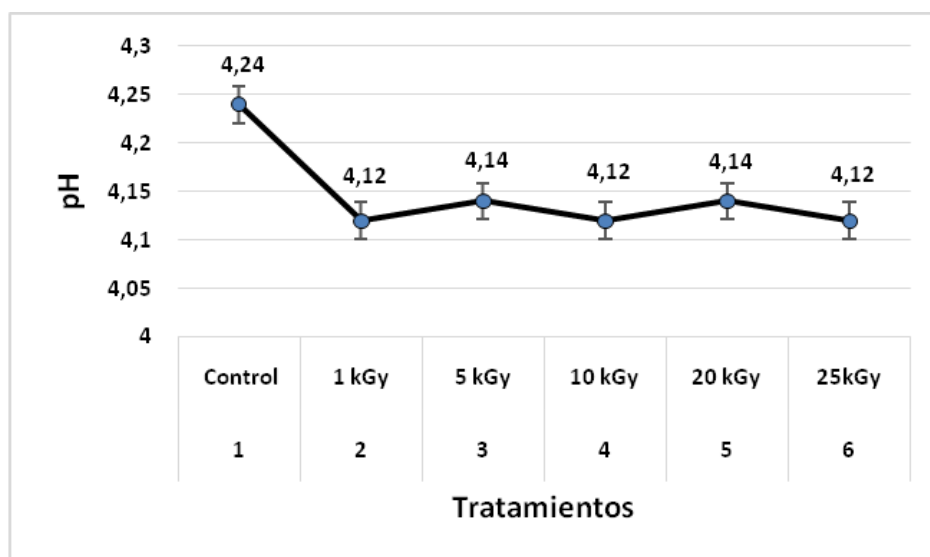


Fig. 5. Efecto de la radiación gamma sobre el pH del *AE*

Según Calcines [25], esta variabilidad y disminución del pH se debe al incremento de la acidez por la protonación intramolecular de algunos productos activos presentes en su composición química, estimulado por el efecto de la luz irradiante. Esto demuestra que la radiación gamma tiene un efecto significativo en las propiedades ácidas del *AE* de *A. indica*.

Cuando se determinó la presencia de ésteres, se evidenció la precipitación de acuerdo a lo descrito por la United States Pharmacopeia (USP, 2012) [26]. Según Wade [27], la hidrólisis, ya sea ácida o básica, ocurre por ruptura del enlace de tipo éster ($R-COOR$), dando lugar a la formación de ácidos y alcoholes correspondientes o sales en el caso de hidrólisis básica.

Los alcoholes pueden reaccionar con el exceso de hidróxido de potasio, dando lugar a la formación alcoholatos de potasio que son alcoholóxidos metálicos. Tanto las sales como

los alcohóidos de metales alcalinos, son solubles en agua por su marcado carácter de solubilidad y disociación iónica fuerte, pero prácticamente insoluble en solventes apolares [27].

En otro orden, las concentraciones del ingrediente farmacéutico activo que se obtuvo para cada muestra del AE irradiado, no mostraron diferencias significativas (tabla 1), lo que sugiere que las dosis evaluadas no estimularon el incremento de la variable en cuestión.

TABLA 1. CONCENTRACIÓN DE INGREDIENTE FARMACÉUTICO ACTIVO (IFA) DE AE EN DIFERENTES DOSIS DE IRRADIACIÓN

Tratamientos (kGy)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	$\pm\text{DE}$	CV (%)	EE
Control	1.022	0.002	0.23	0.014
1	1.021	0.002	0.24	
5	1.024	0.002	0.25	
10	1.024	0.004	0.41	
20	1.023	0.003	0.31	
25	1.024	0.001	0.17	

$\mu\text{g.mL}^{-1}$: Microgramos por mililitros; DE: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; EE: Error estándar

Efecto que contradice el señalamiento de Ramírez [23] y Gé [21], quienes aseveran que en la medida que se incrementa la dosis de radiación, más probabilidades existen en la formación de compuestos sesquiterpénicos por la estimulación molecular.

Con el resultado del cromatograma (figura 6), se demostró que la composición química del AE al ser irradiado no varía las áreas de los picos principales.

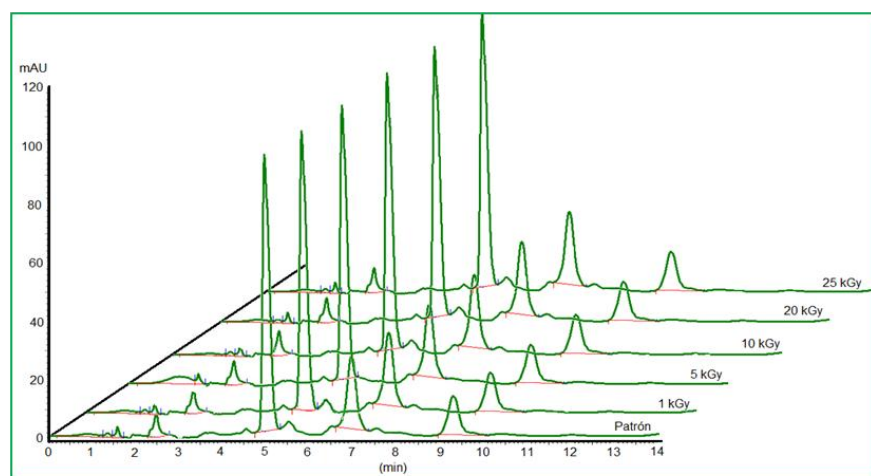


Fig. 6. Cromatografía por HPLC del aceite esencial patrón y los irradiados del *Azardactha indica*

Conclusiones

Se comprobó que el parámetro de mayor afectación por el efecto de la radiación fue el índice de acidez o pH, el resto de los parámetros no variaron significativamente. Se recomienda no utilizar radiaciones Gamma inferiores a 25 kGy si se persigue incrementar la calidad del aceite.

Referencias bibliográficas

1. GAJMER, T.; SINGH, R.; SAINI, R. K.; KALIDHAR, S. B. "Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and bakain (*Melia azedarach* L.) seeds on oviposition and egg hatching of *Earias vittella* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae)". *J. Appl. Entomol.* 2002, **126** (5): 238-243. ISSN 0931-2048.
2. GARCÍA, C.; GÓMEZ, L. L.; LÓPEZ, E. C.; LEÓN, A. "Insecticidas biorracionales para el control de mosquitos y moscas negras en Sinaloa". *Rev. Ra Ximhai.* 2012, **8** (3), 47-55. ISSN: 1665-0441.
3. LÓPEZ, P. Y.; ANGULO E. M.; MARTÍNEZ, R. C.; SOTO, B. J.; CHAIDEZ, Q. C. "Efecto antimicrobiano de extractos crudos de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22". *Rev. Bioquímica.* 2007, **32** (4), 117-125. ISSN 0185-575.1
4. DEBASHRI, M.; TAMAL, M. A "Review on efficacy of *Azadirachta indica* A. Juss based biopesticides: An Indian perspective". *Research Journal of Recent Sciences.* 2012, **1** (3), 94-99. ISSN 2277-2502.
5. WANDSCHEER, C. B. *et al.* "Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarp of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*". *Toxicon.* 2012, **44**, 829-835. ISSN: 0041-0101.
6. NORIEGA, F. P. *et al.* "Composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial proveniente de las hojas de *Piper pubinervulum* C. D C". *Piperacia.* 2016, **24** (2), 111-123. ISSN: 1390-3799.
7. VARGAS, J.; VIVANCO, M.; CASTRO, E. "Efecto de la radiación en las características microbiológicas, físicas y químicas y evaluación sensorial de la Curcuma (*Curcuma longa*)". *Informe Científico Tecnológico.* 2014, **12**, 37-39. ISSN 1684-1662.

8. NRC 311:1998 (Norma Ramal de Salud Pública 311) Medicamentos de origen vegetal: extractos fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos. La Habana, Cuba, 1998.
9. ARIAS, D. *et al.* “Determinación del Azadiractina de los aceites esenciales del árbol de Neem (*Azadirachta Indica*)”. *Revista Ingeniería UC*. 2009, **16** (3), 22-26. ISSN 1316-6832.
10. MARTÍNEZ, M.; PARRA, J.; VERA, M. A.; VERA, A. “Parámetros de calidad del Aceite de las semillas de *Azadirachta indica* (neem)”. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 2016, **47**, 70-74. ISSN 1015-8553.
11. LÓPEZ FORTEZA, Y. *et al.* “Experiencia en Cuba en el licenciamiento durante la importación, puesta en servicio y operación de un irradiador isogamma Ilco. Braz”. *J. Rad. Sci.* 2013, **02-3A**, 16-31. ISSN: 2319-0612.
12. PRIETO MIRANDA, E. F. El Sistema dosimétrico sulfato cerico (cerico-ceroso). Desarrollo y aplicación en Cuba. 2018. Informe de proyecto. Comisión de Energía Atómica en Cuba. P-5. Disponible en: https://www.ipen.br/biblioteca/cd/inac/1997/ENAN/E01_070.PDF
13. UNITED STATES PHARMACOPEIA 35 (USP), National Formulary 30. Rockville, Md., USA. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2012.
14. NC 90-13-13 Aseguramiento metrológico. Medidores de pH. Reglas generales para efectuar mediciones de pH. La Habana, Cuba.
15. CECMED. Cuba. Ámbito Regulador No. 00 – 215. Resolución No. 40/2014. Anexo No. Manual de las Buenas Prácticas para Laboratorio de Control de Medicamentos. Validación de métodos analíticos. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. 2014. Edición Ordinaria. ISSN 1684-1832.
16. CECMED. Cuba. Regulación 37. Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos, Ministerio de Salud Pública. 2004
17. STATGRAPHICS, 2014. Statgraphics Centurion XV.II versión 15.02.6 StatPoint, Inc.
18. FINAR, I. L. “Principios Fundamentales”. En: *Química Orgánica* (R. Pérez, A. Ossorio, eds.), I, Edición Revolucionaria: La Habana. Ed. Revolución, 36-53, 1985.

19. MARTÍNEZ, M.; PARRA, J.; VERA, A. M; VERA, A. “Parámetros de calidad del Aceite de las Semillas de *Azadirachta indica* (neem)”. *Rev. CENIC Ciencias Químicas*. 2016, **47**, 70-74. ISSN 1015-8553.
20. COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales) 0325-2001 para aceites y grasas vegetales comestibles. Determinación de la acidez libre. Fondonorma, 25 de julio 2001. 325: 1-3. Disponible en: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/325-01.pdf> [Consultado: 15 de enero 2016].
21. GÉ, Y. *Efecto de la radiación gamma en la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de Eucalyptus pellita* F. Muell. Tesis de maestría, Universidad de Granma, Cuba, 2011.
22. CAMPO, M. *et al.* “Análisis farmacognóstico preliminar de las semillas de *Moringa oleifera* Lam cosechadas en Cuba”. *Revista Cubana de Farmacia*. 2015, **49** (2), 360-374. ISSN 0034-7515.
23. RAMÍREZ, R. *et al.* “Estudio bioquímico-molecular de la estabilidad genética en plantas de tomate procedentes de semillas tratadas con bajas dosis de rayos X”. *Cultivos Tropicales*. 2008, **29** (3), 39-46. ISSN 1819-4087.
24. GARCÍA, M. A.; CASARIEGO, A.; DÍAZ, R.; GONZÁLEZ, Y.; FERNÁNDEZ, M. “Effects of chitosan coatings on the lipid oxidation of mackerel fillets during its accelerated storage”. En: IKRAM, S.; AHMED, S. (Eds). *Natural Polymers: Their Derivatives, Blends and Composites*. USA: Nova Science Publisher. 2016, vol.1, pp. 197-208. ISBN 978-1-63485-831-1.
25. CALCINES, N D. *Los aceites esenciales*. Universidad de La Habana: Ed. MES, 1986.
26. ISBN: 9789502495293
27. UNITED STATES PHARMACOPEIA 35, National Formulary 30. Rockville, Md., USA. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2012.
28. WADE, J. R. L.G. *Química Orgánica*. 5^{ta} Ed. Madrid: Pearson Educación, S.A., 2004. ISBN 13: 978-84-205-4102-0.