

Universidad de Ciencias Médicas
Centro de estudio de Química Aplicada. Granma. Cuba

Determinación de parámetros químico- físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de *Melia azedarach* L (Pursiana)

Determination of parameters chemist - physical of the dyes to 20 obtained% of the leaves, shafts and fruits of *Melia azedarach* L (Pursiana)

Aída de los Ángeles Bermejo de Zaa,^I Sonia Pereira Cabrera,^{II} Mirta Luisa Cintra Jorge,^{III} Galina Morales Torres^{IV}

^I Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Hospital Pediátrico Docente General Milanés. Bayamo. Granma. Cuba. e.mail: aida71@grannet.grm.sld.cu

^{II} Licenciada en Química. MsC en Química Biológica. Profesora Auxiliar. Centro de Estudio de Química Aplicada. Universidad de Granma. Cuba. e.mail: spereirac@udg.co.cu

^{III} Licenciada en Biología. Asistente. Universidad de Ciencias Médicas. Celia Sánchez Manduley. Bayamo. Granma. Cuba.

^{IV} Doctora en Ciencias Químicas. Profesora Titular. Centro de Estudio de Química Aplicada. Universidad de Granma. Facultad de Ciencias Técnicas. Cuba. e.mail: gmorelest@udg.co.cu

RESUMEN

Introducción: la Pursiana (*Melia azedarach* L) es utilizada por la población como planta medicinal para el tratamiento del reumatismo, antiparasitaria, antiséptico y antibacterianas, entre otros usos.

Objetivo: evaluar parámetros químicos físicos de las tinturas a 20% de las partes de la planta en estudio.

Material y Métodos: las tinturas a 20 % de las partes de la planta en estudio se prepararon por tres métodos: la extracción asistida por ultrasonido (EAUS),

percolación y maceración, utilizando como menstruo una solución hidroetanólica. A estas tinturas se les realizó el tamizaje fitoquímico y para la caracterización se aplicaron los ensayos descritos en la Norma Ramal del Ministerio de Salud Pública.

Resultados: se comprobó la alta diversidad de metabolitos secundarios en las tinturas estudiadas. Los indicadores de calidad se ubicaron dentro de los rangos establecidos para drogas vegetales, se demostró que la extracción asistida por ultrasonido es la ideal.

Conclusiones: las tinturas a 20% de las hojas tallo y fruto de la pursiana presentan diversidad de metabolitos secundarios y el producto es estable después de 6 meses en función de los valores obtenidos de los indicadores de calidad.

Palabras clave: *Melia azedarach L*, estudio fitoquímico, parámetros químico-físicos.

ABSTRACT

Introduction: the Pursiana (*Melia azedarach L*) is used by the population like medicinal plant for the treatment of rheumatism, as antiparasitary, antiseptic and antibacterial, among other uses.

Objective: to evaluate of physical chemical parameters of the dyes to 20% of the parts of the plant in study.

Material and methods: the dyes to 20% of the parts of the plant in study got ready for three methods: the extraction attended by ultrasound (EAUS), percolation and maceration, using as menses a hydroethanolic solution. To these dyes they are carried out the photochemical screening and for the characterization the were applied described rehearsals in the Norma Branch of the Ministry of Public Health.

Results: he/she was proven the high diversity of secondary metabolites in the studied dyes. The indicators of quality were located inside the established ranges for vegetable drugs, it was demonstrated that the extraction attended by ultrasound is the ideal.

Conclusions: the dyes to 20% of the leaves shaft and fruit of the Pursiana present diversity of secondary metabolites and the product is stable after 6 months in function of the obtained values of the indicators of quality.

Key words: *Melia Azedarach L*, phytochemical study, chemical parameter-physicals.

INTRODUCCIÓN

El uso de remedios de origen vegetal se remonta a la época prehistórica; es una de las formas más extendidas de la Medicina, presente virtualmente en todas las culturas conocidas. La industria farmacéutica actual se ha basado en los conocimientos tradicionales para la síntesis y elaboración de fármacos, y el proceso de verificación científica de estas tradiciones continúa hoy, descubriéndose constantemente nuevas aplicaciones.^{1,2,3}

El empleo de plantas para fines terapéuticos ha estado siempre presente en la vida del Hombre, y mantiene aún una amplia validez a pesar del poderío y la

competencia de la química farmacéutica, basada fundamentalmente en principios activos de síntesis.⁴

La importancia de los productos naturales en Medicina se basa no solamente en sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos, sino en la posibilidad que ofrecen para poder desarrollar a partir de sus estructuras nuevas drogas.⁵

OBJETIVO

Para el desarrollo de esta rama, es necesario descubrir nuevas propiedades de las plantas, dentro de las que se encuentra la familia **Meliaceae**, que puede ser una alternativa para combatir enfermedades dermatológicas que abundan en la población y que han sido empleadas pero no demostradas sus propiedades científicamente, por estas razones este trabajo tiene como evaluar parámetros químico-físicos de las tinturas a 20% de las partes de la planta en estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal se recolectó al azar en el mes de mayo a las 9:30 am, en el período óptimo y estuvo constituido por hojas, frutos y tallo de la planta en estudio *Melia azedarach L*, planta cultivada en los terrenos del reparto Galindo, municipio de Bayamo, Provincia Granma y fue identificada por el Dr. Luis Catasús Guerra en el Jardín Botánico Cupaynicú de Guisa en la Provincia Granma, con número de serie 3005.

El material fue lavado y desinfectado con una solución de hipoclorito de sodio a 2%, los frutos se emplearon de forma natural, las hojas y tallos se secaron a la sombra a temperatura ambiente extendiéndose en bandejas perforadas, volteándose diariamente durante 7 días, luego se sometió a temperatura de 60°C durante 1h en estufa (MWN, Alemana) con circulación de aire. Seguidamente se procedió a la pulverización, usando un molino de cuchilla. Se obtuvo un polvo grueso que fue utilizado en la elaboración de las tinturas. Para ello se utilizaron tres métodos de extracción, después de realizada la extracción y lograda la homogeneidad y transparencia de las tinturas se almacenaron en frascos de color ámbar para evitar la descomposición de los compuestos activos por acción de la luz, partiendo de que muchas sustancias activas extraídas de las plantas son fotosensibles. Las muestras permanecieron en reposo por 3 días en refrigeración a 8 °C y luego se sometieron a los análisis de calidad y tamizaje fitoquímico.

Las tinturas a 20% obtenidas se rotoevaporaron con el objetivo de eliminar el solvente a baja presión (rotoevaporador KIKA, Alemania).

Rendimiento

Se toman 25 de las tinturas obtenidas por ambos métodos y se secan a 40°C, empleando un rotoevaporador (KIKA-Werke, Alemán) hasta obtener una masa

consistente; el rendimiento se calcula como la razón de la masa obtenida en mg dividido entre la masa de muestra seca y multiplicado por cien.

Eficiencia

Se calculó como la razón del rendimiento (extracto seco de la tintura /droga vegetal utilizada para la preparación de la tintura) y el tiempo necesario para alcanzar esa extracción.

Formulaciones

Tinturas a 20%

Las tinturas fueron obtenidas a partir del material vegetal, utilizando como menstruo alcohol a 70%. Para ello fueron empleados 3 métodos de extracción.

Percolación

Se pesaron 5g de la droga cruda en balanza técnica (Sartorius, BS2202S, China) para obtener 25 mL de tintura a 20 %, utilizando un equipo lixivador o percolador que retiene la droga humedecida en capas, añadimos el menstruo utilizando un volumen hasta que tapara la droga y la supere en 0,5 cm. de altura, por un tiempo de 24 horas.⁶

Maceración

Se pesaron 5 g de la droga cruda en balanza técnica (BS 2202S SARTORIUS, Alemania) para obtener 25 ml de tintura a 20%, por 7 días,⁶ empleando agitador mecánico o saranda (ILM tipo THYS 2, Alemania).

Ultrasonido

El equipo utilizado fue un baño de ultrasonido (SB-3200DT, China), que trabaja con frecuencia 40kHz y potencia de 180V. Se pesaron 5g de la droga cruda en balanza técnica (BS 2202S SARTORIUS, Alemania) para obtener 25 ml de tintura a 20%, por 2 horas, empleando baño ultrasónico (SB-120DT, China).⁷

Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Centro de Estudio de Química Aplicada (CEQA) de la Universidad de Granma por la

metodología reportada por Payo, Sandoval y Peña,^{8,9} para el extracto etanólico, empleándose pruebas o técnicas simples, rápidas y selectivas para la determinación de los diferentes metabolitos secundarios.

Extracto etanólico

- Ensayo de Liebermann- Burchard (triterpenos y/o esteroides)
- Ensayo de Espuma (saponinas)
- Ensayo de Nihidrina (aminoácidos libres)
- Ensayo de Dragendorff y Mayer (alcaloides)
- Ensayo de Baljet (coumarinas)
- Ensayo de Fehling (carbohidratos reductores)
- Ensayo de Cloruro férrico (fenoles y/o taninos)
- Ensayo de Borntrager (quinonas)
- Ensayo de Shinoda (flavonoides)
- Ensayo de Antocianidinas

Descripción de los ensayos a realizar con los diferentes extractos: Ensayo de Dragendorff

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1ml de HCl (1%). Si el extracto es acuoso a la alícuota se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado, se calienta suavemente y se deja enfriar hasta acidez. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Si hay opalescencia se considera positivo (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++).

Ensayo de Mayer

Permite también identificar alcaloides se procede de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Se añade una pizca de NaCl en polvo, se agita y filtra. Se añaden 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++) , precipitado coposo (+++).

Observación: En el caso de alcaloides cuaternarios y/o aminoóxidos libres, estos solo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) o (+++) en todos los casos, ya que un resultado (+) puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

Ensayo de Wagner

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los ensayos de la misma forma.

Ensayo de Baljet

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1ml). En estas condiciones se adiciona 1ml de reactivo, considerándose la aparición de una coloración (+) y un precipitado (++).

Ensayo de Borntrager

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1ml de cloroformo. Se adiciona 1ml de NaOH, KOH o NH₄OH a 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo (+), coloración rosada (++) , coloración roja (+++).

Ensayo de Liebermann- Burchard

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, ya que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1ml de cloroformo. Se adiciona 1ml de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo se dejan correr 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio de coloración:

1. Rosado- azul, muy rápido.
2. Verde intenso, visible aunque rápido.
3. Verde oscuro- negro, final de la reacción.

A veces, el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos. Esta reacción también se emplea para diferenciar las estructuras esteroidales de las triterpénicas, las primeras producen coloraciones que van desde azul a azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

Observación: Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción, ya que con el ácido sulfúrico puede reaccionar de forma violenta.

Ensayo de Fehling

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 ml de agua. Se adicionan 2 ml del

reactivo (recién preparado) y se calienta en baño de agua de 5-10 min. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo.

Ensayo de Espuma

Permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénicas. De modo que si la alícuota se encuentra en etanol, se diluye en 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 min. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y persiste por más de 2 min.

Ensayo de Cloruro Férrico

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. Si el extracto de la planta se realiza con etanol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos; a una alícuota del extracto etanólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico a 5% en solución salina fisiológica. Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos; a una alícuota del mismo se le añade acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de la solución reactiva. Un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo_vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

Ensayo de Ninhidrina

Permite reconocer la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2ml de la solución de ninhidrina a 2%. La mezcla se calienta durante 10 min. en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color violáceo.

Ensayo de Shinoda

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en etanol, se diluye con 1ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálica. Después de la reacción se esperan 5 min., se añade 1ml de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que las mismas se separen. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

Ensayo de Antocianidinas

Permite identificar en los extractos la presencia de estas estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides. Se calientan 2ml del extracto en etanol durante 10 min. con 1ml de ácido clorhídrico concentrado. Se deja enfriar y se adiciona 1ml de agua y 2ml de alcohol amílico. Se agita y se espera a que las dos

fases se separen. La aparición de un color rojo a marrón en la fase amilica es indicativa de un ensayo positivo.

Determinación de los requisitos de calidad de las tintura a 20%

La determinación de los requisitos de calidad se llevó a cabo mediante la aplicación de los métodos de ensayos descritos en las normas.^{10,11} Los ensayos se realizaron por triplicado y se determinó el valor promedio para cada uno.

- Determinación de pH: Se efectuó según el procedimiento descrito en la NC 90-13-13¹² con pHmetro(HANNA 211, Portugal).
- Determinación del índice de refracción.¹³ Se realizó con refractómetro (ABBE WYA-2S, China).
- Determinación de la densidad relativa.¹⁴ Se realizó por el método descrito en la NC26-63.
- Determinación de sólidos totales.¹² Se efectuó según el procedimiento descrito en la NC 92-02.

Determinación de los requisitos organolépticos

a) Determinación del olor: Se toma una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de anchura por 10 cm de longitud y se introduce un extremo en la muestra de ensayos. Se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.

b) Determinación del color: Se toma un tubo para ensayos bien limpio y seco, se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayos y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas. Se informa el resultado.

RESULTADOS

A las tinturas a 20 % obtenidas por los tres métodos se les realizó el tamizaje fitoquímico y se determinó el rendimiento y la eficiencia cuyos resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados del tamizaje fitoquímico, rendimiento y eficiencia de los diferentes métodos de preparación de tinturas a 20% de las tallos, frutos y hojas de la prusiana

Ensayo	Percolación			Maceración			Ultrasonido		
	T	H	F	T	H	F	T	H	F
Rendimiento %	8,2	8,4	8,3	10,5	9,5	9,7	11,4	12,3	11,2
Tiempo Horas	24	24	24	168	168	168	2	2	2
Eficiencia (% / h)	0,34	0,35	0,34	0,06	0,05	0,05	5,7	6,15	5,6
Rendimiento %	8,2	8,4	8,3	10,5	9,5	9,7	11,4	12,3	11,2

Legenda: T: tallos, F: frutos y H: hojas. Ausencia (-) Presencia (+) Abundancia (++)

La determinación de los requisitos de calidad se realizó por triplicado y se determinó el valor promedio para cada uno, los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Control de calidad de las tinturas al 20%

Parámetros	Percolación			Maceración			Ultrasonido		
	T	H	F	T	H	F	T	H	F
Índice de refracción	1,361	1,370	1,365	1,363	1,364	1,369	1,362	1,368	1,367
pH	5,92	6,08	5,39	5,96	6,36	5,44	5,92	6,29	5,41
Densidad g/mL	0,893	0,908	0,893	0,898	0,898	0,901	0,896	0,901	0,899
Sólidos totales %	2,05	6,05	2,88	2,22	1,95	4,96	3,55	3,12	4,88

Leyenda: pH: índice de acidez de la tintura; nD25: índice de refracción a 25°C; St: sólidos totales (%); pr25: densidad relativa a 25°C (g/mL); H: hojas; F; flores; (T) tallos.

Tabla 3. Parámetros de calidad de las tinturas a 20% a los seis meses.

Parámetros	Percolación			Maceración			Ultrasonido		
	T	H	F	T	H	F	T	H	F
Índice de refracción	1,358	1,368	1,361	1,361	1,364	1,365	1,382	1,368	1,367
pH	5,92	6,05	5,39	5,70	6,36	5,43	5,96	6,32	5,50
Densidad g/mL	0,893	0,908	0,893	0,902	0,898	0,906	0,900	0,903	0,900
Sólidos totales %	1,05	6,05	1,88	2,22	1,76	4,58	3,60	3,17	4,93

Leyenda: pH: índice de acidez de la tintura; nD25: índice de refracción a 25°C; St: sólidos totales; pr25: densidad relativa a 25°C; H: hojas; F; flores; (T) tallos.

DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se muestran los resultados de los diferentes métodos de extracción para obtener tinturas a 20 %, se puede observar que la composición de metabolitos secundarios se mantiene similar para uno u otro método, a pesar de que en el ultrasonido se observan para las hojas la mayor presencia de los metabolitos; esta variabilidad de compuestos es lo que puede justificar el uso por la población para curar diferentes tipos de enfermedades y padecimientos. Por ello es necesario realizar otros estudios que puedan evidenciar sus propiedades biológicas.

Es importante resaltar que los resultados obtenidos para los métodos utilizados se mantienen bastante estables, además al calcular el rendimiento se evidencia un ligero incremento para las hojas (12,3%), para tallos (11,4 %) y el fruto (11,2%) en comparación con los métodos tradicionales de maceración y percolación.

El método de EAUS nos aporta ventajas en cuanto al tiempo para desarrollar el proceso, ya que en solo 2 horas se obtiene la tintura con mayores rendimientos y composición fitoquímica muy similar a la obtenida por los métodos tradicionales de

maceración y percolación; también hay que evaluar su bajo costo y la posibilidad de extracción a bajas temperaturas lo que facilita el trabajo en los laboratorios con productos naturales. Resultados similares fueron obtenidos por Arzuola, Vargas en el 2007.¹⁵⁻¹⁷

En la Tabla 2, se muestran los resultados de la determinación de los parámetros de calidad de las tinturas a 20% de las hojas, tallos y frutos de la pursiana, los cuales están en los rangos de calidad que establecen las normas para el uso de las formulaciones, tienen un valor de sólidos totales aceptable para cada método. La densidad está por encima de 0.80 g/mL y el pH es ligeramente ácido, lo que existe cierto balance entre las cantidades de compuestos ácidos y básicos, o que la mayoría de estos poseen un comportamiento neutral, lo que provoca una reducción de la catálisis ácida o básica que, habitualmente, es la principal causa de la degradación hidrolítica de los principios activos, hecho este que unido al medio alcohólico permite su estabilización y conservación por tiempo largo. Esto constituye una garantía de la calidad y seguridad del producto, con vistas a someterlo a investigaciones dirigidas a la comprobación de sus propiedades biológicas.

En la Tabla 3, se muestran los resultados obtenidos de las muestras después de 6 meses de su elaboración, las cuales se manifiestan con carácter semejante a los datos obtenidos recién elaboradas, existe similitud en cuanto a los valores que se señalan por lo que es lógico considerar que la composición y calidad de las tinturas a 20 % no han experimentado cambios relevantes en este periodo de tiempo por lo que se cuenta con un producto que presenta un grado de estabilidad que es muy importante para su uso como formulación farmacéutica.

En la Tabla 4, aparecen las características organolépticas de las tinturas por los diferentes métodos, las mismas se relacionan con las características del producto extraído, a los 6 meses se repiten las determinaciones de los requisitos organolépticos y mantienen las características iniciales, por lo que se aprecia tendencia a la estabilidad de las tinturas según sus propiedades organolépticas.

CONCLUSIONES

Los valores de los parámetros químicos físicos determinados a las tinturas a 20 % de las hojas, frutos y tallos de la *Melia Azedarach L* se encuentran dentro de los rangos que establecen las normas cubanas para las formulaciones, además a los 6 meses estos parámetros continúan dentro de los rangos establecidos lo que indica que estas tinturas son estables lo cual constituye una garantía para su empleo terapéutico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PASSE. Medicina Tradicional Andina y Plantas Curativas. Ministerio de Salud- Programa de apoyo al Sector Salud en el Ecuador - Gobierno del Ecuador - Unión Europea. Septiembre de 2008. 554p.
2. MINSAP. Plantas Medicinales. FITOMED II. La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 1993. 117p.

3. Peña A, Torres E. Monografía de Productos Naturales. Granma: Universidad de Granma; 2006, p.2-6.
4. Abreu J. Plantas Medicinales. Universidad para todos. La Habana: Editorial Abril; 2004. 31p.
5. Jawetz, E. Microbiología Médica, México: Ed. El manual moderno S.A.; 2000; 27,119,182-185.
6. Cuba. Ministerio de Salud Pública. NRSP No. 311. Medicamentos de origen vegetal: extractos fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos. La Habana: MINSAP; 1998.
7. Azuola, R. Vargas, P. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). Rev. Tec. en Marcha 2007; 20(4):30-40.
8. Abad, G. Monografía de Metabolismo secundario en las plantas, Granma: Universidad de Granma; 2004, p. 3-5.
9. Payo, A. Tamizaje Fitoquímico del *Croteun L.* Revista Cubana de Farmacia. Ciudad La Habana; 2001; 35 (3):120-31.
10. NC 92-02. Control de la calidad. Muestreo de líquidos. La Habana: 2009.
11. Norma Ramal de Salud Pública 312. Métodos de ensayos para la determinación de los requisitos de los extractos fluidos y tinturas, La Habana: 1998.
12. NC 90-13-13. Aseguramiento metrológico. Medidores de pH. Reglas generales para efectuar mediciones de pH. La Habana: 2008.
13. NC 90-13-11. Aseguramiento metrológico. Refractómetros. Reglas generales para efectuar determinaciones refractométricas. La Habana, Cuba: 2009.
14. NC 26-63. Medicamentos. Determinación de la densidad relativa. Métodos de control. La Habana: 1988.
15. Árboles, Plantas Medicinales, Remedios Naturales. Propiedades. [Citado 17 de octubre de 2012]. Disponible en: <http://www.wanamey.Org/plantas/plantas-medicinales-aplicación.htm>.
16. Azuola R, Vargas P. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). Rev.Tec. en Marcha. 2007; 20(4):30-40.
17. Palma M, Barroso C. Ultrasound assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. Analytica Chimica Acta. 2001; 458: 119-130.

Recibido: 29 de mayo de 2014
Aprobado: 12 de septiembre de 2014