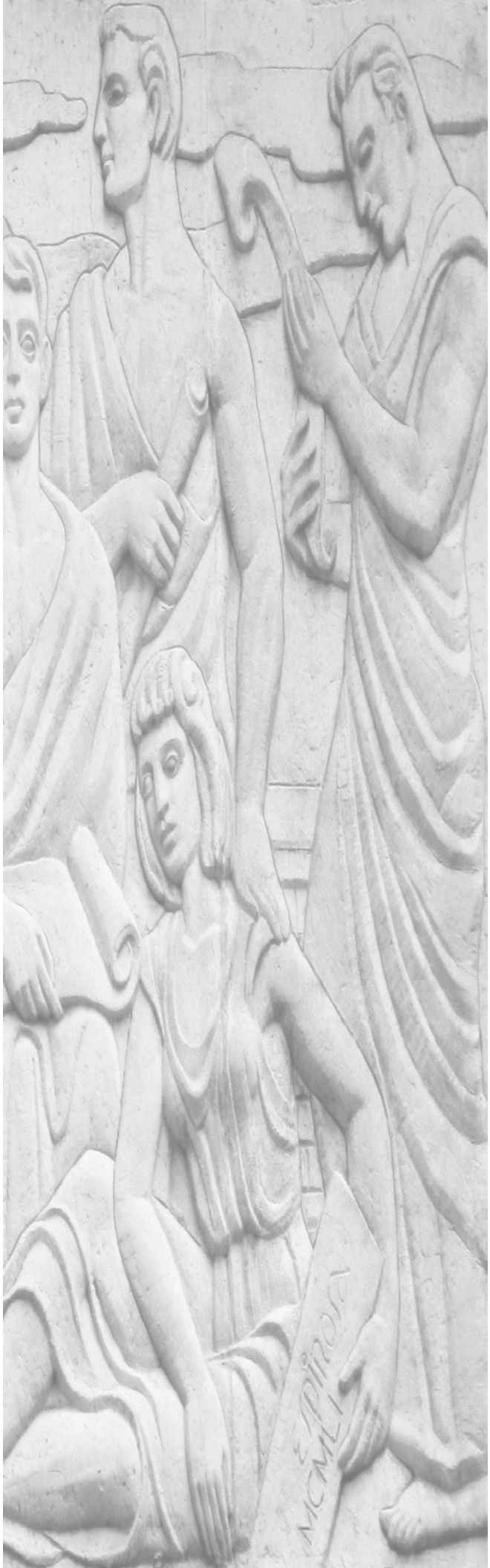


Departamento de Farmacia

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

Universidad de Oriente

Trabajo de Diploma

en opción al Título de

Licenciado en Ciencias Farmacéuticas

Título: Influencia de variables climáticas en parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie Citrus x aurantium L.

Autor: Karina Hanlan Paumier

Tutores: Msc. Liana Pérez Rondón

DraC. Idelsy Chil Núñez

Asesor: Lic. Jainer Costa Acosta

Curso: 2018-2019

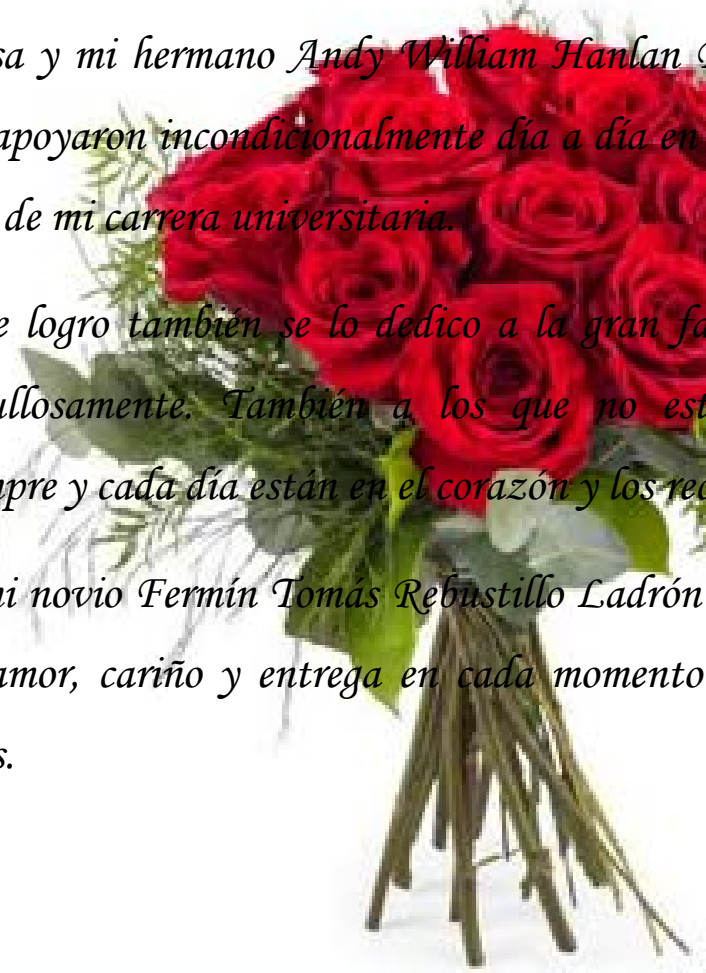
Dedicatoria

Dedico esta tesis primeramente a Dios por permitirme tener vida, salud, y poder realizar uno más de mis propósitos que es ser Licenciada en Ciencias Farmacéuticas

A mis padres Rosa Paumier Kindelán y Oscar Jacinto Hanlan Mesa y mi hermano Andy William Hanlan Paumier que siempre me apoyaron incondicionalmente día a día en el transcurso de cada año de mi carrera universitaria.

Este logro también se lo dedico a la gran familia que pertenezco orgullosamente. También a los que no están físicamente pero siempre y cada día están en el corazón y los recuerdos.

A mi novio Fermín Tomás Rebustillo Ladrón de Guevara por todo su amor, cariño y entrega en cada momento del desarrollo de mi tesis.



Agradecimientos

La vida es hermosa, y una de las principales características de esta hermosura es que la podemos compartir y disfrutar con quienes amamos, podemos ayudar y guiar a muchas personas si ellas lo permiten, pero también podemos ser ayudados y guiados durante nuestra vida.

Agradezco a mis padres, por haberme hecho la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

Agradezco a la Universidad por haberme abierto las puertas y aceptado como parte de ella en su ceno científico para poder estudiar mi carrera; en especial a mis profesores y demás personal del departamento de Farmacia que brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

Agradezco también a mis tutoras de tesis, MSc. Liana Pérez Rondón por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, y DraC. Idelsy Chil Núñez, que aunque no se encontraba presente físicamente, siempre me apoyó desde la distancia de manera muy acertada y oportuna. Por haber tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis y darme sus consejos en cada momento que los necesitaba, a ambas, Muchas Gracias.

Por último pero no menos importante a la profesora Yaribey Guaspe Anglada que soportó cada berrinche mío durante todo el desarrollo de la misma.

A mi novio Fermín Tomás Rebustillo Ladrón de Guevara que ha estado conmigo incluso en los momentos más turbulentos. Esta tesis no fue muy fácil, siempre estuvo hasta donde su alcance lo permitió. Le agradezco por su apoyo, motivación y ayuda.

A Dianles, Yadira, Yainé, Arlett, Dariana, Frank, Danelis del departamento de Inversiones de la Universidad de Oriente que de una forma u otra aportaron en el desarrollo de mi tesis.

A mi vecina Idennis Céspedes que es como una hermana para mí que me apoyó en cada momento siendo mi mano derecha durante todo este tiempo; te agradezco por tu desinteresada ayuda, por echarme una mano cuando siempre lo necesité, por aportar considerablemente en mi tesis. Te agradezco no solo por la ayuda brindada, sino por los buenos momentos en los que convivimos.

Y para finalizar, también agradezco a todos mis compañeros de clase durante todos los años de Universidad, especialmente a Isitania, Marilin, Elinay y Yuselis ya que gracias al compañerismo, amistad y apoyo moral han aportado en un alto porcentaje a mis ganas de seguir adelante en mi carrera profesional.

A TODOS GRACIAS

Resumen

La especie *Citrus x aurantium* L. es una planta muy utilizada por su gran variedad de uso terapéuticos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los parámetros farmacognósticos de las hojas de *Citrus x aurantium* L. recolectadas en La Gran Piedra y en Siboney. Se realizó el secado de las hojas a la sombra. Los parámetros farmacognósticos: análisis macromorfológico, hojas ennegrecidas, determinación de materia orgánica e inorgánica extraña, contenido de humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y sustancias solubles se determinaron según NRSP 309. Se realizó la determinación cualitativa de los metabolitos mediante el tamizaje fitoquímico y la cuantificación del contenido de flavonoides totales en el extracto alcohólico al 30%. Las características macromorfológicas de las hojas recolectadas fueron similares. Las hojas colectadas en la zona de La Gran Piedra son más largas, tienen mayor porciento de hojas ennegrecidas y mayor porciento de materia orgánica e inorgánica. Los valores obtenidos para el contenido de humedad se encontraron dentro del límite establecido, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el contenido de cenizas, se obtuvo mayor cantidad de sustancias extraídas para los solventes acuoso y alcohólico al 30 %. La mayor diversidad de metabolitos secundarios se identificaron fundamentalmente en el extracto etanólico al 95%, los valores mayores de flavonoides totales fueron encontrados en las hojas recolectadas en la zona de la Gran Piedra. Los factores climáticos asociados a las diferencias entre los parámetros farmacognósticos considerados son la temperatura, la humedad y las precipitaciones, afectando de manera diferente en las dos zonas estudiadas.

Abstract

The species Citrus x aurantium L. is a plant widely used for its wide variety of therapeutic uses. The objective of the present work was to evaluate the pharmacognostic parameters of the leaves of Citrus x aurantium L. collected in La Gran Piedra and Siboney. The leaves were dried in the shade. The pharmacognostic parameters: macromorphological analysis, blackened leaves, determination of foreign organic and inorganic matter, moisture content, total ash, water soluble ashes and soluble substances were determined according to NRSP 309. The qualitative determination of the metabolites was carried out by phytochemical screening and the quantification of the total flavonoid content in the 30% alcoholic extract. The macromorphological characteristics of the collected leaves were similar. The leaves collected in the area of La Gran Piedra are longer, have greater percentage of blackened leaves and greater percentage of organic and inorganic matter. The values obtained for the moisture content were within the established limit, no statistically significant differences were found for the ash content, a greater quantity of extracted substances was obtained for the aqueous and alcoholic solvents at 30%. The greatest diversity of secondary metabolites was identified mainly in the 95% ethanolic extract, the highest values of total flavonoids were found in the leaves collected in the Gran Piedra area. The climatic factors associated with the differences between the pharmacognostic parameters considered are temperature, humidity and rainfall, affecting differently in the two areas studied.

Índice

Índice

Introducción…….. 1

Capítulo I Revisión bibliográfica…… 5

I.1 Plantas Medicinales…… 5

I.2 Farmacognosia…… 7

I.2.1 Características farmacognósticas. Importancia…….. 7

I.3.Factores que influyen y afectan la composición química y/o metabolitos de 8

las plantas medicinales…….. 8

I.3.1 Edad…… 8

I.3.2 Suelos…… 9

I.3.3 Factores ambientales…… 10

I.3.4 Factores biológicos…….. 13

I.4 Citrus aurantium L. (Naranja agria). Generalidades…… 14

I.4.1 Descripción Botánica…… 14

I.4.2 Clasificación taxonómica…… 14

I.4.3 Otros nombres vulgares…… 15

I.4.4 Hábitat y Distribución…… 15

I.4.5 Composición química…….. 16

I.4.6 Usos farmacológicos…….. 16

I.4.7 Requerimientos climáticos y edáficos para el desarrollo y producción de la especie…….. 16

I.4.8 Impacto climático sobre las plantas medicinales. Antecedentes de estudios…….. 17

Capítulo II. Materiales y Métodos…….. 20

II.1 Características generales de la investigación…… 20

II.2 Selección del área del estudio…… 20

II.3 Recolección y procesamiento del material vegetal…….. 20

II.3.1 Recolección……. 20
II.3.2 Secado…… 20
II.4 Determinación de los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie *Citrus aurantium L*…… 21
II.4.1 Análisis macro y micromorfológico…… 21
II.4.2 Determinación de hojas ennegrecidas…….. 21
II.4.3 Determinación de materia orgánica extraña……. 22
II.4.4 Determinación de materia inorgánica extraña…….. 22
II.4.5 Determinación del contenido de humedad…… 22
II.4.6 Determinación de cenizas totales…….. 23
II.4.7 Determinación de cenizas solubles en agua…….. 24
II.4.8 Determinación de sustancias solubles…… 25
II.4.9 Determinación cualitativa de los metabolitos mediante el tamizaje fitoquímico…… 25
II.4.10 Determinación cuantitativa de metabolitos en los extractos…….. 27
II.4.10.1 Preparación de los extractos…….. 27
II.4.10.2 Determinación del contenido de flavonoides…….. 27
II.5 Procesamiento y análisis estadístico de los resultados……. 29
Capítulo III. Resultados y Discusión……. 30
III.1 Selección del área de estudio……. 30
III.1.1 Características de la Reserva Ecológica Baconao…… 31
III.2 Identificación botánica y Clasificación taxonómica…… 33
III.3 Determinación de los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie *Citrus aurantium L*…… 33
III.3.1 Análisis macromorfológico…… 32
III.3.2 Determinación de hojas ennegrecidas, materia orgánica e inorgánica extraña y contenido de humedad…… 34
III.3.3 Determinación de cenizas totales y solubles en agua…….. 37
III.3.4 Determinación de sustancias solubles…… 39
III.3.5 Determinación cualitativa de metabolitos mediante la técnica de tamizaje fitoquímico…… 40

III.3.6 Determinación cuantitativa de metabolitos en los extractos…… 45

III.3.6.1 Preparación de los extractos…….. 45

III.3.6.2 Determinación cualitativa de flavonoides en el extracto hidroalcohólico al 30%..... 45

III.3.6.3 Determinación del contenido de flavonoides…….. 46

III.4Factores asociados a las diferencias entre los parámetros farmacognósticos considerados…….. 48

Conclusiones……. 55

Recomendaciones…… 56

Referencias Bibliográficas

Anexos

Introducción

Desde tiempos remotos el hombre se ha valido de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades más elementales. En Cuba cuatro culturas constituyen las influencias principales de la medicina natural y tradicional, estas son: la aborigen, la europea, la africana, y la asiática. Su influjo desigual ocurrió en un proceso de transculturación, en el que de forma simultánea se emplearon plantas típicas de la medicina tradicional de cada una de ellas.

El uso de las plantas fue un recurso esencial para palear, en parte, las más elementales necesidades de alimentación, eliminar enfermedades y para sus creencias religiosas. Estos conocimientos han llegado a través de los años a la población cubana, por medio de la transmisión oral.[1] Las plantas medicinales son especies vegetales cuya aplicación depende de la corrección de una patología presente en el organismo humano. La milenaria experiencia sobre su uso, enseña que la efectividad no depende exclusivamente del producto; es decir, no solo de sus principios activos según la química, sino también, de su preparación y posibles combinaciones.[2] La parte de la planta empleada medicinalmente se conoce con el nombre de droga vegetal, y puede suministrarse bajo diferentes formas galénicas: cápsulas, comprimidos, crema, decocción, elixir, infusión, jarabe, pomada, tintura, ungüento, etc.[3]

Se conocen unas 260.000 especies de plantas en la actualidad, de las que el 10% se pueden considerar medicinales, es decir, se encuentran recogidas en los tratados médicos de fitoterapia modernos y de épocas pasadas. En las regiones ecuatoriales, la proporción de especies medicinales puede variar sensiblemente de este porcentaje, ya que ni siquiera se conoce la totalidad de la flora.[4] A pesar del tiempo transcurrido y los adelantos en la esfera de la Química y el desarrollo alcanzado en la industria farmacéutica el hombre continúa por diversas razones, valiéndose de los beneficios que le proporcionan las plantas del entorno en el que se encuentran, independiente de su ubicación geográfica, de su grado de desarrollo cultural y económico.[1] La medicina herbaria, es una de las formas más antigua del cuidado médico ya que ha sido utilizada por todas las culturas a lo largo de la historia. Esta se renueva en la actualidad, dado al rechazo que están teniendo

los productos sintéticos medicinales por las reacciones adversas que provocan en los pacientes, lo cual unido a la contaminación ambiental que genera su fabricación, hace que los científicos y personal médico acuda a los productos naturales obtenidos a partir de plantas medicinales para enfrentar los retos que demanda el combate de las enfermedades principales que atacan a la población en los diferentes países.[5, 6]

El conocimiento y aplicación de los procederes y técnicas de promoción de salud, prevención de enfermedades, diagnóstico, curación y rehabilitación que comprende la Medicina Tradicional y Natural en busca de más vida y sobre todo de más calidad de vida, tiene una gran importancia para los pueblos subdesarrollados, por cuanto es posible generalizar el uso de medicamentos y otros recursos de fácil adquisición, independientemente del grado de desarrollo alcanzado en la producción industrial de estos en cada pueblo.[6] En la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, sin embargo la ciencia moderna analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades para agrupar las de efectos similares, conocer los principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades, separar estos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, sinterizarlos, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios.

Es por ello que las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes de plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como materiales de base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos. Por consiguiente, la reglamentación de la explotación y la exportación, junto con la cooperación y la coordinación internacionales, son esenciales para su conservación a fin de asegurar su disponibilidad para el futuro.[7]

La especie *Citrus x aurantium* L. (Naranja Agria) es una de las plantas que más se utilizan en el mundo por su gran variedad de usos terapéuticos: para la indigestión, trastornos circulatorios, insomnio, erupciones cutáneas, fortalecimiento del sistema nervioso entre

otras,[8] siendo la especie vegetal escogida para la realización de este estudio. La naranja agria es una droga oficial en Cuba, pero las normas que existen son para la corteza del fruto[9] y no para las hojas, que serán el objeto de nuestra investigación por el amplio uso que tienen por la población.

El crecimiento de las plantas y la producción de compuestos químicos responsables de las propiedades medicinales de las mismas pueden verse afectados por diversos factores lo cual afectaría y disminuiría su uso terapéutico. Estos factores están relacionados con la edad de la planta, las características del suelo, así como factores ambientales y pueden modificarse con el cambio climático que está asociado a la variación global del clima de la Tierra, que ha cambiado muchas veces a lo largo de su historia.[10]

El clima es uno de los principales factores que regulan la distribución de las especies de plantas, ya sea directamente, a través de limitaciones fisiológicas en el crecimiento y la reproducción o, indirectamente, por medio de los factores ecológicos, como la competencia por recursos. Diversos estudios destacan que el cambio climático registrado en los últimos 30 años ha tenido un impacto en la distribución, abundancia, fenología y fisiología y composición química de muchas especies, pero aún es insuficiente el conocimiento acerca de cómo influye el cambio climático en las plantas.[11]

La consecuente agudización de los períodos de sequía, la ocurrencia de lluvias intensas, la elevación de la temperatura y el incremento de las penetraciones del mar, así como de la intensidad y frecuencia de fenómenos extremos como los huracanes, se reconocen como algunas de las causas más importantes de pérdida de la diversidad biológica en Cuba.[12] Es una realidad que las sequías se intensifican, así como que la temperatura aumenta y el mar se eleva[13]por lo que en vista a los impactos negativos que puede tener el cambio climático, nuestro país ha tomado medidas para mitigar los efectos en nuestro archipiélago, creándose diferentes alternativas entre la que se destaca la creación del Plan de Acciones para la Adaptación y Mitigación del Cambio Climático en el año 2017 más conocido como ´´Tarea Vida´´ por el ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA).[13.]Una de las acciones diseñadas por el Departamento de Farmacia de la

Universidad de Oriente para complementar este plan nacional, está el estudio de variaciones farmacognósticas de plantas medicinales.

Problema Científico

Insuficientes evidencias sobre la influencia de los factores climáticos en el comportamiento de los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L.

Hipótesis

Si se conoce la influencia de las características climáticas de la zona geográfica de colecta sobre los parámetros farmacognósticos de la especie *Citrus x aurantium* L. se podrá estimar en qué grado se afectarían estos parámetros ante los efectos del cambio climático.

Objetivo General

Evaluar la influencia de los factores climáticos en los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L. en las zonas estudiadas.

Objetivos Específicos

1. Comparar los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie en los puntos de colecta
2. Determinar factores asociados a las diferencias entre los parámetros farmacognósticos considerados.

Capítulo I:
Revisón Bibliográfica

I.1 Plantas Medicinales

Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso de gran importancia, para cubrir las necesidades terapéuticas. Su uso como agentes de la salud es ampliamente conocido en múltiples culturas del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos; para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo.[14, 15]

Se considera que toda la vegetación de nuestro planeta alcanza el medio millón de especies y se ha reconocido últimamente que la región occidental contiene la mayor biodiversidad y complejidad de éstas, siendo nuestro país privilegiado en ese aspecto y, por ende, se crea la necesidad de un mayor estudio de dichos recursos.[16]

Las plantas medicinales, son definidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como toda especie vegetal en la que el todo o una parte está dotada de actividad farmacológica. Ésta última, corresponde a compuestos químicos propios de la planta, que están sometidos a variables físicas, tales como humedad del suelo, condiciones de luz, temperatura y otros. Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que el 80 %de la población mundial conoce de las ventajas de su uso en atención primaria de salud.[17-19]

Los métodos de prospección al azar siguen teniendo preferencia en la búsqueda de compuestos activos por parte de la industria farmacéutica, pero en los últimos años se ha prestado especial atención a la utilización de la información etnobotánica para la selección de plantas en la búsqueda de compuestos con actividad biológica. En tal sentido, algunas investigaciones han evidenciado la efectividad de este enfoque para tal fin. Sin embargo, en muchos países en desarrollo ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento tradicional sobre el uso de las plantas medicinales. Aunado a ello, la disponibilidad de estas se ha visto reducida por la degradación de los bosques y su conversión a bosques secundarios y campos agrícolas. En consecuencia, la cadena de transmisión de dicho concomiendo se encuentra en riesgo.[20]

Las ventajas del empleo de las plantas radican en que, junto a sus principios activos, existen en muchos casos otros constituyentes de acción sinérgica, que potencian su acción y las hacen más completa y duradera que el principio o principios activos aislados. Las plantas medicinales son beneficiosas porque:[20]

- Son muy accesibles en cuanto a la recolección y su uso.
- Ejercen una acción global sobre el organismo a causa de la interacción de sus principios activos.
- El efecto puede ser más lento que el de los medicamentos convencionales, pero es más duradero.
- Tienden a estimular acciones de protección y regulación de las funciones del organismo y presentan menores efectos secundarios, lo que permite tratamientos más largos.
- Sirven de complemento a tratamientos con medicamentos convencionales.
- Tienen relación con el medio cultural, es decir, con la concepción del mundo y del ser humano que se tiene en cada región.
- No implica gasto de dinero, ni de mucho tiempo para su preparación.
- No requieren de conocimientos ni de ninguna habilidad especial para ser aplicadas.
- Al hacer uso de las plantas la gente adquiere sus propios recursos económicos.
- Son eficaces, durante años han resuelto muchos de los problemas de salud en las comunidades.

I.2 Farmacognosia

La farmacognosia estudia los principios activos de origen natural que pueden poseer un potencial terapéutico o aplicación en la industria. Por lo tanto, estos principios activos son de importancia en el desarrollo de la industria farmacéutica con repercusiones en las Ciencias Médicas.

Una vez establecida como ciencia, se enfocó al estudio de las sustancias de origen natural, poniendo especial interés en la identificación, descripción, análisis, comercio y uso terapéutico de las drogas vegetales. [21]

Para la Farmacognosia, estudiar una planta medicinal significa determinar su identidad taxonómica, describir su morfología y anatomía, conocer su origen y forma de producción, procesado, composición química, conocer la estructura y las propiedades de los bioactivos presentes en ellas, para así saber cómo diversos factores influyen en la calidad de las drogas de origen vegetal para uso humano; también significa definir los métodos de control de calidad, conocer todos los problemas ligados a la utilización óptima de las plantas medicinales y de los productos que de ellas derivan, así como también saber las indicaciones, contraindicaciones, efectos secundarios, interacciones medicamentosas, etc.[15]

Por otro lado, la identificación de un vegetal es indispensable en todo trabajo con plantas medicinales. Para esto se le examina ordenadamente según sus características morfológicas más sobresalientes y, a medida que se va descendiendo en la escala de clasificación, se observan detalles más minuciosos, pasando a caracteres microscópicos y fisiológicos, hasta llegar a la especie en que todos los miembros son prácticamente iguales, aunque si se estudia cuidadosamente, se verán pequeñas variantes que, de tomarse en cuenta, los subdividen aún más hasta llegar al individuo. [22,23]

I.3 Factores que influyen y afectan la composición química y/o metabolitos de las plantas medicinales

I.3.1 Edad

Debe señalarse que, en los vegetales, la edad influye de una manera muy particular en la existencia de los principios activos contenidos en las plantas. Cuando una planta es joven, los jugos acuosos están constituidos por sustancias sin propiedades químicas definidas y sin acción fisiológica determinada; pero a medida que la planta va creciendo, se van originando los principios inmediatos, hasta llegar a una época en que la planta empieza a envejecer y comienzan a disminuir los componentes, y en este momento no resulta a veces apta para el uso farmacéutico.

Se debe señalar, además que, cuando la planta es joven, entre sus componentes las sales minerales solubles son muy abundantes; mientras que cuando la planta envejece, el contenido de las sales insolubles se hace muy abundante también. [24]

La edad de la planta influye no solo en la cantidad total de principios activos producidos, sino también en las proporciones relativas de los componentes de la mezcla activa.

Sin embargo, no debe deducirse que los vegetales sean más ricos en principios activos cuando son más añosos; la edad, y por ende el momento óptimo de la recolección, depende de la especie en sí misma y de la naturaleza de sus principios activos.

También pueden presentar variación de las plantas por la duración de su vida, ya que la existencia de unas, dura sólo días, viven otras pocos meses y la mayor parte muere al cabo de uno o dos años, varias pasan muchos años sin florecer y perecen después dela fructificación, y otras se llaman perennes pues fructifican más de dos años.

La época más favorable para la recolección de las especies vegetales es el período de su mayor vigor y cuando están en ellos y cada una de sus partes más desarrollados los principios activos. [24]

I.3.2 Suelos

Otro aspecto de especial importancia lo constituye la naturaleza del suelo, ya que la presencia de determinados principios activos depende de la naturaleza y de las características presente en el suelo.

En los terrenos secos, por lo general se desarrollan plantas con principios amargos, sin embargo, algunas especies requieren de terrenos húmedos, otras de terrenos inundados y otras se desarrollan bien en lagunas. No deja de ser también importante el tipo de terreno, ya que, en los silíceos yesosos, calizos, salados, nitroso, turbosos y esquitosos, se desarrollan plantas cuyas exigencias se corresponden con estas características.

El estado de agregación de las partículas que forman el suelo tiene mucha influencia en el desarrollo de las plantas y principalmente en las raíces, que apenas crecen si aquel es compacto, y se alargan tanto más cuanto es más movible. Según la composición química del terreno, algunas especies vegetales pueden contener principios minerales distintos. Otras veces los principios orgánicos varían en dependencia de la composición del suelo y

muchas plantas no se desarrollan en todo tipo de suelo. De estos ejemplos es forzoso deducir que las propiedades de algunas plantas deben ser más o menos manifiestas según la composición química y las características del suelo, toda vez que facilita o es un obstáculo al desenvolvimiento de aquellas, contribuye a que los principios varíen cualitativa y cuantitativamente en una misma especie. [24]

El suelo tiene un papel Importante en el establecimiento y distribución general de las comunidades bióticas, a través de varios factores físicos y químicos. Así, algunas plantas solamente se desarrollan en un determinado tipo de suelo en función de las características de este.

Suelos ácidos o alcalinos: La acidez o la alcalinidad se miden en unidades de pH con una escala de 1 a 14, si bien los valores extremos no ocurren en los suelos agrícolas. El pH=7 es neutro. La acidez aumenta con los valores de 7 a 4 y la alcalinidad de 7 a 10. El trigo crece mejor entre pH 5,5 y 7,5; sin embargo, puede crecer en suelos más ácidos si se agregan correctores al suelo. [25,26]

El principal efecto de un pH muy alto o muy bajo es que algunos nutrientes pueden estar disponibles en forma excesiva y ser tóxicos mientras que la disponibilidad de otros puede disminuir y aparecer como deficiencias del cultivo.

En los suelos ácidos, el aluminio y el manganeso pueden volverse muy solubles y tóxicos y, además, reducir la capacidad de la planta para absorber fósforo, calcio, magnesio y molibdeno. Especialmente en los suelos ácidos, el fósforo no está disponible para las plantas. Si el boro, el cobre y el zinc están presentes en el suelo, pueden presentar toxicidad a bajos pH. En suelos medianamente alcalinos es posible encontrar deficiencia de boro, cobre y zinc y puede no estar disponible el fósforo. El pH del suelo tiene relativamente poco efecto sobre el nitrógeno. [25,26]

En los suelos ácidos la sustitución del trigo por especies tolerantes a esas condiciones puede mejorar la productividad de la finca. Sin embargo, las ganancias pueden ser efímeras ya que esas especies pueden acidificar más el suelo llegando incluso a un nivel que sea limitante para ellas. El mejor enfoque es sin duda el mejoramiento del suelo. [25,26]

I.3.3 Factores ambientales

En el complejo ambiental donde crecen las plantas, esencialmente el clima ejerce gran influencia en lo que respecta a los principios activos. La luz, temperatura y precipitaciones fundamentalmente tienen un efecto marcado sobre su presencia en las plantas; también la velocidad del viento, factor poco estudiado experimentalmente, es determinante en muchos casos, se conoce que por su acción se incrementa la evaporación de aceite esenciales y que sin embargo en el caso de los alcaloides tropánicos el aumento de la transpiración en las plantas hace que sea mayor el contenido de líquido que asciende desde las raíces, por lo que es muy probable, aunque no se ha comprobado, que por esta vía se incremente el contenido en las hojas en las especies productoras de estos alcaloides. [27]

Luz o radiación solar: Conocido es el influjo de la luz para que las plantas puedan vegetar normalmente y biosintetizar sus principios activos. Una luz intensa les da mucho verdor, y ayuda a desarrollar notablemente sus olores y sabores, por el contrario, una luz difusa debilita todos estos caracteres, disminuye la consistencia, alarga los tallos y contribuye a que los órganos se llenen de agua predisponiéndolas a la clorosis o palidez. Las alternativas de luz y oscuridad modifican de tal modo los principios de las plantas, que hay muchas completamente inodoras de día y olorosas de noche, y otras son ácidas por la mañana, insípidas al mediodía y amargas al anochecer. [24]

A medida que la cantidad de radiación solar disminuye en invierno, también lo hacen la fotosíntesis y el crecimiento. Por supuesto, no puedes simplemente poner una planta bajo el sol directo y esperar que crezca. La calidad de la luz es tan importante como la cantidad, y diferentes plantas requieren luz en distintos niveles. Las plantas que producen flores en primavera y otoño, son llamadas plantas de día corto porque no requieren largos períodos de luz para crecer. Las plantas de día largo, por otro lado, florecen en verano y lo hacen sólo si reciben al menos 12 horas de luz diaria. [28]

En sentido general, se considera que bajo la influencia de la luz se forman con mayor intensidad algunos principios activos como colorantes, astringentes, carbohidratos y aceites esenciales; y durante su ausencia , los productos resinosos y los ácidos, de manera

que según sean los principios activos de la especie en particular, es que deben recolectarse en sitios despejados o en caso contrario, donde la sombra de los montes y los árboles o frecuentemente las nubes disminuyen la intensidad luminosa de los rayos solares, teniendo también en cuenta la mejor hora del día para su recolección. [24]

Temperatura: La temperatura, es el principal factor que controla el metabolismo de las plantas, juega un rol importante en el crecimiento de la planta, pero al igual que con el sol, los valores adecuados dependen de la planta. Las especies de estación fría, por ejemplo, no florecen si la temperatura es muy cálida. Por otro lado, las plantas de estación cálida entrarán en latencia si las temperaturas son muy bajas. Los valores extremos pueden afectar el crecimiento y el vigor de cualquier planta. Las temperaturas altas pueden forzar a las plantas a usar los nutrientes creados mediante la fotosíntesis a una tasa más alta de la que son producidos. En climas fríos, la fotosíntesis es más lenta, al igual que el crecimiento. En períodos de latencia, esto es esperado, pero si las temperaturas caen inesperadamente durante la estación de crecimiento, esto puede afectar significativamente al crecimiento y la floración**.** [29]

A medida que desciende la temperatura el desarrollo se hace más lento. Si las temperaturas son lo suficientemente bajas como para llegar a helar, puede producirse un daño severo en los tejidos jóvenes; por ejemplo, los tallos vegetativos pueden morir a -5°C. [29]

Con temperaturas altas el cultivo necesitará más insumos (nutrientes, agua, radiación solar) para poder mantener su nivel de metabolismo. El daño causado por las temperaturas altas está comúnmente asociado con el estrés hídrico por lo que el manejo del agua pasa a ser una operación crítica. En la medida en que las plantas puedan transpirar libremente también podrán hacer frente a las altas temperaturas. Los cultivos con suficiente agua disponible pueden soportar temperaturas del aire de 40°C; sin embargo, si el agua es un factor limitante, las hojas pueden morir a 40°C ya que las plantas estresadas intentan conservar agua cerrando sus estomas) y reduciendo así el beneficioso enfriamiento producido por la transpiración. Sin ella, la temperatura de las

hojas puede llegar a 50°C interrumpiéndose los procesos metabólicos. Las plántulas en suelos muy calientes y secos pueden alcanzar fácilmente estas temperaturas críticas. [29]

Altitud: Con la altitud cambian la presión atmosférica, la humedad, temperatura, lo cual determina las características de la flora en un clima de llanos y montañas. Innumerables son los ejemplos de plantas que requieren para su mejor desarrollo y proporción de los principios activos, de condiciones específicas de altitud y consecuentemente de otros factores íntimamente de ella. [24]

Humedad: Es un factor muy importante en el desarrollo de las plantas, ya que el agua es la encargada de transportar los principios solubles que se encuentran en el suelo, interviniendo además en la síntesis de los carbohidratos, metabolitos primarios que son punto de partida en la biosíntesis de otros metabolitos secundarios o principios activos. La humedad depende de las características de altitud y del régimen de precipitaciones, puede producir pérdidas de sustancias solubles de hojas y raíces, en particular, glicósidos y aceites esenciales. Por el contrario, épocas de excesiva sequía pueden disminuir considerablemente la proporción y composición de los principios activos, llegando a causar la muerte de la planta.[24]

Precipitaciones: Con relación a las precipitaciones, la misma juega un rol fundamental al modificar los efectos ecológicos de otros factores, por ejemplo, regulador de las temperaturas; en el caso de las plantas cultivadas también el riego es un elemento a considerar. Las lluvias, además influyen sobre la distribución geográfica de las plantas haciendo que muchas especies estén limitadas a las orillas húmedas de corrientes de agua, lagunas y pantanos, asimismo su distribución irregular da lugar a la división del año en estación de seca y estación de lluvia, así como que por su exceso o por defecto, los principios activos sean seriamente afectados.[24]

I.3.4 Factores biológicos

Otro aspecto de interés son los factores biológicos, tales como: hibridaciones, mutaciones, variaciones, variedades y razas. Estas variantes o características fisiológicas de las plantas no eran conocidas: su conocimiento, así como la influencia de las mismas en la formación de los principios activos de las plantas, han sido muy necesario para descifrar algunos

comportamientos anómalos que se observan y cuya explicación no era atribuirle a ninguno de los factores anteriormente analizados.

Híbridos: resultan de la fecundación entre las especies botánicas distintas del mismo género o incluso de géneros diferentes. Los mismos pueden originar especies diversas, no solamente por sus características botánicas o fisiológicas. [24]

Mutaciones: se producen como resultado de cambios bruscos en las condiciones ecológicos-geográficas que pueden hacerse hereditarios y llegar a producir a una especie nueva o diferente. Habitualmente sufren cambios en sus principios activos, por tanto, pueden presentar interés.

Variaciones: constituye una alteración ligera que experimenta la planta debido a un cambio de circunstancias externas, la cual desaparece cuando se disipa la causa externa. Esto puede tener un aspecto interesante y es necesario tenerlo en cuenta para la recolección.

Variedad fisiológica: es aquella la cual, siendo botánicamente igual, o sea perteneciendo del mismo género y la misma especie, difiere en su composición química.[24]

Las variedades fisiológicas pueden obedecer a dos causas; es decir, a modificaciones y a combinaciones. Las primeras se deben a causa extrínsecas como son; la temperatura, luz, resistencia mecánica del terreno, cuerpos extraños, etc. Las segundas se producen, fundamentalmente, por el cruzamiento sexual de las especies.[24]

I.4 Citrus x aurantium L. (Naranja Agria). Generalidades

I.4.1 Descripción botánica

El árbol (Anexo 1) en altura oscila entre menos de 3 m a 9 m, es más erecto y tiene una corona más compacta que el de naranja dulce, tiene una corteza marrón oscura y lisa, las ramitas cuando jóvenes son angulares, y flexibles. Tiene espinas no muy afiladas que pueden oscilar entre 2,5-8cm de largo.

La hojas (Anexo 1) perennes (técnicamente simples o compuestas), son aromáticas, alternas, sobre grandes peciolos mucho más largos que los de la naranja dulce, por lo general ovaladas con punto en el ápice; (6,5-13.75 cm) de largo, (3,75-10 cm) de ancho;

mínimamente dentadas, verde oscuro arriba, pálida por debajo, y salpicadas de diminutas glándulas de aceite.[30,31]

Las flores (Anexo 1) son fragantes, nacen simples o en pequeños grupos en las axilas de las hojas, con alrededor de (3,75 cm) de ancho con 5 pétalos de color blanco, delgados, recurvados y ampliamente separados alrededor de un mechón de hasta 24 estambres amarillos. Del 5 al 12% de las flores son machos.[32]

El fruto es redondo (Anexo 1), oblato oblongo-oval, (7-8 cm) de ancho, con superficie rugosa, con una piel bastante gruesa, aromática y amarga que se convierte a color naranja-rojizo brillante en la madurez y con menudas glándulas de aceite bajo relieve. Tiene de 10 a 12 segmentos internos con paredes amargas que contienen una pulpa fuertemente ácida y desde unas pocas, hasta numerosas semillas. El centro es hueco cuando el fruto está plenamente formado.[31]

I.4.2. Clasificación taxonómica

Tabla I. Clasificación taxonómica de la especie *Citrus aurantium L.*

Reino:	*Plantae*
División:	*Magnoliophyta*
Clase:	*Magnoliopsida*
Orden:	*Sapindales*
Familia:	*Rutaceae*
Subfamilia:	*Citroideae*
Tribu:	*Citreae*
Género:	*Citrus*
Especie:	***"C. aurantium"***

I.4.3 Otros nombres vulgares

Naranja (Puerto Rico); forbbiden fruit, sour oranje (Estados Unidos).[33]

I.4.4 Hábitat y Distribución

Árbol cultivado por sus frutos que se usan casi exclusivamente como condimento y para dulces. Se encuentran en patios, jardines, bateyes y fincas de labor, y escapado del cultivo en algunos bosques y hasta bastante altura en algunos bosques y hasta bastante altura en las montañas. Se encuentra igualmente cultivado y naturalizado en todas las regiones tropicales.[34]

I.4.5 Composición química

La composición química de la especie es: [35,36]

- ✓ Flavonoides heterosídicos amargos: neohesperidina, narajina. (hojas y frutos)
- ✓ Otros flavonoides no amargos: hesperidina, nobiletina, sinensetina, tangeretina, rutina.
- ✓ Alcaloides: sinefrina (estructura similar a efedrina): se encuentran principalmente en la piel de la naranja.
- ✓ Aceite esencial: limonemo. (hojas)
- ✓ Pectinas
- ✓ Furocumarinas
- ✓ Aminoácidos: arginina, alanina, aspargina, histidina, serina, prolina
- ✓ Azúcares: fructuosa, galactosa, glucosa, sacarosa.
- ✓ Vitaminas: Rivoflavina (B2), tiamina (B1) carotina (A), B6, Ácido ascórbico (C)
- ✓ Minerales metálicos: Aluminio, calcio, bario, cadmio, cobre, cromo, hierro, magnesio, fósforo, potasio, sodio y zinc
- ✓ Proteínas.

I.4.6 Usos farmacológicos reportados

Las flavonas presentes en *Citrus x aurantium* L son compuestos que se han relacionado con la prevención de riesgo cardiovascular. Los estudios indican capacidad antioxidante, actividad antihipertensiva, reducción de los niveles de lípidos sanguíneos, incremento de la sensibilidad a la insulina y propiedades antiinflamatorias.

El limoneno presente en la piel de los cítricos, también en la naranja amarga, es una sustancia capaz de estimular el sistema de enzimas antioxidantes, reduce los cálculos biliares y actúa como quimioprotector previniendo la aparición de ciertos cánceres. Incluso se ha observado que puede producir la regresión de tumores en estudios realizados en modelos animales.[37, 38]

La naranja agria también es usada para la conjuntivitis, dolor de cabeza, dolor de oído, fiebre, resfriado, gripe, tos y diarrea.[39] Presenta actividad antiaflatoxigénica, antioxidante

antibacteriana, antiinflamatoria, efectos hipolipidémico, es anticancerígeno, e influye en el peso corporal y sobre la pérdida ósea.[40]

I.4.7 Requerimientos climáticos y edáficos para el desarrollo y producción de la especie Citrus x aurantium L.

La naranja es un cultivo de tipo perenne. Su producción comercial se da en regiones de clima tropical y subtropical, dentro del área localizada entre los 23,5 y 40^0 de latitud norte y sur. Los principales factores que influyen en su cultivo son la temperatura, la humedad relativa, la luminosidad y el suelo.[41]

El árbol del naranjo presenta moderada resistencia al frío y requiere de temperaturas cálidas durante el verano para una maduración correcta del fruto. En general, las especies de cítricos pueden crecer y fructificar en un rango de 10 a 40^0C de temperatura, y en forma óptica de 24 a 32^0C. En cultivos donde se presentan temperaturas altas durante todo el año, los niveles de clorofila en el fruto del naranjo se conservan elevados, lo que origina que el color de la cáscara de la naranja permanezca verde. En la medida que la temperatura del aire y del suelo decrece por debajo de los 15^OC, la clorofila se degrada y aparecen los pigmentos amarillos, naranjas o rojos, esto como consecuencia de la conversión de cloroplastos a cromoplastos. Por otra parte, en los casos en los que la cosecha de naranja es tardía, se puede presentar un reverdecimiento del color naranja de la cáscara motivado por la permanencia del fruto en el árbol. Esta reconversión de cromoplastos a cloroplastos la inducen las temperaturas altas de la estación y un nivel de humedad del suelo adecuado para la síntesis de clorofila de la planta.[41]

Los suelos destinados al cultivo de los cítricos deben ser de textura liviana a media. El cultivo en un suelo de textura pesada presenta drenaje lento, lo que da lugar a la proliferación de enfermedades causadas por hongos y a un crecimiento lento de las plantas. Los valores de pH en suelo de 5.5 a 6 se consideran óptimos para el desarrollo de la naranja, si bien un rango de valores de pH de 4 a 9 es aceptable.[41]

La profundidad efectiva del suelo es la mayor profundidad a la que penetran las raíces de los árboles, sin que encuentren obstáculos físicos que impidan su crecimiento y desarrollo

normal. En el cultivo del naranjo se aconseja el uso de los suelos de 1.5 m a más de 2 m de profundidad efectiva.[41]

La humedad ambiental efectiva también es un factor a considerar en el cultivo de la naranja en regiones con humedad ambiental alta. Las altitudes aptas para el cultivo de naranja oscilan entre los 400 a 1300 msnm. En este amplio rango hay que seleccionar la variedad más adecuada para cada zona.[41]

I.5 Impacto del Cambio climático sobre las plantas medicinales. Antecedentes de estudios

El cambio climático es una variación estadísticamente significativa, ya sea de las condiciones climáticas medias o de su variabilidad, que se mantiene durante un periodo prolongado (generalmente, durante decenios o por más tiempo). La Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, en su artículo uno, define el cambio climático como: cambio del clima atribuido o indirectamente a actividades humanas que alteran la composición de la atmosfera mundial, y que viene a añadirse a la variabilidad natural del clima observada durante periodos de tiempo comparables.[42]

Los efectos del cambio climático sobre el rendimiento de las plantas normalmente se presentan de manera independiente y la gran mayoría de los estudios consideran el efecto positivo y negativo del CO_2. Hansen *et al.* (2002) y Mera *et al.* (2006) consideran que el estudio debe ser integral involucrando aspectos relacionados con el cambio climático: radiación, precipitación y temperatura, a fin de evaluar el impacto del cambio climático más allá del aumento del CO_2 en la producción agrícola.[43, 44]

Mera *et al.* (2006), en un estudio de modelación, considerando la interacción de la radiación, temperatura y precipitación, en maíz y en soya, reportaron que el análisis simultáneo no coincide con los efectos individuales, especialmente, con la temperatura, donde el maíz resultó menos sensible que la soya. Los tres factores presentan un efecto no lineal sobre el rendimiento. Así mismo, la interacción de los tres factores puede reducir o alargar el ciclo de las plantas y dificulta el entendimiento de aspectos relacionados con la floración, llenado de grano y época de siembra; no obstante, la interacción radiación – precipitación contribuye significativamente al crecimiento de las plantas.[44]

En cuanto al efecto del CO_2 y la temperatura sobre el desarrollo de las plantas un estudio realizado por Lu (2013) donde se evaluó un modelo denominado GOSSYM, que examina el impacto de los cambios de estas dos variables sobre el rendimiento y el requerimiento hídrico del algodón. El autor evaluó varios sitios productores y, aunque las respuestas son específicas para cada sitio, algunas tendencias generales indican que cuando la temperatura aumenta la producción declina y los requerimientos hídricos aumentan, por lo que los ingresos netos disminuyen. Por otro lado, cuando el nivel de CO_2 se incrementa, la producción mejora, las necesidades de riego disminuyen y los ingresos netos aumentan. El impacto relativo de cambio de clima en la rentabilidad también varía entre las regiones, debido a las diferencias en los costos de producción especialmente, en el caso del agua. [45]

En un trabajo realizado por Reddy & Hodges (2014), bajo condiciones controladas, se evaluó el efecto de la variación de temperatura, CO_2 y estado hídrico de las plantas. Los autores concluyeron varios aspectos importantes, tales como: a) la fotosíntesis neta fue menor bajo temperaturas mayores y menores que la óptima para el cultivo del algodón; este resultado se obtuvo sometiendo las plantas estudiadas a dos ambientes de CO_2 y cinco temperaturas diferentes; b) a mayor temperatura se encontró una tasa mayor de abscisión de las cápsulas florales, tres a cinco días antes de la antesis; c) la doble concentración de CO_2 indujo un incremento de la eficiencia fotosintética, debido a la intercepción de mayor luz en el dosel y, d) no hubo interacción significativa entre la respuesta fotosintética de plantas germinadas a alta y baja concentración de CO_2 y condiciones de deficiencia hídrica. En ambos ambientes, las plantas disminuyeron sus tasas fotosintéticas cerca de un 43% al mediodía, cuando su potencial hídrico descendía de - 1,2 MPa a -3,0 MPa.[46]

Capítulo II:
Materiales y Métodos

II.1 Características generales de la investigación

Se realizó un estudio experimental para evaluar las variaciones farmacognósticas de las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L. colectadas en dos zonas geográficas pertenecientes a la Reserva de la Biosfera Baconao. Los ensayos se llevaron a cabo en los Laboratorios de Tecnología Farmacéutica, y MEDICUBA- SUIZA del departamento de Farmacia, el laboratorio de Química Analítica del departamento de Química, en la Universidad de Oriente en el periodo comprendido entre enero y mayo de 2019.

II.2 Selección del área de estudio

Para la selección de los puntos se tuvo en cuenta:

- Que existieran diferencias extremas en la altitud para lograr diferencias en las variables climáticas (precipitaciones, temperaturas, humedad)
- Que fueran individuos adultos (capaces de experimentar los procesos de floración y fructificación) para evitar posibles diferencias metabólicas debidas al grado de desarrollo de la planta.
- Que la especie medicinal en estudio estuviera integrada por una población de 5 individuos o más en cada área.

II.3 Recolección y procesamiento del material vegetal

II.3.1 Recolección

Las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L. se recolectaron en dos zonas geográficas pertenecientes a la Reserva de la Biosfera Baconao, en el horario de la mañana teniendo en cuenta que los principios activos se encuentran en mayor proporción en las plantas por la mañana,[47] además que las plantas en las noches producen aceites volátiles, de modo que el mejor momento para recolectarlas es a primera hora de la mañana entre las 7 y 10 am, cuando se funde el rocío.[(48)] Además, se tuvo en cuenta para la recolección que se encontraran alejadas de las carreteras o caminos para evitar la contaminación por metales pesados.[44]

Luego de ser recolectada se llevó una muestra de la planta de cada lugar de recolección al Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO) con el fin de corroborar que se trabajó con la especie correcta.

II.3.2. Secado

Se realizó el secado a la sombra, en ausencia de radiación solar ya que se conoce por estudios precedentes que la especie contiene aceites esenciales volátiles. Se removieron las hojas dos o tres veces al día, y se pesaron hasta obtener peso constante.[49]

II.4. Determinación de los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie Citrus aurantium L.

Se determinaron, según NRSP 309 los parámetros que se describen a continuación:[50]

II.4.1 Análisis macromorfológico

Macromorfología: Para la determinación de este parámetro se tomó una muestra de 100 hojas precedentes de 5 individuos de la especie colectada. Se determinaron las dimensiones del ancho y largo promedio de las mismas y se describió la morfología externa (forma), la disposición en el tallo, venación, forma del ápice, forma de la base, por el margen o borde, por la consistencia, y por el color y naturaleza del haz y del envés.

II.4. 2 Determinación de hojas ennegrecidas

De la muestra de ensayo se procedió a la separación manual de las hojas ennegrecidas.

Expresión de los resultados: El % de hojas ennegrecidas (HE) se calculó mediante la fórmula siguiente:

HE = (m/M) x 100(%)

Donde:

M: masa inicial de la muestra de ensayo (g).

m: masa de hojas ennegrecidas (g).

100: factor matemático para los cálculos.

Informe: Se informa en números enteros, el % de hojas ennegrecidas

Se pesó en balanza analítica marca SARTORIUS procedente de Alemania.

II.4.3 Determinación de materia orgánica extraña

De la muestra de ensayo se procedió a la separación de la materia orgánica extraña.

Expresión de los resultados: El % de la materia orgánica extraña (Mo) se calculó mediante la fórmula siguiente:

M_O =(m/M) x 100(%)

Donde:

M: masa inicial de la muestra de ensayo (g).

m: masa de materia orgánica extraña (g).

100: factor matemático para los cálculos.

Informe: Se informa en números enteros, el % de materia orgánica extraña.

Las pesadas se realizaron en una balanza analítica marca SARTORIUS procedente de Alemania.

II.4. 4 Determinación de materia inorgánica extraña

De la muestra de ensayo se procedió a la separación de todas las partículas de tierra, arena, piedrecitas presentes en la misma.

Expresión de los resultados: El % de materia inorgánica extraña (**M_I**) se calculó mediante la fórmula siguiente:

M_I = (m/M) x 100 (%)

Donde:

M: masa inicial de la muestra de ensayo (g).

m: masa de materia inorgánica extraña (g).

Las pesadas se realizaron en una balanza analítica marca SARTORIUS procedente de Alemania.

II.4. 5. Determinación del contenido de humedad

Esta determinación se realizó por el método azeotrópico.

A un balón de 500 ml se le transfirieron 200 ml de tolueno, se le añadieron 2ml de agua, se le puso la manta de calentamiento, se destiló en el equipo de determinación de agua por el método de tolueno hasta que el volumen de agua en el tubo colector permanezca

constante y se midió el volumen inicial de agua (V1). Se dejó enfriar el tolueno (tolueno saturado). De la muestra de ensayo pulverizada y tamizada, se pesaron 10 g, con un error máximo de 0.5 mg y se transfirieron al balón que contiene el tolueno saturado; se puso en la manta de calentamiento nuevamente, se destiló hasta que el volumen del agua en el tubo colector se mantuvo constante y se midió el volumen final de agua (V2).

Expresión de los resultados: El contenido de humedad (H) de la muestra de ensayo expresado en % se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$H = ((V2-V1)/M) \times 100 \text{ vol/m}$$

Dónde:

M: masa de la muestra.

V2: volumen final de la muestra

V1: volumen inicial

II.4. 6 Determinación de cenizas totales

En un crisol de porcelana o platino, previamente tarado, se pesaron con error máximo de 0.5 mg, 2g de la muestra de ensayo pulverizada y tamizada. Se calentó suavemente la muestra de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar (550 ºC) y posteriormente se incineró en un horno mufla (Robota. Rusia) a una temperatura de 700 a 750 º C, durante 2 horas. Luego se enfrió el crisol en una desecadora y se pesó en una balanza analítica marca SARTORIUS procedente de Alemania. Se repitió el proceso a partir de la incineración, hasta obtener una masa constante, es decir, hasta que al pesar nuevamente los valores no diferían en más de 0.5 mg /g 2 pesadas consecutivas.

Para obtener la masa constante el tiempo de calentamiento y pesada se realizó en intervalos de 30 minutos. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añadirán unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio 10g/100ml y se calentó hasta evaporar los solventes. Al enfriar el residuo es de color blanco o casi blanco.

Expresión de los resultados: La cantidad de cenizas en base anhidra se calcularon por la formula siguiente:

$C_1 = [(M_2-M) / (M_1-M)] \times 100(\%)$ $C_t = C_1 \times 100 / 100-H$

Donde:

C_1: Cenizas totales en base hidratada.

M: Masa del crisol vacío (g).

M_1: Masa del crisol con muestra de ensayo (g).

H: % humedad.

M_2: Masa del crisol con ceniza (g).

100: Factor matemático para cálculos.

C_t: Cenizas totales

II.4. 7 Determinación de cenizas solubles en agua

A las cenizas obtenidas anteriormente se le añadirán de 15 a 20 ml de agua. La solución se filtró a través de un papel de filtro libre de cenizas, con cenizas determinadas o declaradas. El filtro con el residuo se transfirió al crisol inicial, se carbonizó en un mechero y luego se incineró en un horno mufla (Robota. Rusia) de 700ºC durante 2 horas. Posteriormente se colocó en una desecadora y cuando este alcanzó la temperatura ambiente se pesó. Se repetirá el procedimiento hasta que se obtenga una masa constante.

Expresión de los resultados: La cantidad de cenizas solubles en agua (C_A) en base anhidra se calcula por la fórmula siguiente:

$C_1=[(M_2-M_4) / (M_1-M)] \times 100\%$ $C_{A=}C_1$ x100 / 100-H

Donde:

C_1: cenizas solubles en agua en base hidratada.

M: masa del crisol vacío (g).

M_1: masa del crisol con muestra de ensayo (g).

H: % de humedad

M_2: masa del crisol con cenizas totales (g).

M_4 : masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g).

100: factor matemático para los cálculos

C_A: Cenizas solubles en agua

Aproximación de los resultados e informe: Los valores se aproximan hasta la décima. El ensayo se realizó por triplicado.

II.4. 8 Determinación de sustancias solubles

De la muestra de laboratorio previamente pulverizada y tamizada (2 mm), se pesaron 5 g y se transfirió a un frasco cónico con tapa de 250 ml; se añaden 100 ml de agua, alcohol al 30%, 70%, 95% establecido en la monografía. Se agitó durante 6 horas y se dejó en reposo hasta el día siguiente: se agitó 30 minutos; se dejó reposar alrededor de 30 minutos; y se filtró por papel. Se tomó una alícuota de 20 ml, se evaporó sobre baño de agua, se desecó 105 ^{0}C en una estufa durante 3 horas, se enfrió y se pesó en una balanza analítica marca SARTORIUS procedente de Alemania.

$$Ss = (R \times 500 \times 100) / (M \times (100-H))$$

Dónde:

H: humedad de la muestra en %.

500 y 100: factores matemáticos para los cálculos.

R: residuo de la muestra (g).

M: masa de la muestra (g)

Ss: Sustancias solubles

II.4.9 Determinación cualitativa de los metabolitos mediante el tamizaje fitoquímico

Esta es una técnica que se utiliza para detectar metabolitos secundarios presentes en especies vegetales, desde el punto de vista cualitativo y se basa en la realización de

reacciones químicas con diferentes reactivos, donde la aparición de determinado color o precipitado coloreado o no, es indicativo de la presencia de un determinado metabolito.

Estos ensayos no brindan un criterio absoluto y confirmativo de la presencia de estos compuestos, pues se pueden producir numerosas interferencias en estas reacciones, producto de la presencia en el medio de otras sustancias (metabolitos secundarios o no), capaces de reaccionar en forma similar, provocando reacciones falsas positivas. Sin embargo, esta técnica sí da un criterio de la composición química que pueda existir en un extracto de una droga vegetal.[49]

Con la finalidad de lograr el mayor agotamiento de la droga, se utilizó para las extracciones sucesivas, solventes de polaridad creciente, ensayándose en cada extracto (etéreo alcohólico, y acuoso) los metabolitos que de acuerdo a su solubilidad pueden ser extraídos en estos solventes por 48 horas.

Para el tamizaje fitoquímico, las extracciones siguieron el orden de polaridad creciente al usar éter, etanol al 95% y agua destilada en forma secuencial como solventes extractivos. El uso de los solventes en ese orden permite separar la muestra inicial en tres fracciones, en cuyo seno albergan metabolitos secundarios de polaridad semejante al solvente. Este procedimiento es fundamental para disminuir el error al identificar metabolitos secundarios mediante reacciones de coloración y de precipitación.

El éter, al ponerse en contacto con la droga pulverizada, va a difundir fácilmente por la membrana vesicular, disolviéndola a su paso y extrayendo los principios activos de polaridad semejante. El alcohol, que tiene polaridad intermedia, extrae los metabolitos de polaridad semejante que no fueron extraídos con éter, esto quiere decir que va extrayendo metabolitos solubles en él. El agua extrae los metabolitos más hidrosolubles, debido a su elevada polaridad; esta es capaz de extraerlos en sus formas ionizadas o los que tienen altas polaridades como los polifenoles. En el Anexo 2 se muestra el diagrama que presenta el proceso de obtención de los diferentes extractos.[51]

En la siguiente tabla (Tabla II) se muestran los ensayos para la determinación de los diversos metabolitos.

Tabla II. Ensayos que se le realizan a cada metabolito

Metabolitos	Ensayos
Alcaloides	Drangendorf, Mayer, Wagner
Triterpenos y Esteroides	Solkowski , Lieberma-Burchard, Rosemheim
	C/ácido tricloroacético
Quinonas	Borntrager , Variante con benceno
Cumarinas	Baljet, Legal, Hidroxomato férrico
Saponinas	Espuma
Poliurónidos	Poliurónidos
Resinas	Resinas
Mucílagos	Mucílagos
Aceites esenciales y sustancias grasas	Sudán III, C/papel blanco sin reactivo
	Para aceite fijo, secante o esencial
Azúcares reductores	Fehling, Benedict
Fenoles y Taninos	Cloruro férrico , Gelatina, Cafeína
Aminoácidos libres y aminas en general	Ninhidrina
Carbohidratos	Molish
Flavonoides	Ácido sulfúrico concentrado, Shinoda, Álcalis, Rosemheim, Catequinas.
Principios amargos y astringentes	Sabor

II.4.10 Determinación cuantitativa de metabolitos en los extractos.

II.4.10.1 Preparación de los extractos

La obtención de los extractos para la determinación cuantitativa de los metabolitos se realizó según el método de la maceración por 48 horas de acuerdo a lo establecido en la

NRSP (309/91).[50] Para la selección del método de extracción y el solvente se tuvo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de sustancias solubles y la estabilidad del mismo.

II.4. 10.2 Determinación del contenido de flavonoides

La cuantificación del contenido de flavonoides totales se realizó empleando el método de Kumazawa y colaboradores en el año 2004.[52] El catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides de color amarillo, que producen en el análisis espectrofotométrico un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales. Este método consistió en mezclar una alícuota de 2 mL de disolución de los extracto alcohólico 30% de la hoja una concentración de 1mg/mL en etanol 95 %, con 2 mL de solución etanólica de cloruro de aluminio ($AlCl_3$) al 2 %. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 420 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10S, de procedencia americana.

II.5 Procesamiento y análisis estadístico de los resultados

Para el procesamiento matemático y análisis estadístico de los resultados se emplearon los softwares Microsoft Excel contenido en el paquete Microsoft Office 2016 y el software STATGRAPHICS Plus Versión 5,1. El tratamiento estadístico realizado se detalla a continuación:

- Longitud del peciolo, largo y ancho de las hojas fueron expresados como media ± desviación estándar de las muestras tomadas.
- Los resultados de cenizas totales y cenizas solubles en agua, sustancias solubles y flavonoides totales fueron expresados como media ± desviación estándar de cada extracto y comparadas sus medias empleando un Análisis de varianza ANOVA, auxiliados del software Statgraphic Centurion.

- Se realizó un análisis de correlación con los resultados de algunos parámetros farmacognósticos considerados para determinar los factores climáticos asociados a las diferencias entre estos parámetros entre las zonas de colecta empleando software Statgraphic Centurion.

Capítulo III:
Resultados y Discusión

III.1 Selección del área de estudio

Las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L. fueron recolectadas en 2 zonas geográficas pertenecientes a la Reserva de la Biosfera Baconao que están situadas a diferentes altitudes; esta ubicación garantiza que existan diferencias entre las variables climáticas temperatura, precipitaciones y humedad entre ambas zonas geográficas (Tabla III). Para verificar este criterio se tomaron como referencia los valores medios anuales de cada uno de estas variables desde el 2010 hasta 2017 reportadas en el Anuario Estadístico de Cuba.[53] En el análisis estadístico realizado se pudo apreciar que existen diferencias estadísticamente significativas entre las mismas, para un p-valor ≤ 0.05 Las áreas seleccionadas para el estudio fueron La Gran Piedra situada a 1 225 metros de altura sobre el nivel del mar y Siboney [54] con una altitud sobre el nivel del mar de 20 metros.

En estas zonas también se tuvo en cuenta en el momento de la colecta, que los individuos fueran adultos, en producción, y que fueran abundantes, estimándose más de 5 individuos por área. En ambas áreas las colectas se realizaron en la mañana en una hora comprendida entre las 8:30 am – 9:30 am.

Tabla III. Valores medios anuales desde el 2010 - 2017 en cada zona geográfica de colecta.

Criterios de selección	Gran Piedra	Siboney
Ubicación geográfica (longitud, latitud)	20,0108, -75,6278	19,9603,-75,7079
Altitud (msnm)	1225	20
Precipitaciones media (mm)	1875.5^{a}	1157.7^{b}
Temperatura media (^{0}C)	19.2^{a}	27.7^{b}
Humedad (%)	88^{a}	69.5^{b}

Leyenda: Letras diferentes dentro de una misma fila indican que existen diferencias significativas.

Fuente: Anuario Estadístico de Cuba

III.1.1 Caracterización de la Reserva de la Biosfera Baconao

La Reserva está ubicada al este de la ciudad de Santiago de Cuba, se extiende entre los municipios Santiago de Cuba y Songo La Maya de la provincia de Santiago de Cuba y Niceto Pérez y Caimanera de la provincia Guantánamo. Desde el punto de vista físico geográfico, se localiza en la porción oriental de la Sierra Maestra, ocupando territorios de la Sierra de la Gran Piedra, las Alturas de Santa María de Loreto y parte de las terrazas costeras del Sur de la Sierra Maestra.

Como Reserva de la Biosfera posee en su interior cuatro zonas núcleo de conservación: el Paisaje Natural Protegido Gran Piedra, la Reserva Ecológica Pico Mogote, la Reserva Ecológica Siboney-Juticí y la Reserva Natural El Retiro. (Anexo 3) En el resto del territorio de la reserva fuera de las áreas protegidas, los que se conocen con el nombre de zonas de amortiguamiento, predominan actividades de diversa índole, como el turismo ecológico, la educación e interpretación ambiental y la investigación científica [55].

El Paisaje Natural Protegido **Gran Piedra** (Anexo 4) se encuentra, situada frente a la costa sur entre las cuencas tectónicas de Santiago de Cuba y de Guantánamo, con unos 68 kilómetros de largo y un ancho máximo de 20 kilómetros entre la costa y la altiplanicie de Santa María del Loreto. Hacia el este y al oeste, otras montañas están igualmente coronadas por bloques volcánicos, restos de lo que antiguamente constituía un gran estrato sobre toda la cordillera, estrato que fue cortado por la acción erosiva remontante de los ríos. (Anexo 5)

Las características climáticas de estos lugares están dadas fundamentalmente por el relieve y la influencia de los vientos del este y nordeste, que soplan con velocidades de 2 a 10 km /h durante el día y de 12 km /h o más durante la noche.

El estado del tiempo es de lluvioso cálido en la cima a soleado húmedo. La humedad relativa en el área de la Gran Piedra oscila entre el 85 y el 90 %. La temperatura media anual varía de 16 a18 ^{0}C, la mínima media anual de 12 a 14 ^{0}C y la máxima media anual de 18 a 20 ^{0}(Anexo 6)

Reciben de 3 a 4 horas de sol diarias y la evaporación media anual es menor de 1 mm diario. La precipitación media anual oscila entre los 1 300 y los 1 900 mm. Los meses más

lluviosos son mayo, septiembre y octubre, mientras que los que tienen más días con lluvia son de mayo a noviembre (más de 10 días). A su vez, la evaporación media anual es baja. Se presenta un gran predominio de días nublados, frescos, con 238 días con niebla y nubes bajas, de los cuales 162 son con niebla densa. Los meses con mayor cantidad de días con niebla densa (14 días o más) son de octubre a mayo; por el contrario, de junio a septiembre hay 9 días o menos.

En la vertiente Norte, los vientos predominantes son los alisios del nordeste, y es a su vez, la zona de los vientos más fuertes (noviembre a abril), mientras que la vertiente Sur se halla bajo los efectos Foehn de los mismos; que contribuyen a mantener una alta humedad en esta zona, aunque debido a la deforestación la frecuencia de este fenómeno se ha ido reduciendo.

En el momento de la colecta la temperatura en La Gran Piedra era de 20, 9 ^{0}C, la humedad de 69,0 y una altura de 1098 msnm [56].

La Reserva Ecológica **Siboney**-Juticí (Anexo 4) se ubica en la provincia de Santiago de Cuba, quedando al este de la ciudad de igual nombre. La superficie total es de 2 075 ha, correspondiendo su parte terrestre 1 434 ha (lo que representa el 0.01% de la superficie terrestre de Cuba) y a su sector marino 641 ha. La longitud total de la línea de costa es de 10.4 km. (Anexo 5)

Las alturas varían desde 200 m por debajo del nivel del mar hasta 120 m sobre este nivel.

La temperatura media anual se comporta entre los 24 y los 26°C. La máxima media anual está entre 28 y 32°C, y la mínima media anual fluctúa entre 20 y 22°C. La humedad relativa media anual está entre 70 y 80%. Predominan las brisas marinas de hasta 12 km/h durante el día y durante la noche los vientos alisios flojos, reforzados por el terral y las brisas de montaña.

Las lluvias en el área no alcanzan nunca valores superiores a los 800 mm y arrojan un promedio anual de aproximadamente 650 mm. La evaporación comporta entre los 1 700 y los 1 900 mm anuales.

Presenta una nubosidad media en el período lluvioso (mayo-octubre) de nubes de tipo cúmulo de origen convectivo con un 50%del cielo cubierto y precipitaciones medias de

600 mm. En el período de poca lluvia existen formaciones de nubes de tipo cúmulo de poco desarrollo con el 25% de cielo cubierto con precipitaciones menores de 200 mm [54].

III.2 Identificación botánica y Clasificación taxonómica

Una vez colectada la planta se llevó al Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO) la cual fue identificada por el licenciado Jainer Costa Acosta, lo que corroboró que se trabajó con la especie correcta en ambos puntos de colecta. (Anexo 7)

III.3 Determinación de las características farmacognósticas de las hojas de la especie Citrus x aurantium L.

III.3.1 Análisis Macromorfológico

En la tabla IV se muestran las dimensiones realizadas a las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L como parte del análisis macromorfológico.

Tabla IV. Dimensiones de las Hojas

Dimensiones de la hoja (cm) (N= 100)	**Gran Piedra**	**Siboney**
	Media ± (S)	**Media ± (S)**
Largo	10.88 ± 1.411[a]	**5.551±** 1.7222[b]
Ancho	5.445± 0.9908[a]	**8.817±** 1.1508[a]
Peciolo	2.635 ± 0.5634[a]	**1.905±** 0.6350[b]

Leyenda: Letras diferentes dentro de una misma fila indican que existen diferencias estadísticamente significativas

Las características macromorfológicas de la especie en ambas zonas fueron: árbol o arbusto de 4-15 m de alto, inerme o con pocas espinas mayormente cortas y finas pero que pueden alcanzar 5-8 cm de largo en los retoños. Hoja unifolioladas, alternas, subglabras, textura lisa, de consistencia membranácea, aromáticas; verde lustroso en la haz y verde claro en el envés. Peciolo articulado apicalmente, con alas estrechas, o anchas y entonces ensanchadas y redondeadas distalmente y estrechadas hacia la base.

El foliolo es oval u ovado; según datos de herbarios cubanos (Beurton, 2008) [57] es de 6-11 x 3-6 cm, obtusamente agudo o acuminado, a veces ± emarginado de base redondeada o

cuneiforme y margen undulado, serrulado, crenulado o entero. La nervadura es penninervia.

Las mediciones realizadas a las hojas para determinar las dimensiones del largo, ancho y el peciolo demostraron que existen algunas diferencias en dependencia del área de recolección. Según el análisis estadístico realizado para el parámetro largo existen diferencias significativas, observando que las hojas colectadas en la zona de La Gran Piedra son más largas (10.88 ±1.411cm), alcanzando valores medios que duplican el largo de las hojas colectadas en la zona de Siboney (5.55 1 ± 1.7222cm). En un estudio realizado en la india para las hojas de esta especie Periyanayagam y col. (2013) [58] determinaron que el tamaño de las hojas varia de 8-14cm × 4-5 cm, resultados que coinciden con nuestras determinaciones.

Para el ancho de las hojas no se obtuvieron diferencias significativas entre las muestras. En el caso de las dimensiones del peciolo también se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras, pero los valores obtenidos se encuentran dentro de lo reportado para esta especie por Beurton (2008) basado en materiales de herbarios en Cuba, donde estableció que las dimensiones del peciolo son de 1-3 ± 0,2-2 cm.

III.3.2 Determinación de hojas ennegrecidas, materia orgánica extraña e inorgánica extraña y contenido de humedad

Se considera materia extraña a cualquier parte de la droga vegetal que no esté comprendida en la definición o en la descripción de la monografía correspondiente. Las drogas deben estar libres de hongos, de insectos y de otras contaminaciones de origen animal. Salvo que se indique lo contrario, el porcentaje de elementos extraños no debe ser superior al 2% m/m. La materia extraña de la droga se puede clasificar en tres tipos: (a) partes de organismos u organismos que provienen de las drogas, exceptuando aquellos incluidos en la definición y descripción de la droga, por encima del límite de tolerancia especificado en la monografía; (b) cualquier organismo, partes o productos de organismos no especificados en la definición y descripción de la droga, en su respectiva monografía; y (c) impurezas de naturaleza mineral u orgánica, relacionados con la droga.[59]

Hojas ennegrecidas: Este es un parámetro negativo que atenta contra la calidad de la droga. Esta determinación al igual que la de materia orgánica e inorgánica extraña es de gran interés para detectar aquellas partes de la droga que no corresponden a las exigencias que señala la literatura en cuanto a color, tamaño, estado y grado de pulverización, mezclas de otras partes de la planta o de otras plantas presencia de minerales como: tierra, piedras, arena y polvo, vidrio, metal y plástico o cualquier otro material extraño, estos pueden estar sueltos o adheridos al material vegetal y deben ser eliminados antes de que este sea molinado para posteriores análisis.[60]

Tabla V. Determinación de hojas ennegrecidas, materia orgánica e inorgánica extraña y humedad residual

Zonas geográficas	He (%)	Mi(%)	Mo(%)	H(%)
Gran Piedra	7,7	1,4061	0,0916	12.9
Siboney	5	0,0358	0,0659	8.9

Leyenda: H_E, Hojas ennegrecidas. Mo: Materia orgánica; M_I: Materia inorgánica, H: humedad residual

Como se puede observar en la Tabla V, para la determinación de hojas ennegrecidas se obtuvieron valores altos en ambas zonas, lo que indica que existen condiciones climáticas que influyen en este parámetro.

Los valores mayores se obtuvieron en la Gran Piedra y pueden estar asociados a factores ambientales como las bajas temperaturas, propiciando que las plantas tiendan a dañarse y a sufrir cambios en su estructura externa, apareciendo el ennegrecimiento de las mismas, siendo las hojas las más afectadas.[61] Según se reporta por otros autores. Esto pudiera explicar los valores obtenidos en esta zona ya que la temperatura mínima media anual es de 12 a 14 ^{0}C y la máxima media anual es de 18 a 20 ^{0}C.[56] Los cítricos en regiones donde la humedad relativa es alta, presenta como desventaja el favorecer el desarrollo de enfermedades fungosas y de algunas plagas que podrían ennegrecer las hojas.[62] El rango adecuado de humedad relativa puede considerarse entre 40% y 70%, apreciándose que en ambas zonas este parámetro es superior, lo que justificaría el resultado mostrado.[63]

Materia orgánica e inorgánica: El porciento de materia orgánica e inorgánica en ambas zonas se encuentra por debajo de los límites establecidos para materia extraña (2%), no obstante, debemos señalar que para ambas determinaciones en las muestras colectadas en la zona de la Gran Piedra estos valores son superiores, lo cual pudiera estar relacionado con partículas del suelo que constituyen impurezas para la droga vegetal. En el caso de la materia orgánica los valores para la zona de la Gran Piedra son de 1,4061% y para Siboney de 0,0358%; uno de los componentes orgánicos de los suelos es el humus. El humus se encuentra en las capas superiores de los suelos y constituye el producto final de la descomposición de los restos de plantas y animales, junto con algunos minerales y esta zona por sus características de humedad es rica en este componente. Igual observación podemos hacer para los valores de materia inorgánica. La materia inorgánica del suelo son todas las sales y minerales que no se derivan del carbono y sus derivados, de ahí el que se le llame inorgánico. Está formado de partículas de roca finamente cortadas. Lo que lo forman son algunos elementos en pequeñas cantidades como hierro, oro, magnesio, azufre, etc. y los óxidos de estos elementos. Un componente importante son los silicatos, que constituyen el 75% de la corteza terrestre. La composición del suelo varía según el lugar.[64]

El viento podría ser otro de los factores que intervenga en el resultado obtenido en las determinaciones de materia orgánica e inorgánica extraña, ya que el mismo puede servir como transportados de residuos o polvo con estas características y en ambas zonas se reportan valores de velocidad de los mismos entre 10 y 12 km/h.[63]

Aunque esta es una especie aprobada por el MINSAP, en nuestro país se utiliza la corteza del fruto y es para este órgano que se reportan los estudios.

Humedad residual: Es un parámetro de suma importancia para establecer la calidad de una droga. El incumplimiento del mismo puede generar contaminaciones con microorganismos y hongos, alteraciones en la composición química de la planta, entre otras. [65]

Los valores obtenidos para el contenido de humedad en las hojas de la especie en los dos lugares de colecta se encontraron dentro del límite establecido en las normativas para las

especies vegetales en general, entre 8 y 14 %[49]. Estos resultados coinciden con lo reportado por Castillo y col. (2017) donde relatan el porciento de humedad residual para las hojas de esta especie secadas en un secador solar con convección natural y con convección forzada obteniendo valores entre 8,75 y 8,85 %, mostrando que existe poca variación en los valores de humedad resultando casi independientes del modo de funcionamiento del secador solar.[66]

Como se puede observar en la tabla V, existen diferencias entre los valores de las zonas, apreciándose que es Siboney la zona que presenta menor valor de humedad residual. Estas diferencias entre los valores obtenidos en cada zona pudieron estar influenciadas por la presencia de factores ambientales como las precipitaciones, la temperatura y la humedad. Para el caso de la Gran Piedra los valores de precipitaciones y nubosidad son mayores que en Siboney, así como menores los valores medios de temperaturas. Sin embargo, en Siboney las temperaturas son muy elevadas, el régimen de precipitaciones es escaso, el clima es muy cálido por tanto las hojas suelen estar más secas.

III.3.3 Determinación de cenizas totales y solubles en agua

Las cenizas totales son indicativas de la calidad del material vegetal con que se trabaja, y constituyen una base para juzgar la pureza e identidad de la droga, brindando información relativa a la presencia o posible adulteración con materias inorgánicas, cuerpos extraños que posea la planta, o la cantidad de estos elementos en su contenido. [67] Por lo general, las cenizas totales se componen de carbonatos, fosfatos, sulfatos, silicatos y sílice.

El método para la determinación de cenizas permite identificar rápidamente y de forma sencilla los materiales fisiológicos y no fisiológicos que contiene el vegetal. Ceniza fisiológica es aquella que proviene de los componentes minerales de la propia planta. Pero la planta puede contener materia extraña que se adhiere a ella por su contacto con el suelo y puede ser arena también.[68]

Esta materia extraña se le denomina ceniza no fisiológica. Un contenido de cenizas superior al permitido es indicativo de un procedimiento de recolección y almacenamiento inadecuado en la mayoría de los casos.[68]

En las Tabla VI, se exponen los resultados sobre el porcentaje de cenizas totales y solubles en agua presentes en las hojas de la especie recolectadas en las diferentes zonas seleccionadas**.**

Tabla VI. Determinación de cenizas totales y solubles en agua en las hojas colectadas en las diferentes zonas

Parámetros Farmacognósticos	**Zonas Geográficas**	
	Gran Piedra **Media (± S)**	**Siboney** **Media (± S)**
Cenizas totales	8,909± 0,077 [a]	9,153± 0,528 [a]
Cenizas solubles en agua	1,585± 0,406 [a]	2,536± 1,759 [a]

Leyenda: Letras iguales dentro de una misma fila indican que no existen diferencias significativas.

Los valores de cenizas totales obtenidos para ambas muestras se encuentran por encima de lo establecido, ya que estas no deben exceder el 5 % según Miranda y Cuellar (2001), no siendo así para los resultados obtenidos en este estudio por lo que se recomienda realizar la determinación del contenido de metales en la droga seca. No obstante, otras bibliografías como La Real Farmacopea Española (2002) indica que el límite permitido para cenizas totales es hasta 12% y según la Farmacopea Británica las cenizas totales no deben exceder de 12 % para plantas medicinales.[69,70]

En un estudio realizado por Carolina Vásconez en el 2014, se realizó la determinación de estos parámetros al mesocarpo del fruto de la naranja agria y se obtuvieron valores de cenizas totales de 7,16 %, y cenizas solubles en agua de 5,10% [71], valores cercanos a los obtenidos en nuestro estudio.

Los valores de cenizas solubles en agua para la zona de La Gran Piedra fueron de 1,585 ± 0,406 y para Siboney de 2,536 ±1,759 sin encontrarse diferencias significativas entre ellos, estos resultados son menores que los reportados por Periyanayagam y col. (2013) quienes determinaron que este parámetro mostró un valor de 5.4%.[58]

Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas para estos parámetros en las dos zonas de colecta, las diferencias numéricas observadas pudieran estar asociadas a factores como las características del suelo donde se recolectan las

mismas y al poder acumulativo de elementos de naturaleza inorgánica. Estos elementos pueden corresponder a metales alcalinos, alcalino-térreos o metales pesados. La acumulación de estos últimos constituye un grave problema para el consumo humano y animal.[15]

Se puede observar que la zona de Siboney fue en la que se obtuvo mayor de cenizas totales, como se dijo anteriormente las características del suelo justificaría estos resultados. En esta zona las características del suelo es de tipo rocoso, de formación caliza que en la zona costera es de origen biógeno y recibe el nombre de formación Jaimanita, hacia los niveles superiores la roca es más compacta y pertenece a la formación maya, a partir de 4ta o 5ta terraza existe una formación marga calcárea, este tipo de suelo tiene un alto contenido de carbonatos y limo(una tierra compuesta de partículas de los tres tamaños: arcilla, lodo y arena) además de hierro y magnesio, y en abundancia sílice. De ahí los altos valores de cenizas totales obtenidos en esta zona.[55] Sin embargo en la zona de la Gran Piedra las características son distintas, al tratarse de un suelo ferralítico rojo lixiviado donde el complejo de intercambio predomínate es el calcio y magnesio, aunque menos que en la zona de Siboney, las cantidades de fósforo y potasio presentes en este tipo de suelo en la Gran Piedra son de categorías de alto y muy alto.[57]

III.3.4 Determinación de sustancias solubles

La determinación de sustancias solubles se realiza cuando no existen métodos adecuados para determinar los constituyentes activos de las drogas por procesos físicos o físico-químicos o cuando lo exige la monografía de la Farmacopea. El método se basa en la solubilidad de sustancias activas en un solvente dado y, cuando estas no son conocidas, en la actividad farmacológica del extracto obtenido con el solvente.[72]

Tabla VII. Determinación de sustancias solubles

Sustancias Solubles				
Zonas	**Agua Media (± S)**	**Alcohol 30 % Media (± S)**	**Alcohol 70 % Media (± S)**	**Alcohol 95 % Media (± S)**
Gran Piedra	27,315 ±0,067[a]	25,275 ± 0,03[a]	21,045± 1,090[a]	6,392± 1,091[a]
Siboney	25,127± 0,516[b]	24,092± 0,679[b]	18,409± 0,362 [b]	9,486± 0,522[b]

Leyenda: Letras diferentes indican que existen diferencias significativas

La comparación de varianzas revela que existen diferencias estadísticamente significativas entre las zonas en estudio con un nivel de confianza de 95%. Para discernir estas diferencias se realizó el tests de los rangos múltiples de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD), arrojando como resultado que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos para los solventes acuosos y alcohol al 30 % respectivamente para cada zona, ni entre zonas. Estos resultados demuestran la alta capacidad extractiva de estos disolventes, considerándose una alternativa para la obtención de extractos a partir de este material vegetal.

Según los resultados encontrados las sustancias solubles en alcohol al 30% y en agua, permiten señalar que existe mayor cantidad de sustancias de alta polaridad que de baja polaridad. Resultados similares fueron obtenidos por Aka y col. (2017) cuando realizaron la determinación de la materia extraíble para el polvo de corteza de esta especie, utilizando para la extracción una mezcla de agua: etanol. Después de la filtración, el filtrado se evaporó a sequedad en un baño de agua y se secó en un horno a 100-105 ° C durante 3 horas, obteniendo valores de sólidos extraídos de 118 a 288 mg.[73]

III.3.5 Determinación cualitativa de metabolitos mediante la técnica de tamizaje fitoquímico

Esta es una técnica que se utiliza para detectar metabolitos secundarios presentes en especies vegetales, desde el punto de vista cualitativo y se basa en la realización de reacciones químicas con diferentes reactivos, donde la aparición de determinado color o precipitado coloreado o no es indicativo de la presencia de un determinado metabolito.

Se evaluó cualitativamente la composición química de cada lote siguiendo la técnica establecida para el tamizaje fitoquímico reflejándose los resultados en la tabla VIII.

Estos ensayos no brindan un criterio absoluto y confirmativo de la presencia de estos compuestos, pues se pueden producir numerosas interferencias en estas reacciones, sin embargo, esta técnica sí da un criterio de la composición química que pueda existir en un extracto de una droga vegetal.[24, 74]

Tabla VIII. Tamizaje fitoquímico de las hojas de la especie en los diferentes extractos para las zonas de colecta

		Extracto etéreo		Extracto Etanólico 95%		Extracto acuoso	
Metabolitos	Ensayos	GP	SIB	GP	SIB	GP	SIB
Alcaloides	Drayendorff	-	-	-	-	+++	+++
	Mayer	-	-	++	-	++	++
	Wagner	-	-	+	+	+++	+++
Triterpenos y Esteroides	Lieberman	+	+	+	+	N/R	N/R
	Solkowski	+	+	-	+	N/R	N/R
	Rosemheim	-	-	-	-	N/R	N/R
Quinonas	Borntrager	-	-	-	-	N/R	N/R
	Variante	-	-			N/R	N/R
Cumarinas	Baljet	+	+	-	-	N/R	N/R
	Legal	-	-	-	-	N/R	N/R
	Hidroxomato férrico	-	-	+	-	N/R	N/R
Aceites esenciales	Sudán III	+	+	+	+	+	+
	C/papel blanco sin reactivo	+	+	+	+	+	+
Saponinas	Espuma	N/R	N/R	+	+	-	+
Azúcares reductores	Fehling	N/R	N/R	+	+	+	+
	Benedict	N/R	N/R	+	+	+	+
Fenoles y taninos	Cloruro férrico	N/R	N/R	+	+	+	+
	Gelatina	N/R	N/R	+	+	N/R	N/R
	Cafeína	N/R	N/R	+	+	N/R	N/R

Flavonoides	H_2SO_4	-	-	+	+	-	-
	Shinoda	N/R	N/R	+	+	+	+
	Álcalis	+	+	-	-	+	+
Mucílagos	Molish	N/R	N/R	N/R	N/R	-	-
Principios amargos y Astringentes	Sabor	N/R	N/R	N/R	N/R	SA	SA
Aminoácidos	Ninhidrina	N/R	N/R	+	+	N/R	N/R
Carbohidratos	Molish	N/R	N/R	N/R	N/R	+	+
Resinas	Resinas	N/R	N/R	-	-	N/R	N/R

Leyenda: N/R (no se realiza), +(positivo), - (negativo), GP (Gran Piedra), SIB (Siboney), SA (Sabor amargo)

En las determinaciones para alcaloides resultaron ser positivo en abundancia en el extracto acuoso para cada ensayo perteneciente a estos metabolitos en las dos zonas de colecta con la aparición de precipitado rojo ladrillo (Drayendorff), turbidez definida (Mayer) y precipitado carmelita (Wagner).En el caso del extracto etanólico 95% para el ensayo de Mayer resultó positivo en las hojas colectadas en la zona de la Gran Piedra y para el ensayo de Wagner las tres zonas de colectas dieron resultados satisfactorios, no siendo así para el caso del extracto etéreo donde en ninguna de las área recolectadas se evidenció la presencia de los mismos. Un estudio realizado por Carolina Vásconez en el 2014 al mesocarpo del fruto de la naranja agria, donde se le realizó tamizaje fitoquímico también se evidenció la no presencia de alcaloides en el extracto etéreo.[71] La presencia de estos metabolitos, otorgan a la naranja agria, una gran cantidad de propiedades terapéuticas, como estimulantes cardíacos y cerebrales que han sido objeto de estudios, y en muchos casos, se ha confirmado su eficacia al momento de ser utilizada como planta medicinal.[75]

En el caso de triterpenos y esteroides la reacción de Lieberman-Burchard evidenció resultados positivos en el extracto etanólico 95% y etéreo con la presencia de un cambio rápido de coloración a verde intenso en todas las zonas colectadas, en el caso del ensayo de Solkowski se evidenció una coloración amarrilla rojiza, en el extracto etanólico 95% y etéreo para las hojas colectadas en las zonas de Gran Piedra y Siboney. Esta reacción es

típica de los esteroides que contienen dos dobles enlaces conjugados, en un mismo anillo, en dos anillos adyacentes o un doble en un anillo adyacente con un grupo hidroxilo. La presencia de terpenos puede estar asociada con la actividad antimicrobiana que presenta esta planta.[76]

En cuanto a las determinaciones para las cumarinas arrojaron evidencia positiva el ensayo de Baljet en el extracto etéreo para las zonas de colecta mediante la aparición de coloración en este caso anaranjado y en el caso del ensayo de hidroxomato férrico resultó ser positivo en el extracto alcohólico para la zona de la Gran Piedra.

La aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro en el ensayo de Sudán III indicó la presencia de aceites esenciales en todos los extractos para cada zona, igual para el ensayo con papel blanco sin reactivo donde se evidenció una mancha que muestra transparencia. La presencia de aceites esenciales pueden ser los responsables de las acciones farmacológicas antiespasmódico y su actuación sobre el sistema nervioso central atribuidas.[77] Este resultado obtenido corrobora con los obtenidos por Elizabeth Murillo y col., en el 2018, donde se evalúa la presencia de aceites esenciales en la especie *Citrus x aurantium* L. con la finalidad de definir el potencial antimicrobiano y citotóxico de los aceites esenciales,[78] así como estudios realizados por el Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria, en la "Guía de cultivos del Ecuador", la cual habla de la presencia de compuestos grasos en este vegetal.[79]

La presencia de espuma persistente por más de 2 min en el extracto acuoso en la zona de recolección Siboney y el extracto etanólico 95% para todas zonas nos permite inferir la presencia de saponinas tanto de tipo esteroidal como triterpénicas.

La aparición de un precipitado rojo en los extractos acuoso y etanólico 95% en todas las zonas demostró la presencia de azúcares reductores para ambos ensayos tanto para Fehling como para Benedict.

La reacción con cloruro férrico en la identificación de fenoles y taninos arrojó resultados positivos en los extractos acuoso y alcohólico, en el caso del extracto etanólico 95% la aparición de una coloración verde oscuro indicó la presencia de los mismos y en cuanto al acuoso se desarrolló una coloración rojo – vino.

Para estos mismos compuestos, pero con los ensayos de gelatina y cafeína realizados al extracto etanólico 95% la presencia de turbidez definida en ambos casos evidenció la presencia de fenoles y taninos.

El ensayo con ácido sulfúrico concentrado para la identificación de flavonoides resultó ser positivo en el extracto alcohólico para una evidencia de una coloración amarilla intensa, siendo esto indicativo de flavonas y flavonoles.

En el caso de la reacción con Shinoda, se evidenció resultado positivo en los extractos etanólico 95% y acuoso, para el alcohólico con la coloración carmelita que tomó el alcohol amílico y para el acuso con la aparición de coloración amarillo.

En cuanto a la reacción con álcalis se arrojaron resultados positivos en los extractos etéreo y acuoso, para una evidencia de coloración amarilla (extracto alcohólico) que es indicativo de falavanonas y flavonas, así como coloración de naranja a rojo (extracto acuoso) siendo indicativo de calconas.

La reacción con Ninhidrina para la identificación de aminoácidos arrojaron resultados positivos para el extracto etanólico 95% con la presencia de del desarrollo de una coloración azul-violáceo.

La presencia de un anillo violáceo en la reacción de Molish en la determinación de carbohidratos resultó una evidencia positiva en el extracto acuoso en todas las zonas donde se recolectaron las hojas de la especie.

Los resultados apuntan hacia la presencia de alcaloides, triterpenos y esteroides, cumarinas, saponinas, aceites esenciales, fenoles y taninos, flavonoides y azúcares reductores. Estos resultaron corrobora lo obtenido en 2013 en un estudio fitoquímico realizado a las hojas maduras donde se evidenció la mayoría de esos compuestos, en abundancia los aceites esenciales, los flavonoides, alcaloides, fenoles y taninos y triterpenos y esteroides.[80] Además se evidenció la presencia de carbohidratos y aminoácidos.

En un estudio realizado por Ojito y col. (2012) para extractos alcohólicos de las hojas de esta planta se obtuvo abundante presencia de quinonas y aminoácidos, taninos, fenoles, flavonoides y dihidroflavonoles, con los aminoácidos y aminas como los de mayor

presencia, resultados que coinciden parcialmente con lo obtenido en nuestra investigación donde no se detectó la presencia de quinonas en este extracto. [81]

En el estudio realizado por Periyanayagam y col. (2013), el tamizaje fitoquímico preliminar mostró la presencia de flavonoides, terpenoides, esteroles, taninos, aceites volátiles, saponinas, proteínas y aminoácidos, carbohidratos, azúcares reductores y ausencia de alcaloides, glucósidos cianogenéticos, glucósidos de antraquinona, glucósidos cardiacos, mucílago y aceite fijo[59] a diferencia de nuestros resultados donde sí se obtuvo la presencia de alcaloides tanto en el extracto etéreo como en el etanólico 95% .

Al analizar los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico realizado a cada extracto de la planta, se comprueba la gran diversidad de metabolitos secundarios con respuestas positivas presentes en la especie *Citrus x aurantium* L., lo que justifica la alta utilidad atribuida a dicha planta en la cura de diversas afecciones.

La mayor diversidad de metabolitos secundarios se identificó fundamentalmente en el extracto alcohólico, lo que justifica el porqué es el extracto más utilizado para la extracción de éstos en las plantas.

III.3.6 Determinación cuantitativa de metabolitos en los extractos.

III.3.6.1 Preparación de los extractos

El agua y el alcohol al 30% fueron los solventes que presentaron mayor capacidad extractiva en la determinación de sustancias solubles. Como no hubo diferencias estadísticamente significativas en la determinación de este parámetro entre los extractos preparados con estos solventes, se escogieron los extractos alcohólicos al 30% de cada punto de colecta, para realizar la determinación cuantitativa de flavonoides, garantizando de esta manera la estabilidad de los mismos.

III.3.6.2 Determinación cualitativa de flavonoides en el extracto alcohólico 30%

La solubilidad de los flavonoides depende de la forma en que se encuentran y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. La agliconas flavonoides altamente hidroxilados son solubles

en etanol, metanol y n-butanol, mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo.[82]

Con el objetivo de corroborar que el metabolito flavonoides estaba presente en el extracto alcohólico se realizó la determinación cualitativa.

Para el ensayo con ácido sulfúrico concentrado la evidencia de coloración anaranjado guinda demostró un resultado positivo para este ensayo, lo que nos permite inferir la presencia de flavanonas. En el caso del ensayo con Shinoda resultó positiva con la presencia de coloración amarilla a naranja siendo esto indicativo de flavonas. En la reacción de álcalis la coloración naranja a rojo que se evidenció en el ensayo nos permite inferir la posible presencia de calconas. En cuanto a la reacción con Rosemheim la aparición de color rojo a marrón en la fase amílica resultó un ensayo positivo.

Estos ensayos cualitativos permitieron comprobar la presencia de flavonoides solubles en el solvente etanólico empleado, resultados similares a los obtenidos en estudios precedentes donde se detectó la presencia de flavonas, flavonoles y flavanonas.[81]

III.3.6.3 Determinación del contenido de flavonoides

Las funciones de los flavonoides en las plantas se pueden resumir en tres grupos: papel de defensa frente a agentes agresores externos como es la radiación UV, bacterias, hongos, insectos y frente a otras plantas; como señal química o marcadores florales que sirven para guiar a las abejas y otros insectos polinizadores hacia el néctar, facilitando la polinización además de estimuladores de la oviposición; finalmente presentan su efecto sobre las enzimas. [83]

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidas en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana. [84]

En este estudio, se cuantificaron los flavonoides por ser metabolitos descritos para esta planta que justifican su utilización como protectores de la pared vascular y alivio de los trastornos circulatorios.

La cuantificación de los flavonoides totales presentes en el extracto alcohólico al 30% de las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L. recolectadas en las diferentes zonas se realizó por el método del $AlCl_3$. Durante el ensayo, las muestras presentaron un color amarillo, lo cual se debe a que el catión de aluminio forma complejos estables con el flavonoide en etanol evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas. El método es exacto, es decir, que es reproducible, proporcionando desviaciones muy pequeñas o ninguna diferencia entre una prueba y otra sobre la misma muestra.

Tabla IX. Resultados obtenidos para flavonoides.

Zonas geográficas	Flavonoides totales (mg de quercetina/g extracto seco)
	Media ± S
Gran Piedra	5,339±0,028[a]
Siboney	3,599 ±0,007[b]

Leyenda: Letras diferentes dentro de una misma columna indican que existen diferencias significativas.

En la tabla anterior se reflejan los resultados obtenidos de flavonoides totales, el valor medio y la desviación estándar de los mismos. Estos valores fueron calculados en base a la curva de calibración obtenida, empleando como patrón quercetina, donde se obtuvo la ecuación: y = 0,0726x + 0.0203; R^2= 0,9931 y nivel de significación p < 0,05. El contenido de flavonoides totales de cada extracto fue expresado en miligramos equivalentes de quercetina/ gramos del extracto.

Se evidencian diferencias significativas entre los valores de flavonoides totales para los extractos de las hojas recolectadas en las diferentes zonas, siendo estos valores mayores para las hojas recolectadas en la zona de la Gran Piedra. Como se plantea en la bibliografía los flavonoides juegan un papel importante en la defensa de las plantas frente a agentes

agresores externos. Entre estos agentes se puede mencionar la radiación UV de los rayos solares, los microorganismos tanto bacterias, como hongos e insectos y otros animales herbívoros, las otras plantas (efecto alelopático) y el entorno (medio ambiente agresivo). De hecho, el metabolismo fenólico se activa en las plantas a nivel de transcripción como una respuesta a diferentes condiciones de estrés tanto biótico como abiótico [(85)]. En esta zona como ya habíamos descrito las condiciones climáticas son diferentes, con prevalencia de un clima lluvioso cálido en la cima a soleado húmedo, alta a humedad relativa y temperatura media anual que varía de 16 a18 ^{0}C, factores que pudieran influir en la expresión de mayor cantidad de flavonoides por las plantas.

Los resultados obtenidos en este estudio se corresponden con las determinaciones de flavonoides totales realizada por Ojito y Col. (2012) en un extracto etanólico de hojas de esta planta donde obtuvieron 4,89 ± 0,88 % de estos metabolitos, determinando también estos investigadores que los extractos ensayados mostraron poder reductor. En otro estudio realizado para cuantificar metabolitos en la cáscara de naranja agria, se reportó un contenido fenólico de 2.23%. [86]

Existen otros estudios que cuantifican el contenido de polifenoles en otras especies de plantas del género Citrus (Rutaceae), como el realizado por Ordoñez y col. (2018) cuando determinó que el contenido de polifenoles totales en cáscaras de 12 cítricos varió entre 3,22 a 0,79 g AGE/100 g usando como patrón el ácido gálico.[(87)] Estos estudios concluyen planteando que la cáscara y hojas de diversos cítricos son fuente importante de antioxidantes naturales, los cuales podrían ser utilizados en estudios de estabilidad antioxidante, capacidad para disminuir enfermedades, incluso desarrollar técnicas de extracción con diferentes tecnologías, así como su posterior aplicación en la industria como aditivos o suplementos alimentarios.

III.4 Factores asociados a las diferencias entre los parámetros farmacognósticos considerados

El cambio global se entiende como la interrelación de cambios inducidos por los procesos naturales y por la acción humana en el ambiente global, y sus implicaciones en el funcionamiento de los ecosistemas naturales y en la sociedad. Este complejo proceso

incluye muchos factores fuertemente interrelacionados entre los que destacan las alteraciones en el clima, conocidas en la actualidad como cambio climático. Las modificaciones en el clima afectarán, de modo importante, a los ecosistemas y en particular a los sistemas semiáridos mediterráneos que pueden verse afectados por una acentuación del estrés hídrico y por un incremento de la aridez.[88]

Las plantas interactúan con el medio ambiente para su supervivencia y están influenciadas por varios factores ambientales, incluidos los estímulos tanto bióticos como abióticos que regulan la biosíntesis de los metabolitos secundarios en las mismas. Las plantas de la misma especie que crecen en diferentes ambientes pueden tener diferencias en la concentración de un metabolito secundario particular. Estos factores abióticos y bióticos causan estreses en las plantas como consecuencia de condiciones desfavorables de los mismos. En respuesta a estos, las plantas producen metabolitos secundarios específicos para contrarrestar estos estreses.

Con el objetivo de evaluar las posibles interrelaciones entre las variables climáticas y los parámetros farmacognósticos, se realizó un estudio de correlación de manera independiente en cada zona teniendo en cuenta las tendencias del comportamiento. Los datos resaltados son los que indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95%.

Para la realización del análisis de correlación se tomaron los valores medios anuales de temperatura, precipitaciones y humedad desde 2010 hasta 2017, reportados en el Anuario Estadístico de Cuba por las estaciones de la Universidad de Oriente y la Gran Piedra, y los valores de los parámetros farmacognósticos determinados en esta investigación correspondientes a cada zona de colecta.

El comportamiento de la correlación entre las variables climáticas, mostró que entre las mismas existe una tendencia a que cuando se incrementan la humedad y las precipitaciones tienden a disminuir las temperaturas y viceversa, para las dos zonas. En general la humedad relativa puede cambiar si cambia el contenido de vapor de agua del aire, pero como este cambio depende de la temperatura, entonces la humedad relativa puede cambiar por dos razones: por cambios en el contenido de vapor de agua del aire o

por cambios en la temperatura del aire,[89] este hecho puede explicar la correlación observada.

En las tablas X y XI se exponen los resultados obtenidos al realizar la correlación entre factores ambientales y parámetros los farmacognósticos en ambas zonas.

Tabla X. Tabla de correlación entre factores ambientales y parámetros farmacognósticos en Gran Piedra

	HUMEDAD	PRECIPITACIONES	TEMPERATURA
PRECIPITACIONES	0,9970		
TEMPERATURA	-0,9843	-0,9679	
CT	-0,6544	-0,5943	0,7775
CSA	0,2506	0,1755	-0,4174
SSA	-0,9533	-0,9272	0,9916
SSALC 30	-0,4839	-0,4152	0,6307
SSALC 70	0,2504	0,1753	-0,4172
SSALC 95	0,7457	0,6923	-0,8515
flavonoides	-0,8660	-0,8250	0,9406

Leyenda: Cenizas totales (CT), sustancias solubles en agua (SSA), sustancias solubles en alcohol al 30% (SSALC 30), agua (CSA), sustancias solubles en alcohol al 70% (SSALC 70) y al 95% (SSALC 95).

Tabla XI. Tabla de correlación entre factores ambientales y parámetros farmacognósticos en Siboney.

	HUMEDAD	PRECIPITACIONES	TEMPERATURA
PRECIPITACIONES	0,0274		
TEMPERATURA	-0,3592	-0,9427	
CT	0,5000	0,8794	-0,9878
CSA	-0,0644	-0,9993 *	0,9544
SSA	0,4779	0,8912	-0,9914
SSALC 30	-0,6206	0,7668	-0,5089
SSALC 70	0,0110	0,9999 *	-0,9372
SSALC 95	0,3777	0,9359	-0,9998
Flavonoides	-0,9820	0,1620	0,1764

Leyenda: *Correlación estadísticamente significativa con un 95% de confianza, cenizas totales (CT), sustancias solubles en agua (SSA), sustancias solubles en alcohol al 30% (SSALC 30), agua (CSA), sustancias solubles en alcohol al 70% (SSALC 70) y al 95% (SSALC 95).

En la Gran Piedra (Tabla X) la tendencia es a que se incrementan cenizas totales (CT), sustancias solubles en agua (SSA), sustancias solubles en alcohol al 30% (SSALC 30) y flavonoides, cuando se incrementan la humedad y las precipitaciones o cuando disminuye la temperatura. La tendencia es contraria para cenizas solubles en agua (CSA), sustancias solubles en alcohol al 70% (SSALC 70) y al 95% (SSALC 95).

En Siboney (Tabla XI) al incrementarse las temperaturas o disminuir las precipitaciones y la humedad la tendencia es a que se incrementen cenizas solubles en agua (CSA), sustancias solubles en alcohol al 30% (SSALC 30) y flavonoides. De la misma manera tienden a disminuir las cenizas totales (CT), sustancias solubles en agua (SSA), sustancias solubles en alcohol al 70% (SSALC 70) y al 95% (SSALC 95). Destacando para un 95% de confianza la correlación entre CSA y SSALC 70 con las precipitaciones.

El clima es un componente esencial del sistema. Es de vital importancia tener en cuenta el efecto que este ejerce en los procesos fisiológicos que dan lugar al crecimiento y desarrollo de las plantas.[90]

Según Santivañez en 2001 la productividad de los cultivos está gobernada por complejas interacciones entre el clima y los proceso ecofisiológicos que estos conllevan. El éxito productivo no solo depende de la intensidad de los estímulos climáticos sino también de la secuencia temporal de estos durante el ciclo de la vida de los cultivos. La temperatura, la radiación solar y el agua en el suelo son los tres principales factores meteorológicos que regulan los procesos ecofisiológicos y metabólicos en las plantas. [91]

La ocurrencia de bajas y altas temperaturas, la variación entre la humedad relativa y evaporación, son la principal limitante para los cultivos. Uno de los aspectos más importantes en la producción de plantas medicinales es alcanzar altos rendimientos de material vegetal y elevados contenidos de principios activos, lo que depende de factores internos de la planta, como son aquellos relacionados con el adecuado crecimiento de la especie en cuestión, los referidos a la recolección y también las condiciones climáticas, pues como seres vivos las plantas están en constante interacción con el medio que las rodea; esencialmente el clima influye en un momento determinado en su crecimiento y desarrollo, en especial en la producción de sus metabolitos secundarios.[92]

El ensayo de determinación de sustancias solubles se basa en la separación de los metabolitos presentes en la planta por disolución de cada componente, sirviéndose de uno o varios disolventes. En el análisis de correlación de este ensayo con la temperatura, para la Gran Piedra, el resultado arrojó que existe una correlación lineal directa entre ellos para las SSA y SSALC 30 e inversa para SSALC 70, SSALC 95. Para Siboney el resultado obtenido fue diferente, donde se muestra que con el incremento de las temperaturas las sustancias a extraer en estos solventes disminuirían. Estos resultados se pueden corroborar con lo planteado por Azhar N y col., 2011 donde plantea que altas temperaturas causan estrés por calor en las plantas, disminuye la conductividad estomática y, en consecuencia, reduce la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas. La alta temperatura también afecta la producción de metabolitos. A alta temperatura, ocurre una disminución en la eficiencia fotoquímica causando un aumento en el estrés en las plantas. Varios estudios mostraron un aumento en la biosíntesis de producción de

metabolitos secundarios en respuesta a altas temperaturas, mientras que algunos estudios mostraron una disminución en los metabolitos secundarios¨.[93]

En nuestro estudio los flavonoides fue el metabolito secundario cuantificado, observándose que a medida que la temperatura es menor y aumentan la humedad y las precipitaciones se obtienen en mayor proporción, esto puede constituir la base para posteriores investigaciones para esta planta teniendo en cuenta que cada especie vegetal reacciona de manera diferente a las variaciones climáticas. Además, como ya habíamos planteado los flavonoides juegan un papel importante en la defensa de las plantas frente a agentes agresores externos. Entre estos agentes se puede mencionar los microorganismos tanto bacterias, como hongos e insectos y el medio ambiente agresivo. En esta zona también se obtuvo la mayor cantidad de hojas ennegrecidas que puede también estar relacionado con las bajas temperaturas y por ende la necesidad de la planta de producir estos metabolitos. Por otro lado, es de destacar que la alta humedad de esta área es propicia para la proliferación de hongos activando también este mecanismo de defensa.

En la Universidad Autónoma de Baja California Sur situada al sur del Estado de Baja California Sur, México, se desarrolló un experimento durante 3 años (2002 – 2004). Evaluándose los datos climáticos en la zona. Las variables climáticas evaluadas fueron temperatura (T), humedad relativa (HR), evaporación (E), promediados por décadas para el período correspondiente al desarrollo de la investigación, mientras que las variables biológicas fueron rendimiento, área foliar (AF) e índice de área foliar (IAF), tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN) y masa seca. Los resultados mostraron la relación de la temperatura y la humedad relativa con el rendimiento, lo que establece que para el máximo rendimiento de albahaca en las condiciones en que se condujo el experimento la temperatura de 32 ^{o}C y la humedad relativa de 58 % fueron las mejores.[92]

En la bibliografía se relata un trabajo que se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de las precipitaciones sobre el rendimiento de la especie *Coffea canephora Pierre ex Froehner* cultivada en suelos Pardos en dos macizos cafetaleros de la región oriental de Cuba, encontrándose una fuerte relación entre las precipitaciones anuales y los rendimientos

máximos estables, en ambos sitios y ciclos, al aumentar las precipitaciones aumentaron los rendimientos.[94]

Estos resultados obtenidos en nuestro estudio nos permiten plantear que existen relación entre las variables climáticas y los parámetros farmacognósticos estudiados que pueden estar influenciados por los impactos negativos del cambio climático que se reflejan en la consecuente agudización de los períodos de sequía, la ocurrencia de lluvias intensas, la elevación de la temperatura y el incremento de las penetraciones del mar, así como de la intensidad y frecuencia de fenómenos extremos como los huracanes ya que en el periodo comprendido para la selección de los datos climáticos se incluye el paso del devastador huracán Sandy por estas zonas.

Los factores climáticos asociados a las diferencias entre los parámetros farmacognósticos considerados son la temperatura, la humedad y las precipitaciones afectando de manera diferente en las dos zonas estudiadas.

Conclusiones

1. Las características macromorfológicas de las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L. recolectadas en la zona de La Gran Piedra y Siboney fueron similares a excepción del largo y el peciolo que fueron superiores para la Gran Piedra, ambas se encuentran dentro de los límites establecidos para la especie; las hojas colectadas en la zona de La Gran Piedra tienen mayor porciento de hojas ennegrecidas y mayor porciento de materia orgánica e inorgánica que las recolectadas en Siboney.
2. Los valores obtenidos para el contenido de humedad en las hojas de la especie en los dos lugares de colecta se encontraron dentro del límite establecido, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el contenido de cenizas, se obtuvo mayor cantidad de sustancias extraídas para los solventes acuoso y etanol al 30 % respectivamente en ambas zonas de colecta, la mayor diversidad de metabolitos secundarios se identificaron fundamentalmente en el extracto etanólico sin diferencias entre las zonas, los valores mayores de flavonoides totales fueron encontrados en las hojas recolectadas en la zona de la Gran Piedra.
3. Los factores climáticos asociados a las diferencias entre los parámetros farmacognósticos considerados son la temperatura, la humedad y las precipitaciones, afectando de manera diferente en las dos zonas estudiadas.

Recomendaciones

1. Continuar el estudio en un tiempo más extenso, determinando periódicamente las características farmacognósticas y las concentraciones de flavonoides de las hojas para correlacionar directamente la posible variación de estos parámetros con las variaciones climáticas producidas en ese periodo.
2. Realizar el estudio en varios meses para estandarizar estos parámetros y proponer su inclusión como droga oficial para desarrollar alguna forma farmacéutica a partir de las hojas.

Referencias Bibliográficas

1. Tabloides de Plantas Medicinales “Universidad para Todos” Editorial Abril. 2004; 13-16
2. Manual de plantas medicinales. Disponible en: http://www.monografias.com Consultado el 13/05/19
3. Microsoft ® Encarta ® 2009. © 1993-2008 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.
4. Medicina disponible en: http://www.wikipedia.org/wiki/medicina natural/, consultado 17/may/2019.
5. Roig, JT, Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Ed. Científico-Técnica. La Habana. 1988, 839
6. Granda M, Fuentes V, Acosta L, Cabrera I., Sustancias biológicamente activas en: Plantas medicinales I. La Habana: CIDA.1988; 4 -7.
7. Jayasuriya DC. The regulation of medicinal plants - a preliminary review of selected aspects of national legislation. Un published Report .2016;1-49
8. Stampella PC. Historia local de Naranja Amarga (*Citrus × Aurantium* L., Rutaceae) del Viejo Mundo Asilvestrada en el Corredor De Las Antiguas Misiones Jesuíticas de la provincia de misiones (Argentina). Caracterización desde una perspectiva interdisciplinaria. Universidad Nacional DE La Plata 2015
9. FITOMED disponible en http://www.sld.cu/fitomed/index.htm. Consultado: 22 de mayo 2019
10. Houghton, JT. Callander, BA. y Varney, S. “Climate Change ": Supplementary report to the scientific evaluation of the IPCC. Cambridge University Press, Cambridge. 2016; 69-95
11. Agbicodo, E.M.; Fatokun, C.A.; Muranaka, S.;Visser, R.G.F.; Linden VAN DER, C.G. Breeding drought tolerant cowpea: constraints, accomplishments, and future prospects. Euphytica (Holanda). 2016; 167(3):353-370.
12. Planos Gutiérrez et al. Impacto del cambio climático y medidas de adaptación en Cuba, 2013, Eds.).

13. Iturralde, V y S. Peligros y vulnerabilidades de la zona marino-costera de Cuba: estado actual y perspectivas ante el cambio climático hasta el 2100, ISBN 9592703388, 9789592703384. 2015.
14. Calderon, R. Los PPARs y el corazón. Editorial. Revista Peruana de Cardiología. Setiembre – Diciembre. 2003. Pp 135-137.
15. Miranda M. Farmacognosia y Productos naturales.. 1ª ed. Editorial. Félix Varela. Cuba. 2001; 141, 207, 291-292
16. Miranda M, Cuellar A. "Mención en Productos Naturales y Terapéuticos". Escuela de Post-Grado. UNT. Cuba 2002. pp.:3-5
17. Bustamante SE, Muñoz J, Gallardo R, Figueroa H, Morales M. El extracto de Vitis vinifera revierte la disfunción vascular aórtica inducida por diabetes en ratas. Libro de resúmenes III Congreso Internacional de Fitoterapia y Técnicas afines "Ciudad de Oviedo", Sociedad Asturiana de Fitoterapia, Oviedo, España. 22-24/11/2002. pp 93-99.
18. García D, et al: Estudio Farmacognóstico de *Ocimum Tenuiflorum* L. Albahaca Morada. Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos. Revista Cubana Plantas Medicinales 1998;3 (2):73-8.
19. Muruganandan S, Gupta S, Kataria M, Lal J, Gupta PK. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac andrenal tissues in rats. Toxicology. 2002 Jul 15;176(3):165-73 .
20. Santillán, M.L. El uso tradicional de las plantas medicinales, un aporte para la ciencia. Salud Ciencia UNAM 2012. Disponible en: http://ciencia.unam.mx/leer/97/El_uso_tradicional_de_las_plantas_medicinales_un_aporte_para_la_ciencia. consultado marzo 2019
21. Cortez G, V. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. Rev. Biomedica. 2014; 15: 123-136.

22. Rivero A. Betancort J. Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas. Práctica VI.3. Practical Studies for Medicinal Chemistry: An integrating approach for developing countries.
23. García A, Rocha RI. Efecto de *Mangífera indica* sobre la hiperglicemia aguda en ratas normoglicémicas. Tesis. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. [Periódico en la Internet]. 2005.
24. Farmacognosia y Química de los Productos Naturales disponible en: http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb041527.pdf
25. Azcón-Bieto, J., Talón, M Factores ambientales y el suelo en la actividad metabólica de plantas medicinales disponible en:https://www.ucm.es/edafologia/factores-ambientales-y-el-suelo-en-la-actividad-metabolica-de-plantas. Consultado el 8 de abril de 2019.
26. Efectos del suelo sobre la el crecimiento y desarrollo de las plantas medicinales disponible en: https://www.madrimasd.org/blogs/universo/2012/03/26/141581
27. Acosta de la Luz L. Principios agroclimáticos para la producción de plantas medicinales. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Vol. 8 No. 2. versión on-line ISSN 1028-476. 2003.
28. Reyes Mejía F. Factores que intervienen en el crecimiento y desarrollo de las plantas , enero 2016 disponible en http://fulreyes3.blogspot.com/consultado el 12 de marzo de 2019.
29. Taiz, L., Geiger, E. effects of temperature on plants. Publicacions de la Universitat Jaume I, Castellón de la Plana, 2015; 66p.
30. CEMAT, Naranja. Guatemala: Centro Mesoamericano de estudios sobre tecnología apropiada. Fichas técnicas sobre plantas medicinales, Serie 4, No. 4, Mayo 2014
31. Thomson, W. A. R. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. Barcelona: Ed. Blume, 2014. 220p.
32. Reynolds, J. E. F. (Editor). Martindale: The Extra Pharmacopoeia. London: The Pharmaceutical Press, 2014. 39(327): 440.

33. Juan Tomás Roig y Mesa. Plantas medicinales, aromáticas o venosas de Cuba. Tomo II. Editorial Científico-Técnico, La Habana.2012; 569-1135
34. Batistuzzo, J.A.O., Eto Y., Itaya M. Formulário Médico-Farmacêutico, Tecnopress, 1ª edição, 2013; 147-229.
35. Ş. Karabıyıklı, H. Değirmenci, and M. Karapınar, "Inhibitory effect of sour orange (Citrus aurantium) juice on Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes," LWT - Food Science and Technology, vol. 55, no. 2, pp. 421–425, 2014.
36. M. Moraes, H. Kushima, F. C. Moleiro et al. Effects of limonene and essential oil from Citrus x aurantium on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. Chemico-Biological Interactions. vol. 180. No 3. 2015; 499–505.
37. MR, Loizzo et al. Evaluation of Citrus aurantifolia peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. J Sci Food Agric. 2012 Dec;92(15):2960-7. doi: 10.1002/jsfa.5708. Epub 2012 May 16.
38. Torres, Nilka L.; Laurido, Claudio; Pavan, María Fernanda; Zapata, Alvin; Martínez, JoséL. Plantas medicinales de Panamá 2: Etnobotánica de la Reserva Forestal La Tronosa, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 16, núm.4, 2017; 361-384.
39. Abrego AA,. Actividad inmunomoduladora del jugo de naranja (Citrus sinensis) var. Valencia sobre la proliferación de Linfocitos B. Tesis de Maestría en Ciencias alimentarias, Universidad Veracruzana, Veracruz, México 2016.
40. Al-Snafi AE.2016. Nutritional value and pharmacological importance of citrus species grown in Iraq. IOSR J Pharm 6: 76-108.
41. Capitulo 2. Requerimientos climáticos. 1-44. Disponible en: http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/20829/Capitulo2.pdf. Consultado el 15 de mayo 2019.
42. Jarma Orozco, A.; Cardona Ayala, C.; Araméndiz Tatis, H.: Fisiología plantas y cambio climático. Rev. U.D.C.A Act. &Div. Cient. 15(1): 63 - 76, 2012

43. Hansen J.; Sato M,; Nazarenko, L.; Ruedy, R.; Lacis, A.; Koch, D.; Tegen, I.; Hall, T.; Shindell,D.; Stone, P.; Novakov, T.; ThomasonL.; Wang, R.; Wang,Y.; Jacob, D.J.; Hollandsworth-Frith, S.; Bishop, L.; Logan, J.; Thompson, A.; Stolarski, R.; Lean, J.; Willson, R.; Levitus, S.; Antonov, J.; Rayner, N.; Parker, D.; Christy, J. 2002. Climate Forcings In The Goddard Institute For SpaceStudies Si2000 Simulations. J. Geophys. Res. (Estadosunidos). 107(D18):4347-4384.
44. Mera RJ; Niyogy D et al. Potencial individual vesrus simultaneous climate change effects on soybean (C3) and maize (C4) crops. An agrotechnology model based study. Global and Planetary Change (Reunido Unido).54(1-2):163-182.
45. LU, YAO-CHI. An Economic Analysis of Climate Change on Cotton Production Across the U.S. Cotton Belt. Disponibleen: http://www. ars.usda.gov/research/publications/Publications. 2013.
46. REDDY, K.; HODGES, H. Impacts of climatechange on cotton production: a Southcentral assessment. Disponible desde Internet en: http://nigec.ucdavis.edu. 2014.
47. Arce, M. E. Trabajo Práctico: Diversidad De Plantas -Diversidad Vegetal. Universidad Nacional De La Patagonia San Juan Bosco, departamento de Biología General, 2016;1-17
48. Riedeman, P.; Teillier, S.; Aldunate, G.Guía de campo. Arbustos ornamentales del centro sur de Chile. Corma.2014; 1-312
49. Ochoa A, López T, Colombat M. Farmacognosia y Química de los productos naturales. Monografía. Cuba; 2002: p.14-15, 15-30
50. Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 309. Métodos de Ensayo de Droga cruda, MINSAP; 1991. p.30-40.
51. Intriago, H. O.; Celiano, M.; Terán, O. y Noa, A. “Composición química del fruto de dos especies del Bosque Seco Tropical en la región costera del Ecuador como

fuente de alimento para los rumiantes". Centro Agrícola, vol. 42, no. 2, 2015, pp. 61-65, ISSN 0253-5785, 2072-2001.

52. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. FoodChem. 2004; 84 (3): 329-339.
53. Anuario Estadístico de Cuba. Oficina Nacional de Estadística e Información . República de Cuba (ONEI). 2017. disponible en http://www.one.cu/.
54. Fong G Ansel., Maceira F David., Alverson, William S, M. Shopland Jennifer. Cuba: Siboney-Juticí. 2005;1-204.
55. Fong GA, Méndez Hernández A.A. Reserva de la Biosfera Baconao. Biodiversidad y Huracanes. 2017; 1-82
56. Plan de Manejo Paisaje Natural Protegido Gran Piedra. BIOECO-EAF GP.2016; 1-111
57. Beurton, C.. Rutaceae. Flora de la República de Cuba. Fascículo 14(3). Serie A. Plantas Vasculares. A. R. Gantner Verlag KG. FL-9491 Ruggell, Liechtenstein 2008;1-263
58. Periyanayagam K., Dhanalakshmi S., Karthikeyan V. Pharmacognostical Sem and edax profile of the leaves of *Citrus x aurantium* L,. (Rutaceae). novare Journal of Health Sciences, Vol1, Issue2, 2013; 17-23
59. MERCOSUR/XLII SGT Nº 11/P.RES Nº_/14 Farmacopea MERCOSUR: Farmacognosia disponible en: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/mercosur/ACTA01-14/AGREGADO_XVI/P_Res_Farmacognosia_ES.pdf.
60. Patel P, Patel NM, Patel PM. Who guidelines on quality control of herbal medicines. Int J Res 2011; 2(4):1148-1154.
61. Organización de Las Naciones Unidas para La Agricultura y La Alimentación. Agricultura ecológica: medio ambiente y seguridad alimentaria. 2003. http://www.fao.org/3/y4137s/y4137s00.htm
62. Marco Tulio Sánchez Calle. Manual de producción de cítricos. Dirección Regional de Agricultura Lima. Dirección de Promoción Agraria. 2009. www.monografías .com

63. Ministerio de Agricultura y Ganadería Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola, libro Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas, (1991) San José Costa Rica. Pag 300.
64. García Reyes, Génesis Antonela Matilde, Inga Iman, Maria Aracely Yackely. Los suelos y sus tipos. disponible en: https://www.monografias.com/trabajos105/suelos-y-sus-tipos/suelos-y-sus-tipos.shtml
65. Miranda, M., y Cuellar, A. Manual de Prácticas de Laboratorio. Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana: Editorial Félix Varela. 2000; 207-13
66. Castillo y Col. Cinética de secado de la hoja de naranja amarga (Citrus Aurantium), bajo condiciones controladas y en un secador solar directo con convección natural y forzada. Revista de Sistemas Experimentales Junio 2017 Vol.4 No.11, 34-41.
67. Kuklinski, Farmacognosia, estudio de las sustancias medicamentosas de origen natura, Barcelona, España, Omega. 2000
68. Temas de Farmacognosia. Plantas medicinales. https://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/m%C3%A9todos-de-an%C3%A1lisis-de-droga/determinaci%C3%B3n-de-cenizas/
69. Real Farmacopea Española: Publicada Por El Ministerio De Sanidad Y Consumo, Por Mandato De La Ley 25/1990, De 20 De Diciembre, Del Medicamento. 2a. ed. Madrid. Boletín Oficial del Estado, 2002.
70. British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia. London: TSO; 2016.
71. Vásconez M, CE. Comprobación del efecto laxante del extracto hidroalcohólico del mesocarpo del fruto de la Naranja Agria (*Citrus aurantium*) en ratones. Tesis de grado. 2015.
72. Temas de Farmacognosia. Plantas medicinales y Productos naturales. Determinación de sustancias extraíbles. Disponible en: https://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com.

73. Ceylan Aka et al. Pharmacopoeia Analysis of Citrus aurantium L. Ssp. Amara engl. and it's fixed oil contente. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research Vol 51 Issue 3 2017.
74. Murillo E. et al. Evaluación preliminar de la actividad hipoglicemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante in vitro de extractos de Bauhiniak albreyeri Harms. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. Vol. 35 (1). 2006.p-64-80.
75. Thomson, W. A. R. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. Barcelona: Ed. Blume, 2015. 220p
76. Mabberley, D. J. Citrus (Rutaceae): A Review of Recent Advances in Etymology, Systematics and Medical Applications. 2004.Blumea 49: 481-498
77. Matiz G, Osorio MR, Camacho F, Atencia M, Herazo J. Diseño y evaluación in vivo de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), *Citrus x aurantium),* albahaca (*Ocimum basilicum L)* y ácido acético. Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud. 2012;32(1):1-27.
78. Perea E. y col. Potencial antimicrobiano y citotóxico del aceite esencial de *Citrus aurantium* (naranja agria) *y de Swinglea glutinosa* Merr (limón de cerco). Revista Cubana de Plantas Medicinales Volumen 23, Número 3.2018
79. Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria. Guía de cultivos del Ecuador. Quito-Ecuador. 1994, pp 42-86
80. Naranja agria. Dispnible en: http://isnaya.org.ni/FCNMPT/laboratorio/naranja-agria.php. 2013.
81. Ojito Ramos Katia, Herrera Sánchez Yamila, Vega Pérez Nadine, Portal Villafaña Orelvis. Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de Citrus spp. (Rutaceae). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2012; 17(4): 368-379
82. A. Bravo y D. Acuña: Evaluación fitoquímica y determinación de flavonoides en hojas de *Ficus benjamina* L. Xilema Vol. 28, 2015;61-67

83. Cartaya, O.; Reynaldo, Inés. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba vol. 22, núm. 2, 2001, pp. 5-14
84. Singleton VL: Flavonoids. En: Childester CO, Mrak EM, Ste-wart Gf (eds.): Advances in Food Research. Nueva York: AcademicPress, 2012, 149-24
85. Faraa, M. y Tahara, S. Fungal metabolismo fflavonoids and related phytoalexins. Phytochemistry, 1999, vol. 2, p. 1-33.
86. Mónica Escobar Blanco I.Q. Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. Tesis para obtener el Título de: Maestra en Ciencias en Alimentos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. México D.F. enero 2010.
87. Ordoñez-Gómez E.S., Reátegui-Díaz, D.; Villanueva-Tiburcio, J.E. Total polyphenols and antioxidant capacity of peel and leaves in twelve citrus Scientia Agropecuaria 9(1) 2018.; 113 – 121
88. Gil Guirado S, López Bermúdez F.. Tendencia de las precipitaciones y temperaturas en una pequeña cuenca fluvial del sureste peninsular semiárido. Boletín de la Asociación de Geógrafos Españoles N.º 56 - 2011, págs. 349-371.
89. Meteorología Básica. http://meteobasica.blogspot.com/2010/11/cambios-en-la-humedad-relativa.html. consultado el 22 de junio 2019.
90. A. Álvarez, R. S. Herrera, Laisury Díaz y Aida Noda Influencia de las precipitaciones y la temperatura en la producción de biomasa de clones de *Pennisetum purpureum*. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 47, Número 4, 2013 p 413-417
91. Santivañez, F.Q.: "El modelado del crecimiento, desarrollo y producción del maíz sobre bases ecofisiológicas mediante el modelos improc", Revista. Argentina. De Agrometeorología, vol.1(1):7-16, 2001.
92. Ruiz Espinoza F H, Marrero Labrador P, Cruz La Paz O, Murillo Amador B y García Hernández JL .Influencia de los factores agroclimáticos en la productividad de

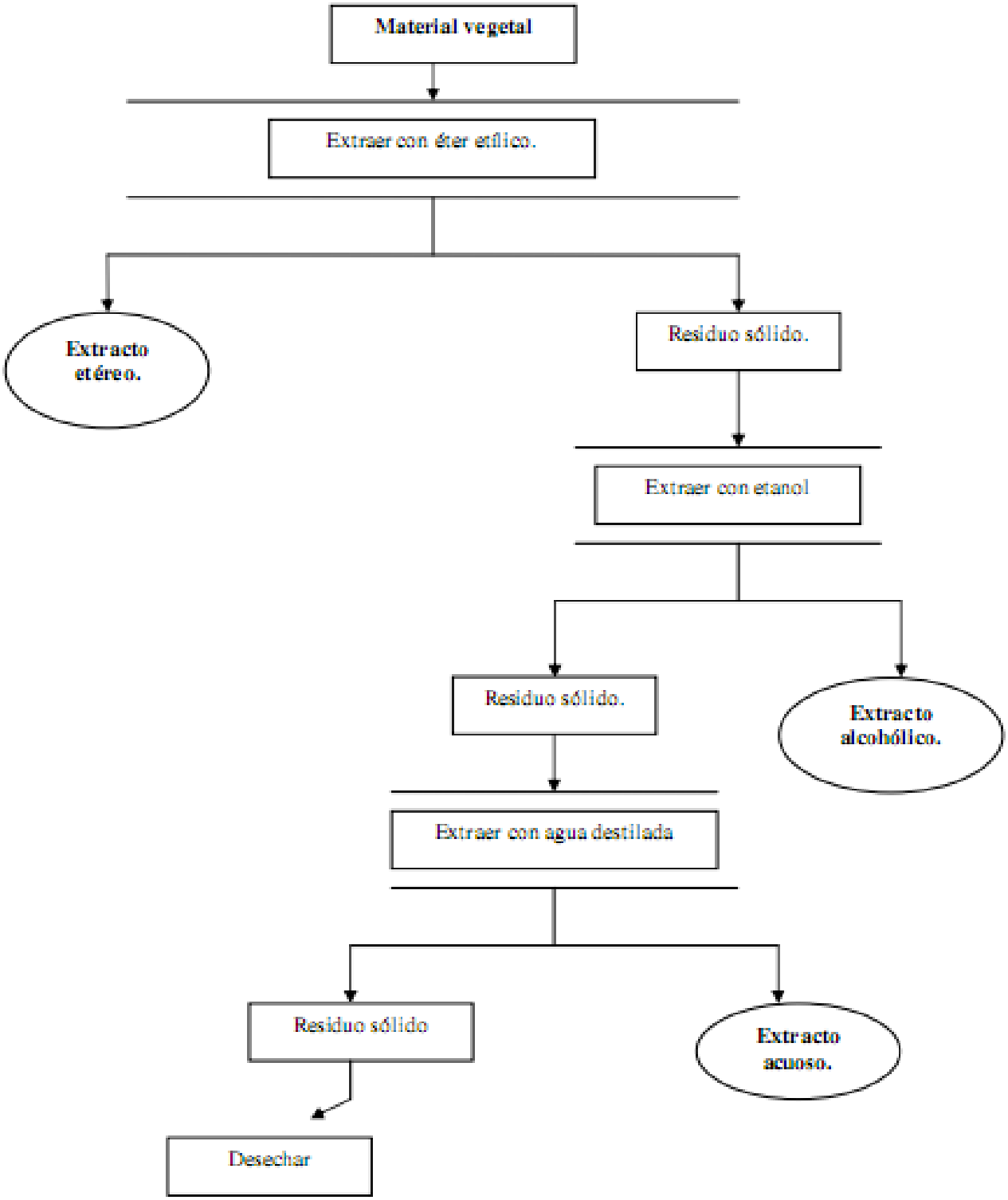
albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en una zona árida de Baja California Sur, México. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias, Vol. 17, No. 1, 2008; 44-47

93. Azhar N, Hussain B, Ashraf MY, Abbasi K, 2011. Water stress mediated changes ingrowth: physiology and secondary metabolites of desi ajwain (*Trachys permumammi* L.). Pak. J. Bot. 43, 15–19.
94. Bustamante G C, Pérez Díaz A, Rivera Espinosa R,. Martín Alonso G M. Influencia de las precipitaciones en el rendimiento de *Coffea canephora Pierre ex* Froehner cultivado en suelos pardos de la región oriental de CUBA. Cultivos Tropicales vol 36 no. 4, 2015; 21-27.

Anexos

Anexo 1. Árbol y partes de la especie *Citrus aurantium L.*

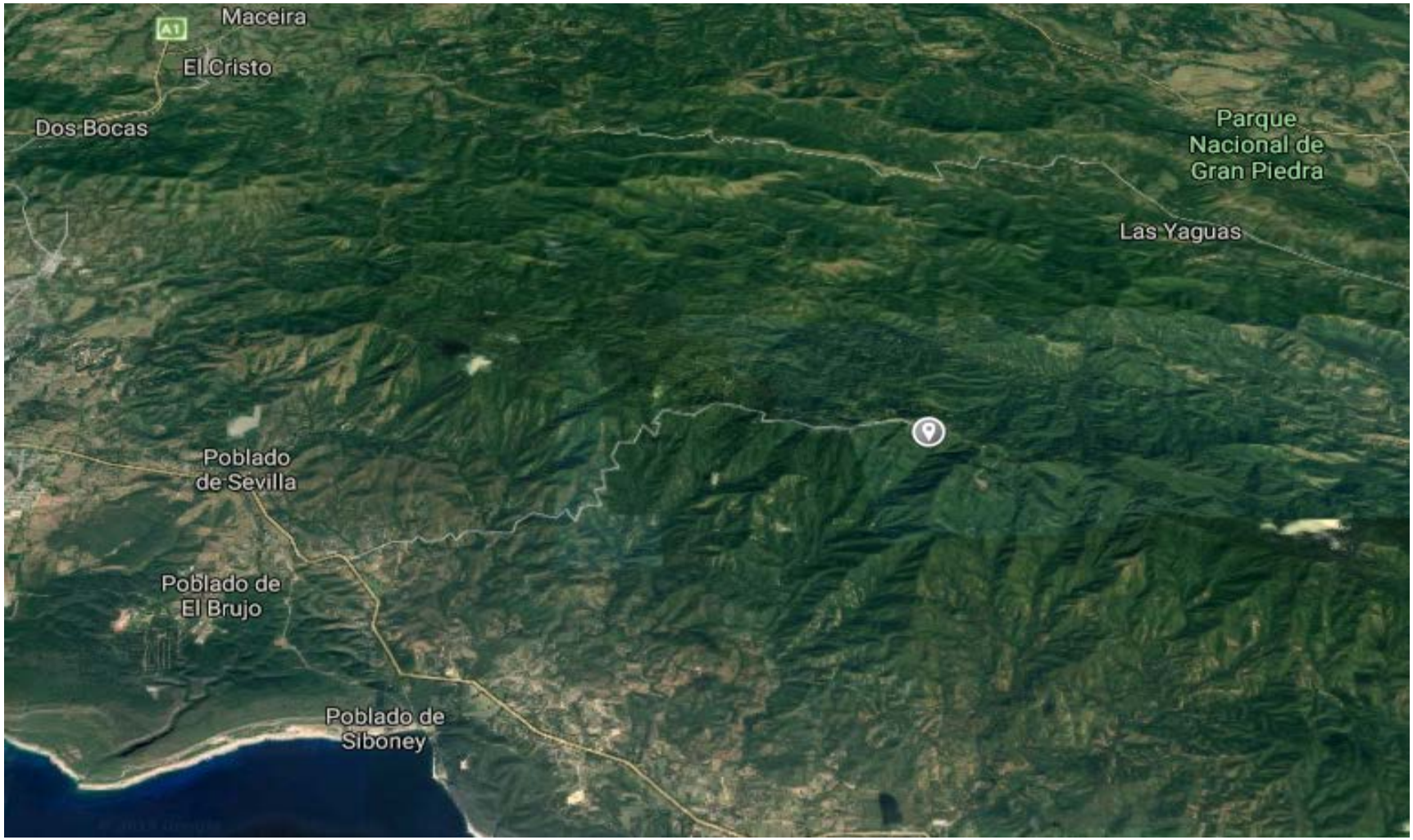
Anexo 2. Esquema de obtención de los extractos para el tamizaje fitoquímico



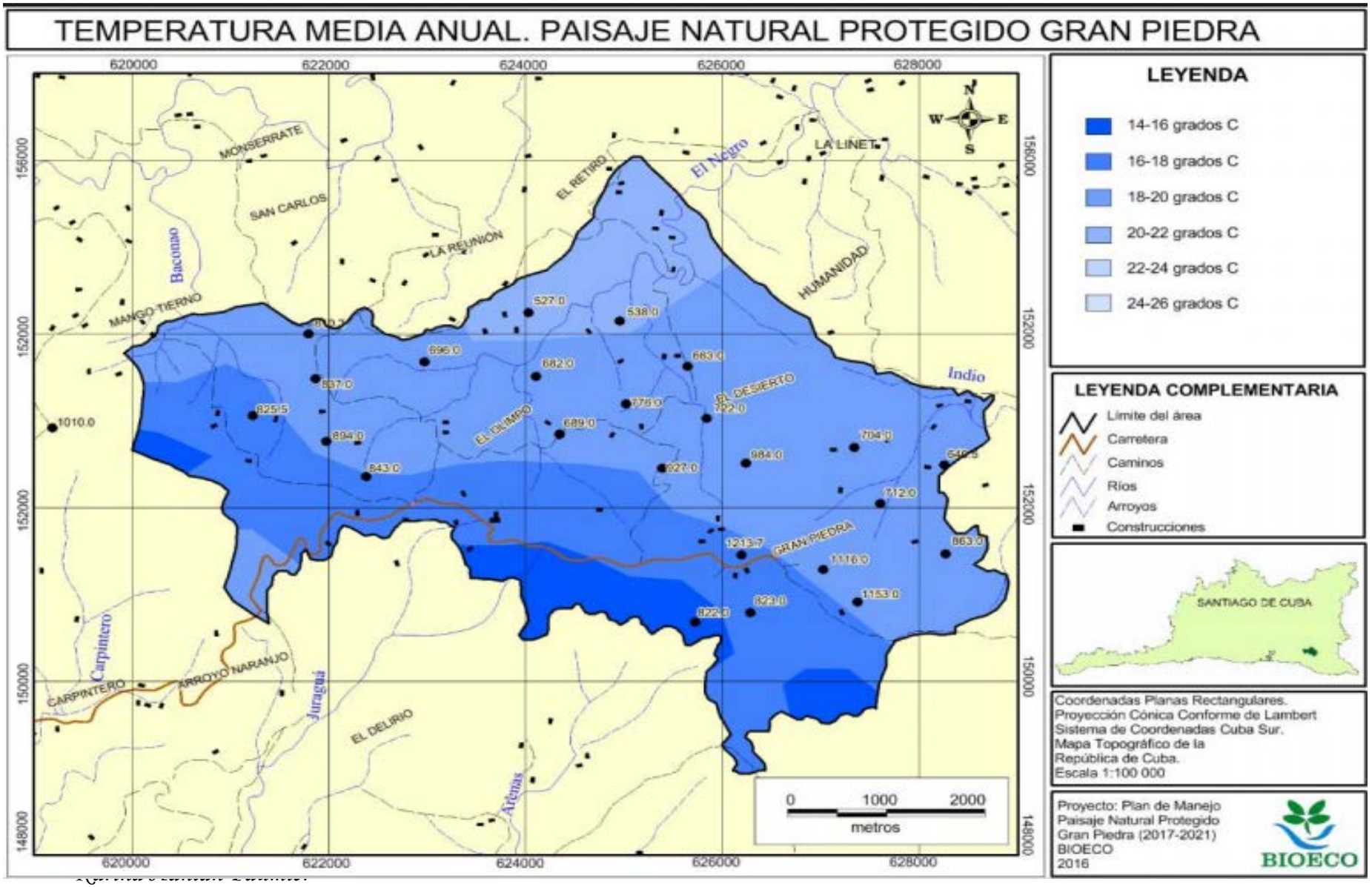
Anexo 3: Zonas Núcleos de la Reserva de la Biosfera Baconao

Anexo 4. Zonas Geográficas Gran Piedra (izquierda)y Siboney (derecha)

Anexo 5: Localización geográfica de los dos zonas geográficas de colecta



Anexo 6: Temperaturas media anual de Gran Piedra



Anexo 7. Identificación taxonómica de la especie

BIOECO
CENTRO ORIENTAL DE ECOSISTEMAS Y BIODIVERSIDAD
investigamos, educamos, protegemos...

MUSEO DE HISTORIA NATURAL "TOMÁS ROMAY"
Direc: José A. Saco # 601, esq. Barnada, C.P. 90100,
Santiago de Cuba, Cuba.
Telef: 53 022 626568; - 620859; - 658777; - 623277
Email: direcc@bioeco.cu

HERBARIO BSC "DR. JORGE SIERRA CALZADO"

Nombre y apellidos: Karina Hanlan Paumier

Institución a que pertenece: Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.

Servicio que solicita:
[X] Identificación taxonómica — Citrus x aurantiium L.
[ ] Utilidad medicinal
[ ] Montaje de muestra
[ ] Asesoría
[ ] Otros

Finalidad del estudio:
[ ] Docente
[X] Estudio fitoquímico
[ ] Estudio genético
[ ] Investigativo
[ ] Estudio molecular
[ ] Otros

Depósito de la muestra en la colección
[X] Si [ ] No

Estado de la muestra:
[X] Buena [ ] Regular [ ] Mala

Número de voucher de la colección:

Identificador: Félix Acosta Cantillo

Fecha: 22 de marzo, 2019

Vto bueno
Lic. Josefina Blando Ojeda
Curadora
Herbario BSC

BIOECO | DIRECCIÓN
CENTRO ORIENTAL DE ECOSISTEMAS Y BIODIVERSIDAD