

DOI: <https://doi.org/10.34069/RA/2022.9.02>

Volumen 5, Número 9/enero-junio 2022

Chil Núñez, I., Pérez Rondón, L., Hanlan Paumier, K., & Costa Acosta, J. (2022). Influencia de variables meteorológicas en la especie medicinal *Citrus x aurantium* L. *Revista Científica Del Amazonas*, 5(9), 14-25. <https://doi.org/10.34069/RA/2022.9.02>

Influencia de variables meteorológicas en la especie medicinal *Citrus x aurantium* L.

Influence of meteorological variables on the medicinal species *Citrus x aurantium* L.

Influência de variáveis meteorológicas na espécie medicinal *Citrus x aurantium* L.

Recibido: 11 de noviembre de 2021

Aceptado: 30 de enero de 2022

Autores:

Idelsy Chil Núñez⁵

Liana Pérez Rondón⁶

Karina Hanlan Paumier⁷

Jainer Costa Acosta⁸

Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar la influencia de determinadas variables meteorológicas en los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L. la especie *Citrus x aurantium* L. (naranja agria) es una planta muy utilizada para la indigestión, trastornos circulatorios, insomnio, erupciones cutáneas y fortalecimiento del sistema nervioso. El crecimiento de las plantas y la producción de compuestos químicos responsables de las propiedades medicinales de las mismas pueden verse afectados por factores ambientales. Se colectó la especie en dos espacios geográficos pertenecientes a la Reserva de la Biosfera Baconao, en Santiago de Cuba. Las hojas se secaron a la sombra. Los parámetros farmacognósticos se determinaron según Norma Ramal de Salud Pública 309. Se realizó la determinación cualitativa de los metabolitos mediante el tamizaje fitoquímico y la cuantificación del contenido de flavonoides empleando el método de Kumazawa. Los resultados revelaron que las hojas colectadas en la zona de La Gran Piedra fueron más largas, con mayor porcentaje de hojas ennegrecidas y de materia orgánica e inorgánica que las recolectadas en la zona de Siboney. Los valores obtenidos para el contenido de humedad y cenizas no presentaron diferencias. La mayor diversidad de metabolitos secundarios se identificó fundamentalmente en el extracto etanólico al 95%. La mayor concentración de flavonoides fue encontrada en las hojas recolectadas en la Gran Piedra.

Palabras clave: características físico geográficas, naranja agria, parámetros farmacognósticos, zona de colecta.

Abstract

The objective of the work was to evaluate the influence of certain meteorological variables on the pharmacognostic parameters of the leaves of the species *Citrus x aurantium* L. The species *Citrus x aurantium* L. (sour orange) is a plant widely used for indigestion, circulatory disorders, insomnia, skin rashes and strengthening of the nervous system. The growth of plants and the production of chemical compounds responsible for their medicinal properties can be affected by environmental factors. The species was collected in two geographical spaces belonging to the Baconao Biosphere Reserve, in Santiago de Cuba. The leaves were dried in the shade. The pharmacognostic parameters were determined according to

⁵ Doctora en Ciencias de la Salud. Profesora Titular. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4661-0472>

⁶ Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8063-5476>

⁷ Licenciada en Ciencias farmacéuticas. Laboratorio Farmacéutico Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8137-3455>

⁸ Licenciado en Biología. Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO), Santiago de Cuba, Cuba. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2914-7340>

Public Health Branch Standard 309. The qualitative determination of the metabolites was carried out by means of phytochemical screening and the quantification of the flavonoid content using the Kumazawa method. The results revealed that the leaves collected in the La Gran Piedra area were longer, with a higher percentage of blackened leaves and organic and inorganic matter than those collected in the Siboney area. The values obtained for moisture and ash content did not show differences. The greatest diversity of secondary metabolites was identified mainly in the 95% ethanolic extract. The highest concentration of flavonoids was found in the leaves collected in the Gran Piedra.

Keywords: collection area, pharmacognostic parameters, physical-geographic characteristics, sour orange.

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência de determinadas variáveis meteorológicas nos parâmetros farmacognósticos das folhas da espécie *Citrus x aurantium* L. A espécie *Citrus x aurantium* L. (laranja azeda) é uma planta amplamente utilizada para indigestão, distúrbios circulatórios, insônia, erupções cutâneas e fortalecimento do sistema nervoso. O crescimento das plantas e a produção de compostos químicos responsáveis por suas propriedades medicinais podem ser afetados por fatores ambientais. A espécie foi coletada em dois espaços geográficos pertencentes à Reserva da Biosfera Baconao, em Santiago de Cuba. As folhas foram secas à sombra. Os parâmetros farmacognósticos foram determinados de acordo com a Public Health Branch Standard 309. A determinação qualitativa dos metabólitos foi realizada por meio de triagem fitoquímica e quantificação do teor de flavonóides pelo método de Kumazawa. Os resultados revelaram que as folhas coletadas na área de La Gran Piedra eram mais longas, com maior porcentagem de folhas enegrecidas e matéria orgânica e inorgânica do que as coletadas na área de Siboney. Os valores obtidos para umidade e teor de cinzas não apresentaram diferenças. A maior diversidade de metabólitos secundários foi identificada principalmente no extrato etanólico 95%. A maior concentração de flavonóides foi encontrada nas folhas coletadas na Gran Piedra.

Palavras-chave: características físico geográficas, laranja azeda, parâmetros farmacognósticos, zona de coleta.

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 (Pijoan, 2004).

El género *Citrus* y dentro de él, 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 (Stampella, 2015; Cheema y Jamali, 2020), 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 (Fitomed, 2019) y no para las hojas, que serán el objeto de esta investigación por el amplio uso que tienen por la población.

Es conocido que 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 (Houghton et al., 2016; Zhiminaicela et al., 2021).

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 (Agbicodo et al., 2016). 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 (Planos et al., 2013). Es una realidad que las sequías se intensifican, así como que la temperatura aumenta y el mar se eleva (Iturralde, 2015) por lo que en vista a los impactos negativos que puede tener el cambio climático, Cuba 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).

El objeto general del estudio es evaluar la influencia de determinadas variables meteorológicas en los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L. en dos zonas geográficas pertenecientes a la Reserva de la Biosfera Baconao (La Gran Piedra y Siboney).

Marco teórico

La especie *Citrus aurantium* L

La especie *Citrus aurantium* L es conocida también como Naranja (Puerto Rico); forbbidenfruit, sour oranje (Estados Unidos) (Roig, 1988). Su clasificación taxonómica se describe como sigue:

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Sapindales</i>
Familia:	<i>Rutaceae</i>
Subfamilia:	<i>Citroideae</i>
Tribu:	<i>Citreae</i>
Género:	<i>Citrus</i>
Especie:	“<i>C. aurantium</i>”

Gráfica 1. Clasificación taxonómica de la especie. Fuente: EcuRed (2021)

El árbol es 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 (Batistuzzo et al, 2013).

La composición química de la especie es: (Karabiyikli, Değirmenci, and Karapınar, 2014; Moraes et. al, 2015) 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: Rivo flavina (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.

Materiales y Métodos

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, del departamento de Farmacia y el laboratorio de Química Analítica del departamento de Química, en la Universidad de Oriente.

Selección del área de estudio

Para la selección de los puntos de colecta 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.

Recolección y procesamiento del material vegetal

Las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L. se recolectaron en el horario de la mañana (Arce, 2016) ya 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. Además, se tuvo en cuenta para la recolección que se encontraran alejadas de las carreteras o caminos para evitar la contaminación por metales pesados. 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.

Secado

Se realizó el secado al aire, a la sombra, teniendo en cuenta que en estudios precedentes se determinó que la especie contiene aceites esenciales volátiles. Se removieron las hojas dos o tres veces al día, y se pesaron hasta obtener peso constante.

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

Se determinaron, según Norma Ramal de Salud Pública (NRSP 309) los parámetros: Análisis Macromorfológico (Macromorfología), determinación de hojas ennegrecidas, determinación de materia orgánica extraña, determinación de materia inorgánica extraña, determinación del contenido de humedad (esta determinación se realizó por el método azeotrópico de tolueno), determinación de cenizas totales, determinación de cenizas solubles en agua, determinación de sustancias solubles.

Determinación cualitativa de los metabolitos mediante el tamizaje fitoquímico

Para el tamizaje fitoquímico, las extracciones siguieron el orden de polaridad creciente al usar éter, etanol 95% y agua destilada en forma secuencial como solventes extractivos por 48 horas.

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 Norma Ramal de Salud Pública 309 (NRSP 309). En 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 método.

Determinación del contenido de flavonoides

La cuantificación del contenido de flavonoides totales se realizó empleando el método de Kumazawa y colaboradores (2004). Este método consistió en mezclar una alícuota de 2 mL de disolución de los extractos hidroalcohólico 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.



Procesamiento y análisis estadístico de los resultados

En 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.

Resultados

Selección del área de estudio

Las áreas seleccionadas para el estudio fueron La Gran Piedra situada a 1 225 metros de altura sobre el nivel del mar y Siboney con una altitud sobre el nivel del mar de hasta 120 metros (Fong et.al, 2005). En el análisis estadístico realizado se pudo apreciar que existen diferencias estadísticamente significativas entre las mismas, para un p -valor ≤ 0.05 .

Identificación botánica y Clasificación taxonómica

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

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

En la tabla 1 se muestran las dimensiones determinadas a las hojas de la especie *Citrus x aurantium L.*

Tabla 1.
 Dimensiones de las hojas colectadas en cada zona de estudio.

Dimensiones de la hoja (cm) (N= 100)	Gran Piedra	Siboney
	Media \pm (S)	Media \pm (S)
Largo	10,88 \pm 1.411 ^a	5,551 \pm 1.7222 ^b
Ancho	5,445 \pm 0.9908 ^a	8,817 \pm 1.1508 ^a
Peciolo	2,635 \pm 0.5634 ^a	1,905 \pm 0.6350 ^b

Leyenda: Letras diferentes indican que existen diferencias significativas. Fuente: Elaborada por los autores

Las características macromorfológicas de la especie en ambas zonas fueron: árbol o arbusto de 4-15 m de alto, inermes 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) es de 6-11 x 3-6 cm, obtusamente agudo o acuminado, a veces \pm emarginado de base redondeada o cuneiforme y margen undulado, serrulado, crenulado o entero. La nervadura es penninervia.

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

Tabla 2.
 Determinación de hojas ennegrecidas, materia orgánica e inorgánica extraña y humedad residual en cada zona de estudio.

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: He: Hojas ennegrecidas; Mo: Materia orgánica; MI: Materia inorgánica, H: humedad residual. Fuente: Elaborada por los autores

Como se puede observar en la Tabla 2, 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.

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 (Kuklinski, 2000).

En la Tabla 3, 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 3.
Determinación de cenizas totales y solubles en agua en las hojas colectadas en las diferentes zonas de estudio.

Parámetros Farmacognósticos	Zonas Geográficas	
	Gran Piedra	Siboney
	Media (± S)	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. Fuente: Elaborada por los autores

Determinación de sustancias solubles

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.

Tabla 4.
Determinación de sustancias solubles

Zonas	Sustancias Solubles			
	Agua	Etanol 30 %	Etanol 70 %	Etanol 95 %
	Media (± S)	Media (± S)	Media (± S)	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. Fuente: Elaborada por los autores.

Determinación cualitativa de metabolitos mediante la técnica de tamizaje fitoquímico.

Se evaluó cualitativamente la composición química de cada lote siguiendo la técnica establecida para el tamizaje fitoquímico, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5.
Tamizaje fitoquímico de las hojas de la especie en los diferentes extractos para las zonas de colecta.

Metabolitos	Ensayos	Extracto etéreo		Extracto alcohólico		Extracto acuoso	
		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
	Caféina	N/R	N/R	+	+	N/R	N/R
Flavonoides	H ₂ SO 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).

Fuente: Elaborada por los autores.

Determinación cuantitativa de metabolitos en los extractos.

Preparación de los extractos

El agua y la solución hidroalcohólica 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 hidroalcohólicos al 30% de cada punto de colecta, para realizar la determinación cuantitativa de flavonoides.

Determinación cualitativa de flavonoides en el extracto alcohólico 30%.

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. 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.

Tabla 6.

Cuantificación de flavonoides totales presentes en el extracto hidroalcohólico 30% de las hojas de la especie Citrus x aurantium L.

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. Fuente: Elaborada por los autores.

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.

Discusión

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 ($10,88 \pm 1,411$ cm), alcanzando valores medios que duplican el largo de las hojas colectadas en la zona de Siboney ($5,55 \pm 1,7222$ cm). En un estudio realizado en la india para las hojas de esta especie Periyannayagam et al, (2013) determinaron que el tamaño de las hojas varía de 8-14cm \times 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 $1-3 \pm 0,2-2$ cm.

Los valores mayores de hojas ennegrecidas se obtuvieron en zona de la Gran Piedra y pueden estar asociados factores ambientales como las bajas temperaturas, propiciando que las plantas tiendan a dañarse, a sufrir cambios en su estructura externa, apareciendo el ennegrecimiento de las mismas, siendo las hojas las más afectadas (Organización de Las Naciones Unidas para La Agricultura y La Alimentación, 2003), esto pudiera explicar los valores obtenidos en esta zona ya que la temperatura mínima media anual es de 12 a 14 0C y la máxima media anual es de 18 a 20 0C, según plantea el Plan de Manejo Paisaje Natural Protegido Gran Piedra editado en el 2006, valores inferiores a los que se reportan para la zona de Siboney. 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. (Sánchez, 2009). 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 (Ministerio de Agricultura y Ganadería Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola, 1991).

El porcentaje 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.

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 %. Estos resultados coinciden con lo reportado por Castillo-Téllez et al, (2017) donde relatan el porcentaje de humedad residual para las hojas de esta especie secadas en un secador solar, obteniendo valores entre 8,75 y 8,85 %.



Como se puede observar en la tabla 2, existen diferencias entre los valores de humedad en las hojas entre ambas zonas, apreciándose que es Siboney la zona que presenta menor valor de humedad residual. Estas diferencias pudieron estar influenciadas por factores ambientales como las precipitaciones y la temperatura. 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 donde las temperaturas son muy elevadas, el régimen de precipitaciones es escaso, el clima es muy cálido por tanto las hojas suelen estar más secas (Oficina Nacional de Estadística e Información, 2017).

Los valores de cenizas totales obtenidos para ambas muestras se encuentran dentro del límite establecido por Farmacopea Británica (2016) que plantea que las cenizas totales no deben exceder de 12 % para plantas medicinales. En un estudio realizado por Vásconez (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%, valores cercanos a los obtenidos en este estudio.

Los valores de cenizas solubles en agua para la zona de La Gran Piedra fueron de $1,585 \pm 0,406$ y para Siboney de $2,536 \pm 1,759$ sin encontrarse diferencias significativas entre ellos, estos resultados son menores que los reportados por Periyanyagam et al, (2013) quienes determinaron que este parámetro mostró un valor de 5.4%. Se puede observar que la zona de Siboney fue en la que se obtuvo mayor de cenizas totales, las características del suelo pueden justificar estos resultados. En esta zona el suelo es de tipo rocoso, de formación caliza que en la zona costera es de origen biógeno y recibe el nombre de formación Jaimanita, 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 (Fong y Méndez, 2017). De ahí los altos valores de cenizas totales obtenidos en esta zona, 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 predominante 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, lo que pudiera generar antagonismo con otros elementos esenciales de las plantas cultivada (Beurton, 2008) evidenciándose también esto, en los resultados para esta determinación.

La comparación de varianzas en la determinación de sustancias solubles 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 solución hidroalcohólica 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 solución hidroalcohólica 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 et al, (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, obteniendo valores de sólidos extraídos de 118 a 288mg.

Los resultados del tamisaje fitoquímico realizado muestran que, en el extracto etéreo, en ninguna de las áreas de colecta se evidenció la presencia de alcaloides. En un estudio realizado por Vásconez (2014) al mesocarpo del fruto de la naranja agria, donde se realizó tamisaje fitoquímico, también se evidenció la no presencia de alcaloides en el extracto etéreo. La presencia de terpenos puede estar asociada con la actividad antimicrobiana que presenta esta planta (Bermúdez-Vásquez, 2019). La presencia de aceites esenciales es importante, ya que estos pueden ser los responsables de las acciones farmacológicas como antiespasmódico y su actuación sobre el sistema nervioso central atribuidas (Stampella, 2015). Este resultado obtenido coincide con los obtenidos por Murillo y colaboradores (2018), donde se evalúa la presencia de aceites esenciales en la especie *Citrus x aurantium* L.

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 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.

Los resultados apuntan hacia la presencia de alcaloides, triterpenos y esteroides, cumarinas, saponinas, aceites esenciales, fenoles y taninos, flavonoides y azúcares reductores. Estos resultados corroboran lo obtenido por otros autores donde se evidenció la presencia de esos compuestos (Perea y col., 2008). En el estudio realizado por Ramos et al. (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 aminos como los de mayor presencia, resultados que coinciden parcialmente con lo obtenido en esta investigación donde no se detectó la presencia de quinonas en este 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 (Martín, 2018). 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 a 18 °C, factores que pudieran influir en la expresión de mayor cantidad de flavonoides por las plantas. Los resultados obtenidos se corresponden con las determinaciones de flavonoides totales realizada por Ojito et al. (2012) en un extracto etanólico de hojas de esta planta donde obtuvieron $4,89 \pm 0,88$ % de estos metabolitos, determinando también estos investigadores que los extractos ensayados mostraron poder reductor.

En este estudio se cuantificó como grupo de metabolitos secundarios los flavonoides, 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.

Conclusiones

Las variables meteorológicas temperatura, humedad y precipitaciones influyeron en la mayoría de los parámetros farmacognósticos y la producción de flavonoides de las hojas de la especie *Citrus x aurantium* L. recolectadas en la zona de La Gran Piedra y Siboney, ubicadas en la Reserva Ecológica de la Biosfera Baconao. Las hojas colectadas en la zona de La Gran Piedra fueron más largas y con mayor porcentaje de hojas ennegrecidas y de materia orgánica e inorgánica que las recolectadas en la zona de Siboney. Los valores obtenidos para el contenido de humedad y cenizas no presentaron diferencias. 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 identificó 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.

Agradecimiento

Agradecemos el apoyo brindado por el proyecto MONITOREO Y MANEJO INTEGRADO DE ECOSISTEMAS COSTEROS ANTE EL CAMBIO CLIMÁTICO EN LA REGIÓN ORIENTAL DE CUBA. (ECOS).

Referencias Bibliográficas

- Agbicodo, E.M., Fatokun, C.A., Muranaka, S., Visser, R.G.F., Linden VAN DER, C.G. (2016). Breeding drought tolerant cowpea: constraints, accomplishments, and future prospects. *Euphytica*, 167(3), 353-370.
- Aka, C., Çalışkan, U.K., Baykara, F., & Şekeroğlu, N. (2017). Pharmacopoeia Analysis of *Citrus aurantium* L. Ssp. *Amara* engl. and its fixed oil content. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3).



- Arce, M.E. (2016). Trabajo Práctico: Diversidad De Plantas - Diversidad Vegetal. Universidad Nacional De La Patagonia San Juan Bosco, departamento de Biología General, 1-17.
- Batistuzzo, J.A.O., Eto, Y., & Itaya, M. (2013). Formulário Médico-Farmacêutico, Tecnopress, 1ª edição, 147-229.
- Bermúdez-Vásquez, M.J. (2019). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 147-163.
- Beurton, C.R. (2008). Flora de la República de Cuba. Fascículo 14(3). Serie A. Plantas Vasculares. A. R. Gantner Verlag KG. FL-9491 Ruggell, Liechtenstein 1263.
- Castillo-Téllez, M., Ovando-Sierra, J.C., Andrade-Durán, J.E., y Lezamazárraga, F. (2017). 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*, 4(11), 34-41.
- Cheema, I.A., & Jamali, H.K. (2020). Growth of Citrus Fruits in Pakistan. *Amazonia Investiga*, 9 (35), 74-81. DOI: <https://doi.org/10.34069/AI/2020.35.11.6>
- EcuRed (2021). Naranja agria. Recuperado de https://www.ecured.cu/Naranja_agria
- Farmacopea Británica (2016). Farmacopea británica. Recuperado de <http://farmacopea.cl/misiones-tecnicas/visita-farmacopea-britanica/>
- Fong, G.A.D., Maceira, F., Alverson, W.S., & Shopland, J.M. (2005). Cuba: Siboney-Juticí. Rapid Biological Inventories, Report 10. The Field Museum, Chicago. 1-204.
- Fong, G.A. & Méndez Hernández, A.A. (2017). Reserva de la Biosfera Baconao. Biodiversidad y Huracanes. 1-82.
- Houghton, J.T. Callander, B.A. y Varney, S. (2016). "Climate Change": Supplementary report to the scientific evaluation of the IPCC. Cambridge University Press, Cambridge, 69-9.
- Iturralde, V.S. (2015). Peligros y vulnerabilidades de la zona marino-costera de Cuba: estado actual y perspectivas ante el cambio climático hasta el 2100. Editorial: Academia. ISBN 9592703388, 9789592703384.
- Karabiyikli, S., Değirmenci, H., Karapınar, M. (2014). "Inhibitory effect of sour orange (*Citrus aurantium*) juice on *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*". *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 421-425.
- Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia, estudio de las sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona. España: Ed. Omega.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*, 84(3), 329-339.
- Martin, G.D.A. (2018). Los compuestos fenólicos: Un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1) DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola (1991). Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas, San José Costa Rica, 300.
- Moraes, M., Kushima, H., Moleiro, F. C. et al. (2015). Effects of limonene and essential oil from *Citrus x aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*, 180(3), 499- 505.
- Murillo, E., Correa, J. Cerquera, C. & Méndez, J. (2018). Potencial antimicrobiano y citotóxico del aceite esencial de *Citrus aurantium* Engl (naranja agria) y de *Swinglea glutinosa* Merr (limón de cerco). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23(3) 2018.
- Ramos, K.O., Sánchez, Y.H., Pérez, N.V., & Villafañá, O.P. (2012). Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(4), 368-379.
- Oficina Nacional de Estadística e Información (2017). Anuario Estadístico de Cuba (ONEI). disponible en <http://www.onei.gob.cu/node/16275>
- Perea, E. y col. (2018). 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*, 23(3).
- Periyanyagam, K., Dhanalakshmi, S., & Karthikeyan, V. (2013). Pharmacognostical Sem and redox profile of the leaves of *Citrus x aurantium* L. (Rutaceae). *Novare Journal of Health Sciences*, 1(2), 17-23.
- Pijoan, M. (2004). Medicina y remedios tradicionales del Caribe. La extensa y compleja terapéutica criolla. *OFFARM*, 23(9).

- Planos, E., Guevara, A.V., y Rivero, R. (Editores). (2013). Cambio climático en Cuba: vulnerabilidad, impacto y adaptación y medidas de adaptación. Multimedia. Instituto de Meteorología. Editorial AMA. ISBN 978-959-300-035-2
- Roig, J.T. (1988). Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Tomo II. Ed. Científico Técnica. La Habana. (1ª edic. 1945), 839, 569-1135.
- Sánchez Calle, M.T. (2009). Manual de producción de cítricos. Dirección Regional de Agricultura Lima. Dirección de Promoción Agraria. Monografía.
- Stampella, P.C. (2015). 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. (Doctoral dissertation). Universidad Nacional De La Plata.
- Vásconez, C. (2014). Comprobación del efecto laxante del extracto Hidroalcoholico del Mesocarpo del fruto de la naranja agria (*Citrus aurantium*) en ratones. Tesis de grado. Escuela de bioquímica y farmacia. Escuela superior politécnica de Chimborazo. Ecuador.
- Zhiminaicela Cabrera, J.B., Lima Morales, K.A., Quevedo Guerrero, J.N., García Batista, R.M., RogelJarrín, B.A. (2021). Incendios forestales un factor influyente en la degradación de la biodiversidad del cantón Chilla, Ecuador. Revista Científica del Amazonas, 4(7), 5-12. DOI: <https://doi.org/10.34069/RA/2021.7.01>

