UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas

FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Departamento Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA

Título: "Control de la calidad de la materia prima obtenida a partir de la corteza de Citrus sinensis L, en los Centros de producción Local de la provincia de Villa Clara"

Autor: Glenda Portela García

Tutores: Dra. C. María Elisa Jorge Rodríguez
Lic. Nadiachy Díaz León

Santa Clara, Julio 2019

Copyright©UCLV

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas

FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Academic Departament Pharmacy

DIPLOMA THESIS

Title: "Control of the quality of the raw material obtained from the bark of Citrus sinensis L, in the Local Production Centers of the province of Villa Clara"

Author: Glenda Portela García

Thesis Director: Dra. C. María Elisa Jorge Rodríguez
Lic. Nadiachy Díaz León

Santa Clara, July, 2019

Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

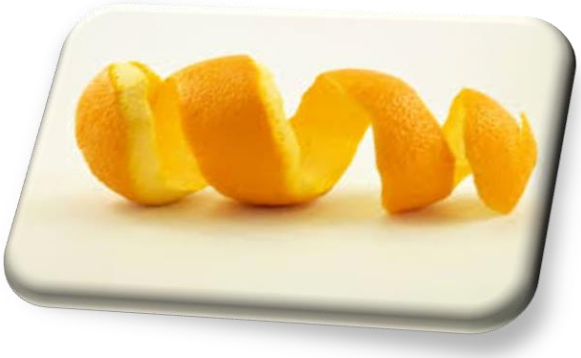
Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual

Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

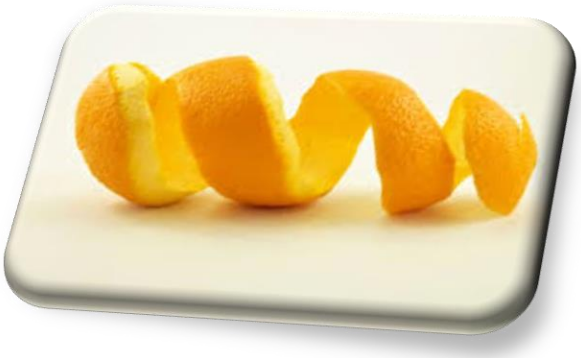
Teléfonos.: +53 01 42281503-1419



PENSAMIENTO

"La educación genera confianza. La confianza genera esperanza. La esperanza genera paz."

Confucio



DEDICATORIA

A mi familia, principalmente a mi madre y mi padre:

Alexis y Yamile

Por su dedicación, esfuerzo y ser una fuente de inspiración.

A mis abuelos: Nilda y Jesús

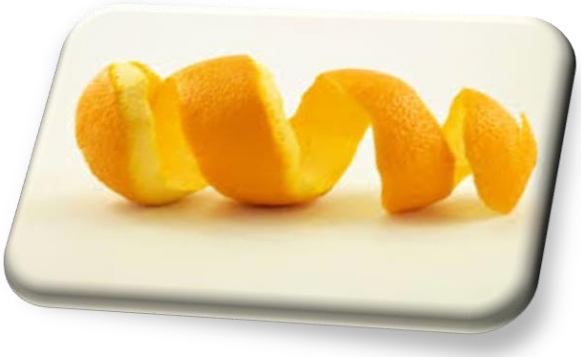
Por sus consejos y su presencia en mi vida.

A mi hermano: Axel

Por su cariño, aunque no siempre lo manifieste.

A mi novio: Santiago

Por su apoyo, amor y comprensión.



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco en primer lugar a mi familia, en especial a mi madre, padre, abuelos y mi novio por su apoyo constante y sacrificio sin esperar nada a cambio, gracias por estar siempre a mi lado.

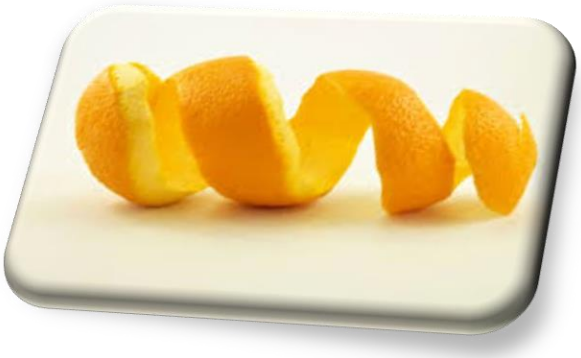
Quiero agradecer a todos los profesores y técnicos del Departamento de Farmacia, especialmente a mi tutora, la Dra. María Elisa Jorge Rodríguez, por su valiosa tutoría, certera dirección, paciencia y dedicación, por la responsabilidad y el amor con que se entrega a su trabajo diariamente. A mi otra tutora, la Lic. Nadiachy Díaz León por brindarnos siempre de forma oportuna y rápida la información necesaria, así como garantizarnos el suministro de todo el material vegetal.

A mis compañeros, que hoy son mis amigos, con los que he compartido esta hermosa experiencia por estos cinco años y que hoy llega a su fin, sin ellos no hubiera sido lo mismo, en especial: Yoan, Marco Rondón, Marco Antonio, Adriana, Marta María, Laura y Beatriz por siempre estar ahí cuando se necesita, por sus oportunos consejos, apoyo y compañía.

A la vida por brindarme la posibilidad de estudiar esta carrera y permitirme cumplir cada uno de mis sueños y aspiraciones.

A todos los que de una forma u otra han contribuido a la culminación exitosa de este trabajo de tesis.

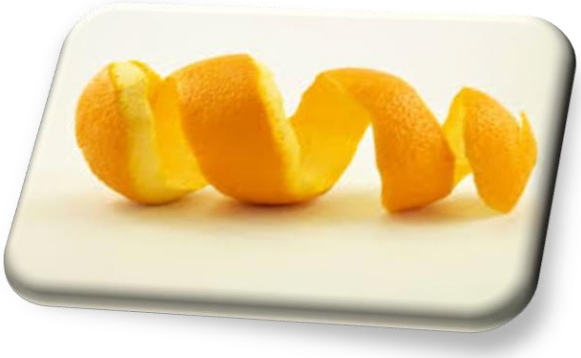
Muchas gracias!!!



RESUMEN

RESUMEN.

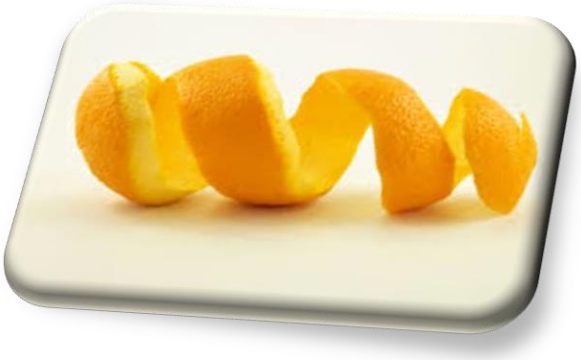
La *corteza de Citrus sinensis L.*, conocida comúnmente como naranja dulce, es utilizada en la medicina tradicional cubana en forma de jarabe por su acción como antiinflamatoria, antitusiva, expectorante y anthistamínica y como champú para tratar la dermatitis seborreica del cureo cabelludo; ambas formulaciones son elaboradas en los laboratorios de producción local de todo el país, utilizando el polvo de dicha corteza como ingrediente farmacéutico activo herbario. En el presente trabajo se verificaron las especificaciones de calidad reportados por el formulario nacional para esta materia prima y se propone una monografía analítica que fue aplicada a diez lotes suministrados por los laboratorios de diferentes municipios de la provincia de Villa Clara. La monografía propuesta incluyó ensayos de identificación (reacciones de coloración, análisis macro y micromorfológico y cromatografía en capa delgada), ensayos de pureza (material extractable, pérdida por desecación, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido clorhídrico) y el ensayo cuantitativo (determinación de flavonoides totales). La verificación de los límites de especificación se realizó aplicando el método de Bowker. Como resultado se obtuvo que la pérdida por desecación del polvo no debe exceder de 11 %, las cenizas totales no deben superiores a 7 % y las cenizas insolubles en ácido clorhídrico no deben exceder el 2 %. Se utilizó como técnica de análisis cuantitativo, la espectrofotometría UV indirecta (método de tricloruro de aluminio) para la determinación de flavonoides totales en base a quercetina. El seguimiento cromatográfico en capa delgada y el reconocimiento cualitativo con UV detección a 365 nm demostró la presencia de quercetina y hesperidina. El polvo de las hojas de *Citrus sinensis L.* contiene no menos de un 0,2 % de flavonoides, metabolitos responsables de las acciones farmacológicas que se le atribuyen a la planta.



ABSTRAC

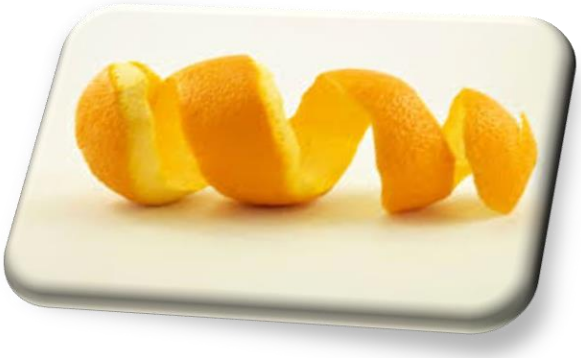
ABSTRAC.

The bark of Citrus sinensis L., commonly known as sweet orange, is used in traditional Cuban medicine. The form of syrup for its action as an anti-inflammatory, antitussive, and expectorant and as a shampoo to treat seborrhea dermatitis of the scalp; both formulations are elaborated in the local production laboratories of the whole country, using the powder of said bark as herbal active pharmaceutical ingredient. In the present work, the quality specifications reported by the national form for this raw material were calculated and an analytical monograph was written that was applied to ten lots supplied by the laboratories of different municipalities of the province of Villa Clara. The proposed monograph included identification tests (color reactions, morphological analysis and thin layer chromatography), purity tests (extractable material, loss by drying, total ash and ash insoluble in hydrochloric acid) and the quantitative test (determination of total flavonoids). Verification of the specification limits was carried out applying the Bowker method. As a result, it was obtained that the loss by drying of the powder should not exceed 11%, the total ashes should not exceed 7% and the ashes insoluble in hydrochloric acid should not exceed 2%. It was used as a technique of quantitative analysis, indirect UV spectrophotometry (aluminum trichloride method) for the determination of total flavonoids based on quercetin. Thin-layer chromatographic monitoring and qualitative detection with UV detection at 365 nm showed the presence of quercetin and hesperidin. The powder of the leaves of Citrus sinensis L. contains not less than 0.2% of flavonoids, metabolites responsible for the pharmacological actions attributed to the plant.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....4
1.1. Generalidades sobre el uso y comercio de las plantas medicinales en las diferentes regiones geográficas.....4
1.2. Control de calidad en plantas medicinales. Monografías Analíticas.....10
***1.3. Citrus sinensis (L) Osbeck*. Estudios realizados en el campo farmacéutico.....15**
1.3.1. Aspectos taxonómicos y distribución geográfica de la planta.....15
1.3.2. Composición química y usos farmacológicos reportados de la planta.....16
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....21
2.1. Material vegetal, equipos y reactivos. 21
2.2. Ensayos de identidad y pureza aplicados para evaluar la calidad del polvo obtenido de la corteza *Citrus sinensis* L. Osbeck 22
2.2.1. Ensayos de identidad.....23
2.2.2. Ensayos de pureza. 24
2.3. Verificación de los límites de especificación. Método de Bowker. 26
2.4. Evaluación del ensayo cuantitativo. Determinación de los límites de especificación. 28
2.5. Aplicación de los ensayos descritos para evaluar calidad del polvo de la corteza *C. sinensis* L suministrado por los CPL de diez municipios de la provincia de Villa Clara.....29
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 30
3.1. Resultados de los estudios realizados para establecer los procedimientos de control de calidad del polvo obtenido a partir de la corteza de la naranja dulce (*Citrus sinensis* L) 30
3.1.1. Definición, contenido y características. 30
3.1.2. Ensayos de identificación. 31
3.1.3. Ensayos generales de pureza 33
3.1.4. Ensayo cuantitativo. Determinación del límite de especificación.....35
3.2. Descripción de los ensayos de control de calidad del polvo de *Citrus sinensis* L. (Propuesta de Monografía). 36
3.3. Aplicación de los ensayos de control de calidad al polvo de *Citrus sinensis* L. 41
3.4. Resultados de la comparación de los valores reportados por el Formulario Nacional y los obtenidos en el presente trabajo, para el polvo de *C. sinensis* como IFAH. 43
CONCLUSIONES.....44
RECOMENDACIONES. 45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 45



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

El uso de hierbas con fines medicinales es una costumbre ancestral **(Marinoff, Martínez et al. 2009)**; hoy en día es, precisamente en los países del tercer mundo donde la medicina tradicional sobrevive de una forma más auténtica por su bajo costo y aplicación popular en la atención primaria de la salud **(Beyra, León et al. 2004)**; por ejemplo, en la actualidad se estima que alrededor de 80 % de la población mundial recurre a la medicina tradicional herbolaria para la atención primaria de la salud y en Asia, millones de personas mantienen su salud mediante el uso de hojas, raíces y cortezas de árboles **(Elizagaray Fernández and Castro Armas 2013)**.

Uno de los mayores problemas que se ha encontrado la industria farmacéutica a la hora de poder comercializar los productos de plantas medicinales como medicamentos ha sido cumplir las exigencias de garantías de eficacia, seguridad y calidad que se les requiere; por esta razón la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha mantenido un trabajo arduo en la investigación y publicación de monografías sobre una gran variedad de plantas medicinales, desde 1999 hasta la actualidad con el fin proporcionar toda la información que se necesite para su estudio y utilización con fines medicinales **(OMS, 2003)**. Para resolver esta problemática; también, se ha trazado regulaciones en todo el mundo como: en Europa se implementa la directiva 2004/24/CE del parlamento europeo en la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano **(Directiva 2001/83/CE 2001)**, en los Estados Unidos los productos herbales con exigencias similares a las de los medicamentos se siguen considerando como suplementos dietéticos a través de la ley de salud y educación de suplementos dietéticos (*DSHEA, siglas en inglés de Federal Dietary Supplement and Health Education Act,*) de 1994 **(FDA 1994)**; y en el caso de américa latina los países adoptan legislaciones y terminología diferentes sobre plantas medicinales y los productos derivados de las mismas.

La flora cubana posee un número elevado de géneros con especies vegetales que poseen propiedades medicinales reconocidas, algunas de ellas endémicas **(Baró, Cejas et al. 2003)**; por esta razón, desde 1991 como parte del Programa de Medicina Natural y Tradicional (PNMNT) se han realizado innumerables investigaciones en este campo, muchas de ellas reflejadas en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos (FNFA) **(Soler Cardoso and Porto Verdecia 1997)**. Pero al igual que en todo el mundo

estos preparados oficinales deben cumplir con especificaciones de calidad sustentados en la resolución ministerial No. 173 del Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos **(CECMED 2006)**. Dentro de las plantas medicinales insertadas en el PNMNT del Ministerio de Salud Pública se encuentra la corteza de *Citrus sinensis* L., de la cual se elabora un jarabe al 10 %, con acción antiinflamatoria, antitusiva, expectorante y antihistamínica y un champú indicado para la dermatitis seborreica del cuero cabelludo. Ambos productos son producidos en todos los laboratorios de fitofármacos del país **(Cruz Arzola 2017)**.

A pesar de que en Cuba existan regulaciones que se encarguen del control y la calidad de los productos medicinales, es muy cierto que los Centros de Producción Local (CPL) donde se producen, no cuentan con las condiciones ni el equipamiento óptimo y en muchos casos no se disponen de métodos de control estandarizados para garantizar la calidad y seguridad de los preparados fitomedicinales. En el caso de la corteza de la naranja el formulario citado incluye para la materia prima (polvo de la corteza) y las dos preparaciones algunas especificaciones de calidad para su control, pero se conoce que las mismas no son aplicadas por las razones expuestas.

Teniendo en cuenta lo anterior en el presente trabajo se puede citar el siguiente **problema científico:** ¿Tiene la materia prima obtenida de la corteza de los frutos de la naranja dulce (*Citrus sinensis L.*) la calidad adecuada para ser utilizada como IFA, en la elaboración de las formas terminadas que se comercializan en la provincia de Villa Clara?

En aras de dar respuesta al problema, este trabajo científico parte de la siguiente **hipótesis**: Si se controla la calidad para la materia prima obtenida de la corteza de los frutos de *Citrus sinensis*, utilizados en los CPL de la provincia de Villa Clara, se podrá comprobar si la misma esta apta para su uso en la elaboración de las formas terminadas que se comercializan en Cuba.

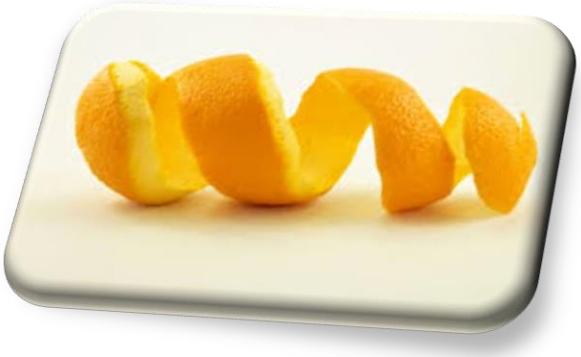
Para fundamentar dicha hipótesis se plantea el siguiente objetivo general:

Realizar el control de la calidad de la corteza de los frutos de la *Citrus sinensis L*., como materia prima para la elaboración de fitofármacos.

Y como objetivos específicos:

1. Verificar los límites de especificación establecidos por el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos para la corteza de los frutos de *Citrus sinensis L*.

2. Evaluar un ensayo cuantitativo, determinando sus límites de especificación, con vistas a su inclusión en la monografía de control de calidad de la corteza de los frutos de *Citrus sinensis L*.
3. Conformar una propuesta de monografía analítica para realizar el control de la corteza de C. sinensis como ingrediente farmacéutico activo herbario.
4. Aplicar la monografía analítica propuesta para determinar la calidad del polvo de la corteza suministrado por los CPL de diferentes municipios de la provincia de Villa Clara.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.1. Generalidades sobre el uso y comercio de las plantas medicinales en las diferentes regiones geográficas.

La planta medicinal se puede definir como cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la hemisíntesis químico-farmacéutica. Droga vegetal es la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica. Desde hace muchos años las plantas medicinales han sido utilizadas como medio alternativo de medicina, fundamentándose en prácticas realizadas en base a creencias y conocimientos de los pueblos ancestrales **(Márquez Hernández, Bastidas Guerrero et al. 2017)**. Este uso es debido a la fácil accesibilidad, bajo costo, y por los reducidos índices de toxicidad, que en comparación con los productos de síntesis produce inconvenientes tales como: su elevado precio y los efectos secundarios asociados **(Gallegos-Zurita 2016)**.

La Fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o curar un estado patológico. Si bien la humanidad ha utilizado las plantas para curarse durante toda su historia, la incidencia de los productos de origen vegetal en la terapéutica ha variado a lo largo de los tiempos, de acuerdo con los avances del conocimiento científico tanto sobre estos productos como sobre las demás herramientas terapéuticas **(Cañigueral y Dellacassa et al. 2003) (Bouchrane 2014)**.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los fitomedicamentos o medicamentos herbarios son un producto medicinal elaborado con droga vegetal pura, preparados de extractos estandarizados obtenidos del insumo natural vegetal de uso en salud con actividad y seguridad farmacológica comprobada, cuya sustancia activa corresponde a alguna de las partes de dicho recurso o resulta de asociaciones, combinaciones o mezclas de extractos naturales estandarizados. Es presentado en forma farmacéutica y se administra bajo indicaciones terapéuticas o con fines terapéuticos de corregir o modificar ciertas funciones fisiológicas del cuerpo, pueden ingerirse en condiciones específicas y sin supervisión médica **(Bouchrane 2014) (OMS 2003)**.

La medicina natural es el pilar principal de la prestación de servicios de salud, o su complemento en varios países del mundo. De hecho, la OMS desde hace algunas décadas ha recomendado incluir en los programas de salud la medicina tradicional y

natural (MTN), al aprovechar los recursos locales, como medicamentos sobre la base de las plantas medicinales **(Cañada Rodríguez, Antúnez Coca et al. 2018)**. Además, propone realizar profusas investigaciones sobre los componentes de las plantas, para garantizar productos medicinales con calidad e inocuidad para el ser humano. Si bien las plantas medicinales han sido ampliamente utilizadas, no resultan suficientes los estudios científicos que avalen sus usos de manera segura **(Márquez Hernández, Bastidas Guerrero et al. 2017)**.

Hoy tras la revolución de la fitoterapia estas plantas conocen un nuevo florecimiento, como si la medicina volviera a sus raíces y es de recalcar que en muy numerosos casos, los químicos modernos obtienen con sus trabajos confirmación científica de tales propiedades curativas **(Roig 1983)**. Se han desentrañado científicamente los secretos de sus principios activos y se han descrito con más precisión sus propiedades, contraindicaciones y efectos secundarios, lo que ha redundado en una correcta sistematización de su uso y posología **(Queart Álvarez y Miranda Martinez 2000)**. Si bien es cierto las hierbas y los fármacos son considerados dos mundos opuestos, de acuerdo a un estudio realizado por el Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos, el 67% tiene su origen, en mayor o menor medida, en la naturaleza **(Pascual Casamayor, Pérez Campos et al. 2014)**; y alrededor de 25% de estos se derivan de las plantas **(Heisler, Budó et al. 2015)**.

Históricamente los productos de origen vegetal han pasado de tener un papel hegemónico en el arsenal terapéutico occidental a un discreto segundo plano, para volver a tener, en las últimas décadas, una presencia cada vez mayor. En Alemania, por ejemplo, el porcentaje de la población que utiliza medicamentos fitoterápicos ha experimentado un aumento, entre de la década del 70 al 90, de entre un 4% y un 92% dependiendo de las patologías, manteniendo este crecimiento hasta la actualidad **(Blumenthal 1998)**. En Francia, en cambio, el mercado está liderado por los productos para el tratamiento de trastornos circulatorios (44%), seguido por los digestivos, antitusígenos y productos para el tratamiento del resfriado.

En Estados Unidos (EE.UU) de Norteamérica, según Eisenberg et al. (1998) **(Eisenberg, Davis et al. 1998),** las terapias alternativas (entendiendo por tales las que no se enseñan en las facultades de medicina) reciben una atención creciente tanto por parte del público y los medios de comunicación como de la comunidad médica y las agencias

gubernamentales. Específicamente, las 4 plantas más usadas en los últimos dos años fueron ginkgo, equinácea, ajo y ginseng **(Blumenthal 2002)**.

Este retorno progresivo hacia el uso de los productos de origen natural en terapéutica ha sido estimulado, en parte, por el regreso a lo natural que se ha producido en forma genérica en la sociedad. Sin embargo, existen otros factores que también han jugado un papel importante: a) el descubrimiento de efectos adversos en fármacos de síntesis, b) el mejor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus derivados, c) el desarrollo de nuevos métodos analíticos puestos a disposición del control de calidad y d) el desarrollo de nuevas formas de preparación y administración **(Cañigueral y Dellacassa et al. 2003)**.

Por otra parte, los medicamentos de la Fitoterapia o fitofármacos, salvo escasas excepciones, no son apropiados para situaciones agudas o de emergencia. Se prescriben principalmente por médicos naturistas o clínicos o son utilizados en régimen de automedicación, con frecuencia como consecuencia del consejo de profesionales sanitarios no médicos **(Reuter 1991) (Steinegger and Hänsel 1998)**.

En el mercado mundial, el 50% de las plantas son usadas en alimentación humana, 25% en cosmética, 20% en la industria farmacéutica y un 5% en otros rubros. La producción proviene principalmente de países en desarrollo (América, África y Asia: India y China), y se dirige a los países desarrollados: Unión Europea (UE), EE.UU. y Japón. Se estima que en el mundo se utilizan unas 10.000 especies vegetales como medicinales, en su mayor parte en sistemas de medicina tradicional. De estas especies, sólo un número relativamente reducido se emplea con un volumen significativo. A título de ejemplo, la medicina tradicional china utiliza unos 9.900 materiales de origen vegetal, pero sólo unos 500 son empleados en forma habitual 12. De cualquier forma, se estima que en China un 40% del total de los medicamentos corresponde a preparados de la medicina tradicional **(Horeau and Da Silva 1999)**.

Un análisis del *Traffic International* **(Lange 1998)** considera que unas 2.000 plantas medicinales y aromáticas son objeto de algún tipo de comercio en Europa. De éstos, 1.200 a 1.300 son especies nativas europeas, un 90% de las cuales provienen de la recolección del material silvestre, lo que representa una cantidad estimada de entre 20.000 a 30.000 t anuales. En EE.UU aproximadamente el 45% de la población utiliza fitomedicinas y productos naturales, así como productos de herboristería. En Canadá, el

mercado correspondiente a medicamentos provenientes de plantas medicinales está evaluado en US$ 200 millones, comparado con el de 9.000 millones de medicinas sintéticas (Centre Québécois de Valorisation des Biomasses et des Biotechnologies, CVBQ)

Hasta aquí se evidencia la singular actualidad y expansión de la Fitoterapia en los países desarrollados. En consecuencia, parece oportuno analizar ahora cuál es el panorama de la Fitoterapia en otras regiones del orbe, especialmente en países en desarrollo, pero con fuerte influencia de la cultura occidental, como ocurre con muchos de los países latinoamericanos. En América del Sur, las necesidades de medicamentos son crecientes y su evolución es directamente proporcional al agravamiento de los indicadores de salud, los que a su vez son determinados fundamentalmente por los indicadores socio-económicos. Sin embargo, la situación presenta particularidades de acuerdo al país que se considere. Resulta sustancial la heterogénea influencia que tienen las riquezas fitogenéticas de cada país, sumado a sus diversidades culturales y a la dispar vigencia de sus tradiciones culturales. A continuación, se exponen algunos ejemplos que muestran lo anterior **(Cañigueral y Dellacassa et al. 2003)**.

En Argentina la mayor parte de su oferta en este rubro corresponde históricamente a la manzanilla alemana, representando para esta especie una de las producciones más significativas en el mundo, mientras que Brasil merece un capítulo especial en consideración a su importancia dentro de la región sudamericana, representando el noveno mercado mundial farmacéutico, y es también un fuerte productor de materias primas vegetales, tales como ipecacuana, guaraná, jaborandi, lapacho, Duboisia, etc; en las últimas décadas ha llegado a exportar más de 46 millones de US$ en este rubro. En Bolivia, a pesar de que está legalmente protegida la práctica de la medicina tradicional, no existe un programa nacional de incorporación de esta práctica a los planes generales de salud y, por lo tanto, la utilización de plantas medicinales no forma parte del arsenal de recursos terapéuticos de la medicina oficial, aunque a pesar de esta situación, es evidente la importancia que tienen las plantas medicinales en la cultura nacional, fácilmente cuantificable cuando se advierte el rol preponderante que tienen en los locales comerciales y mercados populares. Esta situación se repite en Paraguay, Uruguay y otros países del área **(Cañigueral y Dellacassa et al. 2003)**.

En Cuba, como en muchos países de la región se establece como política de estado el fortalecimiento y consolidación de la salud intercultural, incorporando la medicina ancestral y alternativa al sistema nacional de salud, que busca entre otras cosas diseñar y aplicar protocolos para facilitar la implementación progresiva de la medicina ancestral y alternativa, con visión holística, en los servicios de salud pública **(Martínez Ávila and Gómez López 2013)**.

Cuando se citan aspectos relacionados con el uso y la comercialización de los productos obtenidos a partir de las plantas medicinales resulta importante tener siempre presente los límites de la Fitoterapia en la Terapéutica actual, y por lo tanto precisar el concepto moderno de la misma, se debe partir de tres premisas **(Cañigueral 2002)**:

1. Si bien los productos fitoterápicos suelen tener márgenes de seguridad terapéutica más amplios y suelen tener menos efectos adversos que los fármacos sintéticos, cabe siempre recordar que natural no es sinónimo de inocuo
2. Actualmente existe una base científica que puede sustentar la eficacia de muchos productos fitoterápicos para determinadas indicaciones. Constituyen alternativas fuertemente deseables para muchas patologías menores, enfermedades crónicas y prácticas profilácticas.
3. La eficacia se consigue solamente con el uso adecuado de los preparados fitoterápicos, tanto en lo que se refiere a las indicaciones, como con la forma de administración y la dosificación. La responsabilidad del profesional sanitario en este aspecto, y por ende de su preparación curricular, es insoslayable. También se requiere una legislación adecuada.

Por lo tanto, no se debe maximizar ni minimizar las posibilidades de la fitoterapia, sino tener en cuenta que el lugar que debe ocupar en la terapéutica es ni más ni menos que aquél para el cual ha demostrado su utilidad. La utilización de los preparados de fitoterapia, al igual que las materias primas sigue una línea ascendente en todo el mundo occidental. No debe olvidarse que su relevancia en otras culturas, como la china, india o africana, abarcadoras de más de la mitad de la población mundial, es milenaria y a la vez totalmente actual. Sin embargo, la expansión en occidente representa mucho más que una simple moda y no está relacionada solamente con el interés creciente por los "tratamientos naturales" de los problemas de salud, sino también con la evidencia creciente acerca de su seguridad y eficacia **(Busse 2000) (Dechamp 1999)**.

Según lo descrito existen una serie de factores que permiten asegurar que la Fitoterapia tiene un futuro asegurado **(Cañigueral 2002)**:

- ✓ El comportamiento del mercado global, tanto para las materias primas como para los productos terminados
- ✓ La demanda creciente de tratamientos poco agresivos y, en particular, el aumento del interés de la población por preparados de fitoterapia
- ✓ La tendencia hacia el uso racional de los preparados fitoterápicos, con una comprensión de sus posibilidades y limitaciones, lo que facilitaría su inserción en los sistemas nacionales de salud.
- ✓ El hecho de disponer de medicamentos basados en plantas con garantía de calidad, seguridad y eficacia
- ✓ El incremento observado en varios países líderes en esta especialidad, en actividades de investigación, tanto para los aspectos químicos como farmacológicos y clínicos.
- ✓ La disponibilidad regional de los recursos necesarios, tanto en lo que respecta a biodiversidad vegetal, como a experiencia etnofarmacológica y personal capacitado para su aprovechamiento.

Sin embargo, existen una serie de limitaciones que deben ser encaradas y superadas: Ausencia o insuficiente regulación legal y su armonización internacional **(Cañigueral y Dellacassa et al. 2003)**.

- ➢ Problemas de calidad, involucrando una producción controlada desde el inicio de la cadena productiva, considerando la implantación de normas de buenas prácticas agrícolas y de recolección en los países productores de materias primas vegetales. Este aspecto, aunque está considerado en algunas legislaciones nacionales, necesita de un tiempo lógico de adecuación, debida cuenta de la enorme brecha que aún existe entre la realidad y la situación ideal de control. No es posible racionalizar costumbres y actitudes que durante siglos fueron usadas, y que hoy amenazan la sustentabilidad del sistema y la calidad del producto.
- ➢ Insuficiente y desestructurado fomento a la investigación, particularmente en el área clínica, que necesita del consiguiente apoyo económico por parte de la industria y el apoyo de los organismos nacionales y regionales de ciencia y tecnología.

- Notables deficiencias en la formación curricular en el área de los estudios de farmacia y su extensión hacia otras carreras universitarias relacionadas con las ciencias de la salud, en particular medicina y enfermería.

1.2. Control de calidad en plantas medicinales. Monografías Analíticas.

La fitoterapia constituye una herramienta terapéutica más dentro de todo el abanico de posibilidades que nos brinda la terapéutica actual. Para que esta herramienta sea realmente útil, es necesario hacer un uso racional de la misma, basado en una utilización apropiada de los preparados a base de plantas medicinales. El uso racional de la fitoterapia solamente será posible si el profesional de la salud conoce los límites y posibilidades de la fitoterapia; tiene a su disposición medicamentos fitoterápicos con calidad, seguridad y eficacia evaluadas; dispone información rigurosa y fiable, y tiene la oportunidad de adquirir una formación adecuada en este campo **(Cañigueral 2002)**.

La fuerte competitividad industrial de la que somos testigos actualmente, ha revolucionado de calidad, aumentando la importancia que esta ya había tenido tradicionalmente. Hoy en día, se utiliza como sello de garantía de cualquier producto industrial. El cliente actual busca que el producto que se dispone a su servicio cumpla con una serie de especificaciones y que haya sido producido bajo controles que aseguren su calidad **(Romero Gamero 2001)**.

Según el organismo internacional ISO (siglas en inglés de *International Standards Organization*), la calidad se define con la totalidad de los rasgos y características de un producto, proceso o servicio que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas o implícitas **(ISO 1990)**.

Según la OMS el control de calidad consiste en realizar mediciones de parámetros del producto, determinando si los valores obtenidos están en concordancia con unas especificaciones preestablecidas **(WHO 2013)**. Además, se denomina control de calidad al conjunto de técnicas y procedimientos utilizados para satisfacer los requisitos de la calidad y sirve para orientar, supervisar y controlar todas las etapas del proceso hasta la obtención de un producto con la calidad deseada **(Bandoni 2011)**.

El control de calidad de drogas vegetales y de productos relacionados admite algunos criterios que suelen ser muy distintos de los habitualmente usados en cualquier labor analítica aplicada a productos puros. Los factores que más influyen en estas diferencias son la calidad natural de estos materiales y la consecuente complejidad y variabilidad de

sus composiciones químicas; los medicamentos fitoterápicos están constituidos exclusivamente por ingredientes activos de origen vegetal usualmente no definidos químicamente, formulados bajo la forma farmacéutica más adecuada para su administración, lo que implica que para la elaboración de medicamentos fitoterápicos se pueden emplear principalmente: a) drogas vegetales, que generalmente se presentan en forma molida o pulverizada, b) productos obtenidos por extracción o c) en algunos casos particulares, principios activos purificados. Se debe tener en cuenta que, en los dos primeros casos, que son los más frecuentes, se trata de sistemas multicomponentes, con una composición generalmente compleja que incluye: I) componentes farmacológicamente activos (principios activos), II) componentes coadyuvantes, que modulan la actividad de los principios activos, e incluso la refuerzan, III) componentes inertes (matriz) y IV) componentes potencialmente alergénicos o tóxicos **(Rojas Sazo, Cruz Palencia et al. 2011) (Cañigueral 2006)**; lo que obliga a la necesidad de un adecuado control, prescripción y dispensación, condiciones que debieran reflejarse en las legislaciones respectivas.

Las monografías de calidad, seguridad y eficacia de las drogas vegetales y sus preparados deben reunir información validada y elaborada con espíritu crítico sobre métodos analíticos y especificaciones de calidad, indicaciones aceptadas y riesgos conocidos. Gracias a ello, dichas monografías constituyen un instrumento clave para conseguir ese uso racional de la fitoterapia, ya que **(Cañigueral 2006)**:

I. Facilitan la elaboración de la documentación de registro de medicamentos a base de plantas y el cumplimiento de los parámetros de calidad, seguridad y eficacia.
II. Constituyen elementos de información rigurosa y fiable para el profesional de la salud, permitiéndole un uso apropiado de los preparados a base de plantas medicinales.
III. Son elementos que contribuyen a la formación de los profesionales de la salud.

La necesidad de compilar con espíritu crítico la información científica sobre la química, farmacología, toxicología y clínica de las drogas vegetales y derivados, para elaborar monografías de seguridad y eficacia rigurosas y contrastadas, ya generó actuaciones institucionales importantes desde hace un par de décadas. En este sentido, destaca el esfuerzo realizado por la comisión europea del ministerio de sanidad alemán, que fue la pionera en este tipo de análisis **(Blumenthal 1998)**. En el área latinoamericana cabe destacar la actividad de las farmacopeas argentina y brasileña, y el trabajo realizado por

el programa TRAMIL con la elaboración de la farmacopea caribeña **(Germosén-Robineau 2005)**.

Existen tres iniciativas internacionales consolidadas que constituyen aportes de gran importancia **(Cañigueral 2006)**:

- La Farmacopea Europea, en el ámbito de las monografías de calidad.
- Las monografías de ESCOP (Siglas en inglés *European Scientific Cooperative for Phytotherapy*) sobre seguridad y eficacia.
- Las monografías de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que incluyen información tanto sobre calidad como seguridad y eficacia.

Las farmacopeas constituyen la herramienta oficial de control de calidad y son un reflejo de la fitoterapia en cada región; como textos de referencia ineludibles y de aplicación obligatoria, deben considerar y evaluar estas diferencias para poder aportar por especificaciones de calidad acordes con las necesidades tanto de la industria farmacéutica como de la sociedad involucrada **(Eu. Ph. 2016)**; proporcionando una colección de monografías analíticas oficiales sobre drogas vegetales y sus preparados. Las farmacopeas, aborda todos aquellos parámetros que, en cada caso, son necesarios para describir la calidad de un producto, los cuales se agrupan en cuatro tipos de ensayos **(Bauer 1998) (Vlietinck 1999)**:

1. Definición clara y científica.
2. Identidad (características macro y microscópicas, características organolépticas, perfil cromatográfico, reacciones de identificación).
3. Pureza (humedad, cenizas, constantes físicas, materia extraña, solventes residuales, control microbiano, metales pesados, residuos de pesticidas, aflatoxinas, radioactividad, adulteraciones).
4. Valoración (contenido en principios activos o marcadores).

La implantación de diversos métodos analíticos, particularmente la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y la cromatografía de gases (CG), ha contribuido decisivamente a encarar la complejidad de los fitoterápicos, no solamente para la valoración de los componentes sino además para obtener las llamadas “huellas dactilares” o perfiles característicos **(Lazarowych and Pekos 1998)**.

A lo largo del desarrollo del presente trabajo fueron consultadas las principales farmacopeas vigentes: *British Pharmacopoeia (*B.P. siglas en inglés*), European*

Pharmacoppeia (Eur. Ph. siglas en inglés*) y The United States Pharmacopeia (USP.* siglas en inglés*)* con vistas a disponer de metodologías comunes en la ejecución de la propuesta de monografía de un producto obtenido de la corteza de una planta medicinal. Si se observan las monografías analíticas, de plantas medicinales y preparados fitofarmacéuticos, descritas en estas farmacopeas se puede constatar que, aunque la estructura metodológica de la monografía es similar a la de los productos sintéticos, los procedimientos analíticos se conciben de manera diferente.

En la tabla 1.1 se observa como los ensayos macro y micromorfológicos de la parte de la planta y la Cromatografía en Capa Delgada (CCD) son los ensayos de identificación comunes en todos los casos, mientras que la técnica analítica de cuantificación o ensayo cuantitativo está referida a la determinación del porcentaje total de un tipo de analito, expresado en base a uno de los metabolitos conocido presente en la planta; por su utilidad en el presente trabajo la mayoría de los ejemplos seleccionados se corresponde con partes de la plantas donde se determinan el total de flavonoides en base a un patrón.

Tabla 1.1. Valores reportados de los ensayos de identificación de las monografías analíticas de plantas medicinales descritas en la Farmacopea Británica, 2013.

	Ensayos de identificación		**Ensayo Cuantitativo**
Nombre de la planta y parte utilizada	**CCD (Sustancias de referencia y revelador)**	**Determ. Macro y microscópica**	**Ensayo cuantitativo**
Citrus limon (L.) Burm. f. (corteza seca)	Sustancia de referencia: ácido caféico, naringina, rutina. Revelador: éster difenilbórico del ácido aminoetílico, polietilenglicol 400 y Luz UV (365 nm).	Si	Determinación de aceite volátil
Citrus aurantium L. ssp. (corteza seca)	Sustancia de referencia: ácido caféico, naringina Revelador: éster difenilbórico del ácido aminoetílico, macrogol 400 y Luz UV a 365 nm.	Si	Determinación de aceite volátil
Calendula officinalis L. (flores)	Sustancia de referencia: ácido caféico, rutina, ácido clorogénico Revelador: éster difenilbórico del ácido aminoetílico, macrogol 400 y Luz UV a 365 nm.	Si	Flavonoides: Espectrofotometría UV a 425 nm (Reacción: Folin-Ciocalteu) Límite: Máximo 0.4%

Passiflora incarnata L (flores)	Sustancia de referencia: rutina, hiperosido Revelador: éster difenilbórico del ácido aminoetílico, macrogol 400 y Luz UV a 365 nm.	Si	Flavonoides: Espectrofotometría UV (Reacción: Folin-Ciocalteu) Límite: Máximo 1.5%
Ginkgo biloba L. (hoja)	Sustancia de referencia: ácido caféico, rutina. Revelador: éster difenilbórico del ácido aminoetílico, macrogol 400 y Luz UV a 365 nm.	Si	Flavonoides: Cromatografía líquida Patrón: Quercetina Detección: 379 nm Límite: Mínimo 0.5%
Solidago gigantea Ait o *Solidago canadensis* L. (partes aéreas florecidas)	Sustancia de referencia: ácido clorogénico, quercetina, rutina. Revelador: éster difenilbórico del ácido aminoetílico, macrogol 400 y Luz UV a 365 nm.	Si	Flavonoides: Espectrofotometría UV a 425 nm (Reacción: Folin-Ciocalteu) Límite: Mínimo 2.5%
Crataegus monogyna (flores)	Sustancia de referencia: ácido clorogénico, hiperosido. Revelador: éster difenilbórico del ácido aminoetílico, macrogol 400 y Luz UV a 365 nm.	Si	Flavonoides: Espectrofotometría UV a 410 nm (Reacción: Folin-Ciocalteu) Límite: Mínimo 1.5%

Por otra parte, en la tabla 1.2 se citan los ensayos generales de pureza incluidos en monografías analíticas de plantas medicinales citadas en la BP (2013), con sus respectivos límites establecidos, destacándose el uso de la pérdida por desecación y las cenizas totales como ensayos comunes.

Tabla 1.2. Valores reportados de los ensayos generales de las monografías analíticas de plantas medicinales descritas en la Farmacopea Británica, 2013.

Planta	**Pérdida por desecación**	**Cenizas Totales y Cenizas insolubles en HCl al 10%**	**Material extractable**
Citrus limon (L.) Burm. f.	_	_	_
Citrus aurantium L. ssp.	Máximo 10%	C. Totales: Máximo 7%	Máximo 6%
Calendula officinalis L.	Máximo 12%	C. Totales: Máximo 10%	_
Passiflora incarnata L	Máximo 10%	C. Totales: Máximo 13%	_
Ginkgo biloba L	Máximo 11%	C. Totales: Máximo 11%	_

Solidago gigantea Ait o *Solidago canadensis* L.	Máximo 10%	C. Totales: Máximo 7% C. insolubles: Máximo 1%	_
Crataegus monogyna	Máximo 10%	C. Totales: Máximo 10%	_

1.3. Citrus sinensis (L) Osbeck. Estudios realizados en el campo farmacéutico.

Esta planta siempre verde pertenece al género *Citrus*, a la familia *Rutaceae* y es ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales **(Roig 1877)**.

1.3.1. Aspectos taxonómicos y distribución geográfica de la planta

Nombre científico: *Citrus sinensis (L) Osbeck*

Nombre común: naranja dulce, naranja de China o naranja de China dulce; en Puerto Rico y República Dominicana se le conoce simplemente como "China" **(Taringa. net 2019)**.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: *Rutaceae*

Género: *Citrus*

Especie: *Citrus sinensis*

Descripción: Según Roig, (1974) en su obra "*Plantas medicinales*, *aromáticas y venenosas de Cuba"* esta planta posee la siguiente descripción taxonómica **(Roig 1974)** El naranjo dulce es un árbol de mediano tamaño que puede alcanzar hasta 10 m de altura, de porte más o menos elevado, copa redondeada con las ramas armadas de agudos aguijones y los peciolos a menudo anchamente alados. Foliolos ovales, de 6 a 12 cm de largo 3-5 a cm de ancho, más o menos acuminado en el ápice; hojas perennes, elíptico-lanceoladas o en algunos casos aovadas, y el rabillo provisto de una alita a cada lado formando la figura de un corazón. Las flores son blancas, perfumadas, con cinco pétalos y diez o más estambres. El fruto se diferencia del naranjo amargo en que su corteza es más delgada, menos rugoso, el corazón macizo y su pulpa generalmente dulce, nunca amarga. Su madera es de color amarillo pálido, duro y fuerte.

Distribución geográfica: Proviene probablemente de Indochina y China meridional a la península malaya, aunque hay quien lo sitúa concretamente en Vietnam. Su cultivo se

extendió por todo oriente y los árabes la introdujeron en europa a través de España, en el siglo X. El propio Colón, en su segundo viaje, llevó las semillas a américa, a la isla de La Española (Haití); su introducción en Cuba se asocia con la llegada de Colón en 1518. Hoy se cultiva en todas las zonas tropicales y subtropicales **(Infomed 2019)**.

1.3.2. Composición química y usos farmacológicos reportados de la planta

La composición química y los usos farmacológicos tradicionales de la naranja dulce aparecen descritos en varias fuentes consultadas en Cuba y fuera de nuestro país, teniendo como principales partes utilizadas con fines medicinales las flores, hojas y la corteza de los frutos **(Chevallier 1997)**. A continuación, se describen los principales reportes encontrados en la literatura consultada, referido a ambos aspectos que de forma general se encuentran asociados en los estudios que aparecen de la planta

En Cuba el FNFA (2017) refiere que las hojas, flores y corteza de los frutos se caracterizan por la presencia de un aceite esencial, que según el órgano presenta como componente principal limoneno, linalol o nerol. Es una fruta muy rica en vitaminas y minerales, apetecible a cualquier hora del día y en cualquier estación del año. Su pulpa contiene grandes cantidades de ácidos orgánicos (cítricos y málico principalmente) y vitamina C; además, contiene flavonoides lipófilicos y algunas furocoumarinas. El aceite esencial varía su contenido según el órgano cuyos componentes son: limoneno, linalol, nerol, citral, citronelal, nootkatona, sinesal, n-nonanal, n-decanal, acetato de linalilo, acetato de geranilo, acetato de citronelilo, metil antranilato **(Cruz Arzola 2017)**. Según este Formulario el naranjo dulce presenta las acciones farmacológicas siguientes:

- ✓ Sistema Cardiovascular: Protector de los pequeños vasos
- ✓ Sistema Digestivo: Antiespasmódico
- ✓ Sistema Génito-urinario: Diurético
- ✓ Piel y mucosas: Antifúngico y Antibacteriano

Este formulario describe el uso de la corteza de naranja dulce con dos preparaciones: el jarabe al 10% y el champú con las siguientes indicaciones:

- ➢ Preparación: Naranja dulce, jarabe al 10%

Acción farmacológica: antiinflamatoria, antitusiva, expectorante y antihistamínica.

Indicaciones: Enfermedades respiratorias agudas (vías altas), aunque también se puede utilizar el tratamiento sintomático de la bronquitis y la neumonía

- ➢ Preparación: Naranja dulce, champú

Acción farmacológica: antiseborreica, dermatológica y antioxidante.

Indicaciones: Dermatitis seborréica del cuero cabelludo.

La composición y las acciones farmacológicas de esta planta han sido estudiadas por grupos de investigadores de diferentes partes del mundo, encontrándose muchos puntos en común en lo reportado al respecto. En cuanto a la composición se observa coincidencia en la presencia de un aceite esencial muy característico y un gran contenido de polifenoles entre los cuales se destacan los ácidos hidroxámicos, los flavonoides, entre los cuales las flavonas son las más prevalentes **(Klimczak, Małecka et al. 2007)**. Por su parte en cuanto a las acciones farmacológicas más reportadas son tratar y prevenir deficiencias vitamínicas, resfríos, gripe, escorbuto y ayudando a combatir las infecciones virales y bacterianas. Los estudios que se refieren a continuación dan fe de esto.

En general los flavonoides, metabolitos de mayor interés en la planta, son extraídos a partir del material de la planta con acetona, acetato de etilo, etanol, metanol o mezcla de solventes. Recientemente, un estudio del año 2014 que tenía como objetivo evaluar la actividad del antioxidante en la pulpa de naranja (*Citrus auranthium*) y la corteza de la fruta utilizando como solvente acetona, etanol, y metanol. Los resultados sugieren que la acetona es el mejor solvente para la extracción de antioxidante si se combina la pulpa y la corteza de los frutos de la naranja **(Park, Lee et al. 2014)**.

Los flavonoides de los cítricos han sido estudiados desde la década de los 90, especialmente la hesperidina y se les ha demostrado un rango amplio de propiedades terapéuticas, incluyendo actividades antinflamatoria, antihipertensiva, diurética, analgésica, hipolipidémica **(Galati, Monforte et al. 1994) (Benavente García, Castillo et al. 1997) (Benavente García and Castillo 2008) (Galati, Trovato et al. 1996) (Manthey, Guthrie et al. 2001)** y la actividad antioxidante, siendo esta última la más estudiada. La evaluación de su actividad antioxidante se inició en el 2002 y se mantienen hasta el presente año, en múltiples estudios que determinaron que la corteza de la fruta contiene una alta concentración de sustancias antioxidantes; se evaluó esta actividad a través de varios ensayos *in vitro,* que incluyeron diferentes estrategias de extracción **(Kondo, Tsuda et al. 2002) (Park, Lee et al. 2014) (Rafiq, Kaul et al. 2016) (Erukainure, Osaretin Ebuehi et al. 2016)**. Es importante destacar que los flavonoides cítricos han demostrado ser poco tóxicos y por el contrario, tienen efectos beneficiosos

tales como la acción protectora de la rutina frente a las lesiones nefrotóxicas y la acción antiulcerogénica de la naringina y naringenina **(Infomed 2019)**.

En cuanto a la determinación analítica de estos metabolites, Molina-Calle y col. (2015) aislaron y caracterizaron y cuantificaron, aplicando la cromatografía líquida acopada a la espectrometría de masas (HPLC-MS, siglas en inglés), 16 flavonoides a partir de la corteza de la naranja entre los cuales los flavonoides mayoritarios fueron la Hesperidin y la naringenina, aunque también se detectó la presencia de quercetina y rutina, entre otros **(Molina Calle, Priego Capote et al. 2015)**; por su parte Shamloo y col. (2015) en este mismo año evaluaron la variación del contenido de hesperidina y naringenina, como metabolites mayoritarios en las naranjas valencianas **(Shamloo, Sharifani et al. 2015)**.

En el presente año investigadores egipcios y chinos realizaron una profunda caracterización fitoquímica de la corteza en varias especies de naranja, utilizando HPLC-MS, en cuya investigación se detectó la presencia de ocho cumarinas, tres ácidos cinámicos conjugados, una polimethoxiflavona, cinco O-glicósidos, 2 C-glicósidos, tres flavonas-di o-glucósidos y seis acetil derivados de azúcar de luteolina y kamferol, así como ácidos grasos metilados y oxigenados y los Flavonoides fueron los metabolitos secundarios más abundantes **(Nesrin Fayek, Mohamed Farag et al. 2019) (Longa, Zenga et al. 2019)**;

En España investigadores de diversas universidades desarrollaron varios estudios sobre la extracción de compuestos fenólicos de la pulpa de *Citrus Sinensis* L usando HPLC acoplada a Espectrometría de Masa (HPLC-MS, siglas en inglés). Iglesias y col (2019) realizaron dos extracciones (20 min cada uno) relativamente rápidas, usando una temperatura (55 ˚C) relativamente suave y una concentración alta (90%) de metanol; este método permitió extraer cantidades altas de compuestos fenólicos, que es esencial para determinar el perfil fenólico presente preciso en la fruta y dado que ningún método previo de extracción para pulpas de la naranja es reportado en la literatura, se propone este método como una metodología de rutina para estudiar el perfil fenólico del fruto, determinando la presencia de ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, floroglucinol, ácido cumarínico, ácido protocatecoico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferrúlico, apigenina, naringenina**,** hesperetina, rutina, hesperidina, quercetina, naringina, diosmetina, eriodictiol, kaempferol, narirutina y ácido clorogénico (**Iglesias Carres, Mas Capdevila et al. 2019)**. Por su parte, Cebadera y col (2019) aplicaron también HPLC, con detección

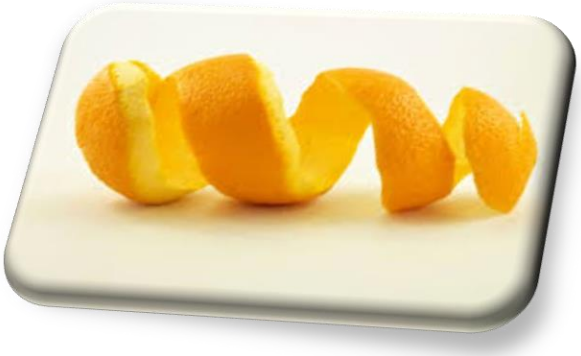
espectrofotométrica, y determinaron vitamina C, ácidos orgánicos, una gran cantidad de flavonoides, con la hesperidina como flavonoide mayoritario, y diez antocianinas fueron identificadas, en su mayoría derivados de la cianidina **(Cebadera Miranda, Domínguez et al. 2019)**.

Los efectos antibacteriano, antimicrobiano e insecticida de la corteza de la naranja han sido demostrados en la literatura y los mismos han sido asociados a su aceite esencial, del cual se ha demostrado que está compuesto por terpenos, ácidos grasos, carotenoides y otros compuestos volátiles, de los cuales el limoneno es el más abundante y representativo **(Espina, Somolinos et al. 2011) (Burt 2004) (Ficher and Phillips 2008) (Kumar, Mishra et al. 2012)**. Recientemente Mehmood y col. (2015) han demostrado la actividad antibacteriana potente, en contra de patógenos entéricos **(Mehmood, Dar et al. 2015)**, Akdemir (2015) demostró el efecto del extracto de la corteza de naranja contra la neumonía causada por *Klebsiella* **(Akdemir Evrendilek 2015)**, Shetty y col. (2016) demostraron el efecto antimicrobiano de extractos obtenidos de la corteza de la naranja dulce en las cares dentales **(Sapna, Prabu et al. 2016)**, Geraci y col. (2016) comprobaron las acciones antimicrobianas y la composición química del aceite esencial, identificando 14 componentes entre los cuales el limoneno representó más de un 70% **(Geraci, Di Stefano et al. 2016)**; mientras que investigadores chinos, Qingyun Guo y col. (2018), examinaron la actividad antimicrobiana contra microorganismos patogénicos y determinaron 27 compuestos en el aceite donde el limoneno representaba el 85% y propusieron dicho aceite para ser usado en la preservación de alimentos **(Guo, Liu et al. 2018).** Por su parte, Ruiz-Pérez y col. evaluaron la actividad antifúngica, frente a diferentes tipos de cándidas, de dicho aceite con resultados muy satisfactorios y demostraron la no genotoxicidad de los extractos evaluados **(Ruiz Pérez, González Ávila et al. 2016)**.

Además, en los últimos tres años han sido evaluadas tres acciones importantes en la corteza de la naranja, las cuales se han relacionado con la composición química presente en las muestras: la acción antiséptica del aceite esencial de la corteza de la naranja, demostrando su acción frente a diferentes tipos de mosquitos, con resultados muy satisfactorios frente al *Culex pipiens* **(Badawy Mohamed, Taktak Nehad et al. 2018)**; se obtuvieron resultados muy alentadores, en ratas, de extractos hidroalcohólicos y de flavonoides aislados (naringina y naringenina), con un buen potencial antibiabético en la

diabetes tipo 2 **(Ahmeda, Hassan et al. 2017)** y se demostró el potencial anticáncer de la corteza frente a diferentes líneas celulares, lo que avala de forma significativa el uso de esta planta **(Ajikumaran Nair, Rajani Kurup et al. 2017)**.

Con respecto a esta última acción citada ha sido relacionada con diversos antioxidantes potentes que se han encontrado en la corteza de las frutas cítricas y han mostrado efecto antioxidante, incluyendo radicales libres y actividades de quelación de metales. Es alentador para explorar los fitoquímicos activos en la corteza de la fruta *C. sinensis,* como especies reactivas de oxígeno que juegan un papel principal en muchas enfermedades como el cáncer, la disfunción cardiovascular, las enfermedades neurodegenerativas y el proceso de envejecimiento. Muchos estudios *in vitro* han dilucidado la acción anticáncer de la corteza de la naranja, por solo citar alguno se demostró la acción antiproliferativa, la inhibición de enzimas y la inhibición del crecimiento de células cancerígenas **(Qiu, Guan et al. 2011) (Onda, Horike et al. 2013) (Rawson, Ho et al. 2014)** y dos estudios recientes evaluaron productos aislados de la corteza de esta fruta; en el primero se identificó la presencia de 4'-geranyloxyferulico (GOFA) y se reveló que *C. sinensis* tiene el contenido más enriquecedor de GOFA, relacionando el mismo con el efecto neuroprotector y el efecto quimiopreventivo en ratas con cáncer de colon **(Liew, Ho et al. 2018)**; mientras que en el segundo se demostró que las flavonas polimetoxiladas presentes en la corteza tenían una acción sinérgica con el 5-fluorouracilo, mejorando la respuesta antiproliferativa de este fármaco contra la célula maligna **(Pereira Carolina, Duarte et al. 2019)**.



MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Material vegetal, equipos y reactivos.

Material vegetal

Se emplearon cortezas de naranja dulce (*Citrus sinensis L. Osbeck*), obtenidas de 10 CPL de los 14 CPL presentes en la provincia. Esta corteza es suministrada por la empresa de conservas de Jagüey Grande, lugar donde se cultiva la fruta, y distribuida a toda la provincia. Los lotes fueron rotulados de la siguiente forma, se le asignó una numeración y fue utilizado el nombre de la localidad de la cual procedían, quedando así: el lote 1 se corresponde con el municipio de Cifuentes, el lote 2 con el municipio de Jibacoa, el lote 3 con el municipio de Ranchuelo, el lote 4 con el municipio de Encrucijada, el lote 5 con el municipio de Quemado de Güines, el lote 6 con el municipio de Santa Clara, el lote 7 con el municipio de Sagua la Grande, el lote 8 con el municipio de Caibarién, el lote 9 con el municipio de Remedios y el lote 10 con el municipio de Manicaragua. Una vez recibida la corteza fue secada en una estufa durante 24 horas a una temperatura de 30 ^{0}C; la corteza seca fue molinada y pasada a través de una malla de 0,9 mm **(BP 2013)**, con el objetivo de buscar un tamaño de partícula homogéneo.

Equipos:

Balanza digital (BOECO). Alemania.

Baño ultrasónico BRANSON 1510. México

Baño de agua (BWS-17, SEIWA RIKO CO, LTD). Alemania.

Placas para cromatografía en capa fina de gel de sílice F 254 0,2 mm, sobre plástico. MERCK. Alemania.

Cámaras cromatográficas de vidrio (LAMAG).Alemania.

Capilares de 5 µL (MARK). Alemania.

Manta de calentamiento (J.P. selecta, SA, CE). Alemania.

Espectrofotómetro (RAYLEIGH 1601-UV). China

Estufa termostatada (DHG-9146A). Alemania.

Horno Mufla, SELECTA-HORN, España.

Lámpara UV (CAMAG).Alemania.

Evaporador rotatorio BÜCHI Heating Bath, B-66490. Alemania.

Filtros de jeringa Alltech (25 mm; 0,45 µm). Estados Unidos.

Molino de Cuchilla (Retsh GMBH). Alemania.

Cristalería común de laboratorio.

Reactivos y disolventes utilizados:

Metanol, p.a. EMSURE.

Acetona, p.a. UNI-CHEM.

Ácido acético glacial, p.a. UNI-CHEM.

Acetato de etilo, p.a. UNI-CHEM.

Acetato de etilo para.LOBA CHEMIE.

N- butanol, p.a. UNI-CHEM.

Etanol absoluto, p.a. UNI-CHEM.

Rutina, ACROS ORGANICS.

Ácido Clorhídrico, p. a.,Panreac.

Hexamina (Hexametilentetramina), SIGMA-ALDRICH.

Hesperidina, ACROS ORGANICS.

Sulfato de sodio anhidro, UNI-CHEM.

Tricloruro de aluminio, p.s. Reachim.

Hidrato de cloral, UNI-CHEM.

Quercetina hidratada, ACROS ORGANICS.

2.2. Ensayos de identidad y pureza aplicados para evaluar la calidad del polvo obtenido de la corteza *Citrus sinensis* L. Osbeck

Los ensayos aplicados en el presente trabajo fueron tomados de diferentes fuentes: Los ensayos de identidad y de pureza se corresponden con lo reportado en la monografía analítica de la BP., 2013 **(BP 2013)** para el polvo de la corteza de la naranja amarga (*Citrus aurantium* L. ssp) que es el Ingrediente Farmacéutico Activo Herbario (IFAH), con ligeras modificaciones y estos son: descripción macroscópica, microscópica, cromatografía en capa delgada (CCD), pérdida por desecación, cenizas totales, cenizas insolubles en ácido clorhídrico y como ensayo cuantitativo se aplicó el ensayo para la determinación de flavonoides presentes en la planta, validado por Rodríguez (2010) **(Rodríguez Hernández 2010)**. A continuación, se exponen los procedimientos de trabajo para cada ensayo.

2.2.1. Ensayos de identidad.

Estos ensayos incluyeron la descripción macro y microscópica, la cual fue adaptada a la descripción obtenida por los especialistas botánicos que la evaluaron, teniendo en cuenta que se trata de otra especie de citrus, y la cromatografía en capa delgada, en la cual fue las condiciones establecidas en la farmacopea citada y se aplicó, además, una segunda fase móvil específica para la identificación de flavonoides.

2.2.1.1. Descripción macroscópica.

Se comprobó que el material vegetal tenía las siguientes características macroscópicas: la droga se muestra en piezas elípticas o irregulares de 5-8 cm de largo, 3-5 cm de ancho y aproximadamente 3 mm de grosor. La superficie exterior es amarillenta de moderada y fuerte intensidad, claramente punteada y tiene una superficie interna de color blanca amarillenta.

2.2.1.2. Descripción microscópica.

Para realizar la descripción microscópica se redujo a polvo la droga. El polvo es de color marrón claro. Se examinó bajo un microscopio usando una solución de hidrato de cloral R. El polvo muestra las siguientes características de diagnóstico: pequeñas células poligonales con paredes anticlinales ligeramente engrosadas, llenas de cromatóforos rojos anaranjados y estomas anomocíticos muy ocasionales; fragmentos de la hipodermis que muestran engrosamiento colenquimatoso; grupos de parénquima con cada célula que contiene un cristal prismático de oxalato de calcio; fragmentos de glándulas de aceite lisígeno; parénquima que contiene cristales de hesperidina que se disuelven en una solución de hidróxido de potasio R 20 g / l que da un color amarillo.

2.2.1.3. Reacción colorimétrica con tricloruro de hierro

Procedimiento: Se añadió 3 g de droga en polvo en 25 mL de agua destilada, agitando durante 30 min. Se filtró y se diluyó en 30 mL de igual disolvente. Se Tomó 10 mL de esta disolución y adicionó 0,1 mL de disolución de Tricloruro férrico 10 %. Un ensayo positivo estuvo indicado por la formación de un precipitado gelatinoso o la aparición de un color verde parduzco intenso.

2.2.1.4. Cromatografía en capa delgada.

Se realizó la CCD para identificar los flavonoides (o compuestos fenólicos) presentes utilizando las siguientes condiciones cromatográficas:

Fase móvil: se empleó una mezcla n- butanol- ácido acético glacial- agua (40:10:50) Fase estacionaria gel de sílice F_{254} de dimensiones: 10 x 10 cm y 0,2 mm de espesor.

Procedimientos de muestra y patrón:

Muestra problema: Se pesó 1 g de la droga seca en polvo y se le adicionó 10 mL de metanol, posteriormente se calentó en baño de agua a 65 ^{0}C por 5 minutos con agitación constante. Se enfrió y finalmente, se filtró.

Muestras de referencia: Se pesaron 0,5 mg de los patrones (Hesperidina y Quercetina), se disolvieron en metanol con ayuda del baño ultrasónico, fueron llevados a un matraz de 5 mL y se enrasó con el mismo disolvente.

Aplicación: Se aplicó 5 µL para la muestra de referencia y para la muestra problema. *Desarrollo:* Se aplicó por separado en la placa 5 µL de muestra problema y de la muestra de referencia. Se corrió el solvente hasta una distancia de 10 cm aproximadamente. *Secado:* Al aire, durante 15 minutos.

Detección: Examinar en luz ultravioleta a 254 nm y 365 nm.

Resultado esperado: Al revelar con la luz UV a 365nm la muestra presenta una mancha intensa fluorescente coincidente con el patrón de hesperidina (Rf=0.84), mientras que el revelado con la luz UV a 254 nm ofrece tres manchas oscuras a los valores de Rf=0.57, Rf=0.84 y Rf=0.93

2.2.2. Ensayos de pureza.

Los ensayos de pureza aplicados se corresponden con los reportados en la BP., **(BP 2013)**, para el polvo de la corteza de naranja amarga.

2.2.2.1. Pérdida de masa por desecación.

Procedimiento: Se pesó 1 g de la muestra de ensayo, con un error máximo de 0,5 mg, se transfirió a un pesafiltro, previamente tarado, y se desecó a 105 ^{0}C durante dos horas. Se colocó el pesafiltro en una desecadora, se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se pesó; se colocó nuevamente en la estufa durante dos horas. Se repitió esta operación hasta que se obtuvo una masa constante.

El ensayo se realizó por triplicado y se calculó la pérdida por desecación a través de la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{M2 - M1}{M} X\ 100$$

Donde:

M2: masa del pesafiltro con la muestra (g).

M1: masa del pesafiltro con la muestra desecada (g).

M: masa de ensayo.

100: factor matemático para los cálculos.

2.2.2.2. Cenizas totales.

Procedimiento: Se calentó al rojo un crisol de sílice durante 30 min. Antes de pesarlo, se dejó enfriar en un desecador. Se introdujo en el crisol 1 g de la droga pulverizada. Se distribuyó uniformemente la muestra del ensayo en el interior del crisol. Se desecó durante 1 h a 105 °C y después se calcinó en un horno mufla, a una temperatura de 600 ± 25 °C. La muestra no se incendió en ningún momento de la operación. Después de cada calcinación, se dejó enfriar el crisol en el desecador. Cuando tras una calcinación prolongada las cenizas contenían aún partículas negras, se suspendió las cenizas con agua caliente y se filtró por un filtro sin cenizas. Se calcinó de nuevo el residuo con el filtro. Se reunió el filtrado y las cenizas, se evaporó a sequedad y se calcinó hasta masa constante. Se realizó el cálculo mediante la siguiente ecuación:

$$C1 = \frac{M2 - M}{M1 - M} X\ 100 \qquad Ct = \frac{C1 \times 100}{100 - \%H}$$

Donde:

C1: cenizas totales en base hidratadas.

M: masa del crisol vacío (g).

M1: masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M2: masa del crisol con la ceniza (g).

100: factor matemático para los cálculos.

%H: por ciento de humedad.

2.2.2.3. Cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

Procedimiento: A las cenizas totales obtenidas se le añadieron 15 mL de ácido clorhídrico al 10%. Se tapó el crisol y se puso a hervir suavemente en la plancha (se contó 5 minutos después de hervir). Se filtró la solución con papel de filtro libre de cenizas. Se lavó el residuo con agua caliente y al añadirle al filtrado acidulado con ácido clorhídrico 1 ó 2 gotas de nitrato de plata 0.1 mol/L mostró presencia de cloruros. Se transfirió al crisol inicial el filtro con residuo. Se carbonizó en la plancha el crisol tapado. Se incineró en

horno mufla a 750 ^{0}C durante 2 horas. Se enfrió en una desecadora durante 30 minutos, y luego se pesó. Se repitió el proceso dos veces a partir de la incineración hasta que se obtuvo masa constante. Se realizó el cálculo mediante la siguiente ecuación.

$$C1 = \frac{M2 - M}{M1 - M} x100 \qquad Ci = \frac{C1x100}{100 - \%H}$$

Donde:

Ci: cenizas insolubles

C1: por ciento de cenizas insolubles.

M: masa del crisol vacío (g).

M1: masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M2: masa del crisol con cenizas insolubles (g).

100: factor matemático para los cálculos.

%H: por ciento de humedad.

2.2.2.4. Materias extractables.

A 2 g de droga en polvo se agrega una mezcla de 3 mL de agua destilada y 7 mL de etanol absoluto (70%) y extraiga durante 2 h agitando frecuentemente. Filtre y evapore 2 g del filtrado a sequedad en un baño de agua. Seque de 100-105 ^{0}C durante 3 horas. Se deja enfriar en una desecadora sobre pentóxido de fósforo y pese.

2.3. Verificación de los límites de especificación. Método de Bowker.

Para la verificación de los límites de especificación de los ensayos de pureza descritos en el FNFA fue aplicado el conocido método de Bowker. Para las especificaciones correspondientes a los ensayos de Pérdida de masa por desecación, Cenizas Totales, Cenizas insolubles en Ácido Clorhídrico y Material extractable, se determinó el límite unilateral de máximo, de la manera siguiente: Procedimiento experimental: Se realizaron 25 réplicas correspondientes a igual número de lotes, a los mismos se les aplicó el procedimiento correspondiente. El método de Bowker es utilizado para el cálculo de especificaciones y puede ser aplicado tanto para tamaño de muestras pequeñas como grandes, siendo poco laborioso. Mediante este método se pueden determinar los límites, con un nivel de confianza “N.C.” y un porcentaje de elementos buenos “100 Q”. Por ejemplo, si se establece un nivel de confianza del 95 % y un porcentaje de elementos buenos del 99 % (Q=0,99) quiere decir que se desea seguir un procedimiento tal, que el

95 % de todas las muestras posibles incluyan por lo menos el 99 % de los elementos dentro de los límites de especificación.

Cálculo de los límites para especificaciones unilaterales.

En muchos casos, de acuerdo con las características del proceso, se debe establecer un solo límite de especificación que cumpla ciertos requisitos estadísticos. Las fórmulas descritas según el método de Bowker para determinar los límites unilaterales son:

$$LSE = \bar{X} + K\bar{\sigma}$$

$$LIE = \bar{X} - K\bar{\sigma}$$

Donde:

$\bar{X}$ = Media aritmética

$\tilde{\sigma}$ = Desviación típica estimada

Para el cálculo de K se usa la expresión:

$$K = \frac{Z_P + C}{a}$$

Donde:

$$a = 1 - \frac{Z_\alpha}{2(n-1)}$$

$$b = Z_P^2 - \frac{Z_\alpha^2}{n}$$

$$c = \sqrt{Z_P^2 - ab}$$

Los valores de a, b y c solo se utilizan para realizar el cálculo de K. Para la determinación de los límites de especificaciones unilaterales de máximo y mínimo de los parámetros en el trabajo, se analizaron 25 muestras de igual número de lotes, se propuso tener un 95 % como nivel de confianza. Deseando además que los límites que se van establecer contengan al menos el 95,5 % de los elementos. Se determinó la media y la desviación estándar. Los valores de Z_p y Z_α se determinaron basándose en las áreas bajo la curva y en valores predefinidos en la tabla de áreas de la distribución normal correspondiente.

Teniendo como datos, la media, el nivel de confianza de 95 %, el número de lotes igual a 25, Q=0,995 y P=0,005, se obtuvieron valores de K para cada caso y un valor de Z_p=2,57 y Z_α =1,65 para la determinación del límite unilateral de máximo y mínimo que

corresponde a cada uno de estos parámetros. Los resultados obtenidos para el procesamiento de estos límites aparecen en las tablas A.1, A.2, A.3 y A.4 de los anexos.

2.4. Evaluación del ensayo cuantitativo. Determinación de los límites de especificación.

Como ensayo cuantitativo fue aplicado el ensayo validado por Rodríguez (2010) para la determinación de flavonoides, en base a quercetina.

Preparación del patrón: Se pesaron 1,5 mg de quercetina la cual fue disuelta con ayuda de un baño ultrasónico en acetato de etilo, llevada a un matraz aforado de 10 mL y enrasada con el mismo disolvente. A partir de esta disolución (150 μg/ml) se preparó una curva de calibración en el intervalo de 6 a 30 μg/ml. De dicha disolución se tomó una alícuota de 40 µl, 80 µl, 120 µl, 160 µl y 200 µl, se transfirió a un matraz aforado de 5 mL y se le adicionó 200 µL de una disolución de tricloruro de aluminio preparada al 2% con una disolución de ácido acético en metanol al 5%. A continuación, se completó el volumen con la disolución de ácido acético en metanol al 5%. Se leyó la absorbancia inmediatamente a 425 nm contra un blanco.

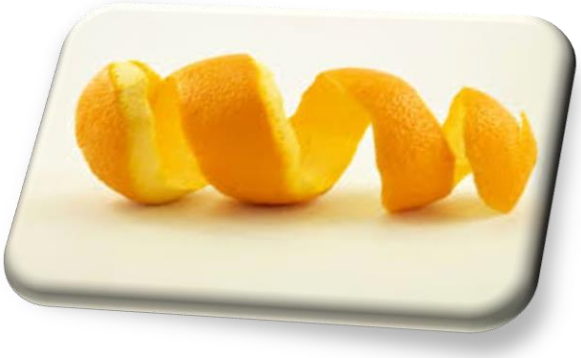
Preparación de la muestra: La extracción del concentrado de flavonoides se realizó utilizando la metodología descrita en la **(Eu. Ph 2016)** para esta finalidad. Se introdujo 1 g de droga pulverizada en un balón de 250 mL; se añadió 1 mL de la solución de hexametiltetramina (5 mg/ml), 20 mL de acetona y 2 mL de ácido clorhídrico al 25%. Se llevó a cabo una extracción por reflujo durante 30 minutos, después se filtró con la ayuda de un algodón y el residuo fue incorporado nuevamente al balón; se le adicionaron 20 mL de acetona y se reflujó esta vez por 20 minutos. Posteriormente se toma el algodón e introdúzcalo nuevamente en el balón y realice una última extracción con 20 mL de acetona reflujando por 10 min. Enfríe y filtre usando papel de filtro. Seguidamente transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL y complete volumen con acetona. Del extracto obtenido se tomó 20 mL con 20 mL de agua destilada y se adicionaron en un embudo separador para realizar tres extracciones líquido- líquido con 10 ml, 5 mL y 5 mL de acetato de etilo respectivamente. Los extractos orgánicos se colocaron en un vaso de precipitado y se le adicionaron 1 g de sulfato de sodio anhidro con el objetivo de eliminar el agua en el medio; a continuación, se filtró, se vertió en un matraz aforado de 25 mL y se enrasó con acetato de etilo. Seguidamente se toman 2 mL de la disolución anterior, se añaden 200 µL de tricloruro de aluminio al 2 % en ácido

acético glacial en metanol al 5% y se transfiere a un matraz aforado de 5 mL. Se enrasó con una disolución de ácido acético en metanol al 5%. Se leyó la absorbancia inmediatamente a 425 nm contra un blanco.

El límite de especificación se determinó aplicando el Método de Bowker, para determinar el límite de mínimo de la manera siguiente: Se realizaron 25 réplicas correspondientes a igual número de lotes y a los mismos se les aplicó el procedimiento descrito en el epígrafe 2.3.

2.5. Aplicación de los ensayos descritos para evaluar calidad del polvo de la corteza *C. sinensis* L suministrado por los CPL de diez municipios de la provincia de Villa Clara.

Los ensayos seleccionados y evaluados en el desarrollo del trabajo fueron aplicados para evaluar la calidad del polvo obtenido de la corteza de la naranja dulce, suministrado por diez CPL de la provincia de Villa Clara, considerados como lotes en dicha evaluación. Se siguieron las metodologías descritas en los epígrafes 2.2 y 2.4.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Resultados de los estudios realizados para establecer los procedimientos de control de calidad del polvo obtenido a partir de la corteza de la naranja dulce (*Citrus sinensis* L)

Después de haber realizado un análisis detallado de las monografías analíticas reportadas en las farmacopeas internacionales disponibles (Eur. Ph. (2016); USP (2012) y la B.P. (2013)), y del FNFA de Cuba **(Eu. Ph 2016) (USP 2012) (BP 2013) (Cruz Arzola 2017)**; para realizar el control de calidad de un IFAH se obtuvieron informaciones importantes que fueron tomadas en consideración en el presente trabajo:

I. En las farmacopeas no aparecen monografías analíticas para este IFAH, pero la BP, 2013 incluye una para la corteza de la naranja amarga.
II. El FNFA de Cuba incluye una monografía mixta de la corteza de naranja dulce, donde se precisan parámetros de calidad para el polvo obtenido de la cáscara (IFA) y el extracto fluido (IFA intermedio), en las formulaciones propuestas para su elaboración en los CPL.
III. Las monografías de los polvos están conformadas por los siguientes aspectos principales: (1) información Inicial (definición y contenido); (2) ensayos de identificación (descripción macroscópica y microscópica, reacciones colorimétricas y cromatografía en capa delgada); (3) ensayos generales de pureza (elementos extraños, pérdida por desecación, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido clorhídrico) y el (4) ensayo cuantitativo dirigido a determinar el contenido total de un grupo de metabolitos en base a unos de ellos.

A partir de lo anterior se desarrollaron los métodos de control que, una vez estandarizados y establecidos los límites correspondientes, permitirán proponer la metodología analítica correspondiente a la monografía del polvo. A continuación, se exponen dichos resultados.

3.1.1. Definición, contenido y características.

Definición: Corteza seca pulverizada de *C. sinensis* L.

Contenido: El polvo contiene no menos de 0.2 % de flavonoides, expresado en base al contenido de Quercetina.

Características: Polvo de color pardo, con olor característico del aceite esencial de la naranja. Las características macroscópicas y microscópicas de la planta aparecen descritas en las pruebas de identificación.

3.1.2. Ensayos de identificación.

Los ensayos de identificación evaluados fueron la descripción macroscópica y microscópica, la reacción colorimétrica con $FeCL_3$ y la CCD.

- **Descripción macroscópica y microscópica**

La descripción macroscópica de las cáscaras de *C. sinensis* L se corresponde con lo descrito por la BP. 2013 para la naranja, mientras que la descripción microscópica no fue encontrada en la literatura consultada, por lo que se considera un aspecto novedoso del presente trabajo.

- **Descripción Macroscópica:** Se comprobó que la cáscara de esta fruta se presenta desde el punto de vista macroscópico en piezas elípticas o irregulares de 5-8 cm de largo, 3-5 cm de ancho y aproximadamente 3 mm de grosor. La superficie exterior es amarillenta o pardo claro y claramente punteada, la superficie interna es amarillenta o blanca amarillenta.
- **Descripción Microscópica:** Reducir a polvo, utilizando un molino de cuchillas. El polvo es de color carmelita claro. Examínelo bajo un microscopio usando una solución de hidrato de cloral R. El polvo muestra los siguientes caracteres de diagnóstico: pequeñas células poligonales con paredes anticlinales ligeramente engrosadas, llenas de cromatóforos rojo anaranjado y estomas anomocíticos muy ocasionales; fragmentos de la hipodermis que muestran engrosamiento colenquimatoso; grupos de parénquima con cada célula que contiene un cristal prismático de oxalato de calcio; fragmentos de glándulas de aceite lisígeno; parénquima que contiene cristales de hesperidina que se disuelven en una solución de hidróxido de potasio R 20 g / l que da un color amarillo.
- **Reacción colorimétrica.**

Se estudiaron reacciones que permitieran evaluar la presencia de polifenoles, como metabolitos mayoritarios en el polvo, teniendo en cuenta que los metabolitos de interés, los flavonoides, responden estructuralmente a este grupo de compuestos. Para determinar la presencia de polifenoles se utilizó la típica reacción con tricloruro de hierro **(Eu. Ph 2016) (USP 2012) (BP 2013)**.

La concentración ensayada resultó ser positiva apareciendo un precipitado de color pardo oscuro instantáneo que demora en desaparecer, lo que demuestra la presencia de polifenoles en el polvo. Para la determinación del límite de detección, la reacción se desarrolló disminuyendo la cantidad ensayada en 0,5 mg cada vez, desde 10 mg. Teniendo en cuenta que todos los ensayos resultaron positivos menos 0,5 mg; se declara la concentración anterior: 1 mg como la cantidad mínima detectable para esta reacción.

- **Cromatografía en Capa Delgada (CCD).**

La CCD, junto con las reacciones de coloración y el análisis macro y micromorfológico, constituyen los ensayos comúnmente utilizados para realizar el control cualitativo de los ingredientes activos de origen vegetal que ya cuentan con monografías analíticas al efecto, recogidas en las farmacopeas vigentes. En este caso y teniendo en consideración que se trata de la evaluación cromatográfica de una mezcla de componentes de naturaleza variada, el análisis está dirigido a identificar uno o varios metabolitos de interés detallando todo lo que aparece en la placa, una vez que esta es revelada, a lo que se le conoce con el nombre de huella digital del producto. Lo anterior puede ser observado en las monografías de materia prima de origen vegetal que refiere la Farmacopea Europea en su última edición y como ejemplo se pueden citar los polvos de hojas de acacia y agrimonia en los cuales la CCD está dirigida a identificar la presencia de taninos y flavonoides respectivamente.

En el polvo obtenido de la planta en estudio, resultan metabolitos de interés los fenoles en general, ya que son estos metabolitos a los que se les atribuye la mayor cantidad de acciones que ha sido evaluada para esta planta, cuyos estudios aparecen referidos en la revisión bibliográfica del presente trabajo **(Guo, Liu et al. 2018) (Badawy Mohamed, Taktak Nehad et al. 2018) (Akdemir Evrendilek 2015) (Sapna, Prabu et al. 2016)**. Para la selección de las condiciones cromatográficas que se evaluaron se tuvo en cuenta fases móviles y reveladores que permitieran la detección de los flavonoides que fueron las sustancias de referencias aplicadas, seleccionando la que ofreció las manchas mejor resueltas. En la figura 3.1 se muestran las imágenes de las placas reveladas con luz UV a 365 y 254 nm; la figura 3.1 A se corresponde con la placa revelada con la luz UV a 365 nm, en la misma se observa una total correspondencia de una mancha con fluorescencia intensa que se corresponde con el

patrón de hesperidina, con coincidencia en el valor de Rf=0.84; por su parte al visualizar la placa a 254 nm la figura 3.1 B se observa una mancha por debajo y otra por encima por debajo de la mancha fluorescente de la hesperidina, correspondiendo la primera a la quercetina, al corresponder su valor de Rf (Rf=0.93). Además, la muestra a 254 nm muestra una mancha oscura con valor de Rf=0.57.

Figura 3.1 A

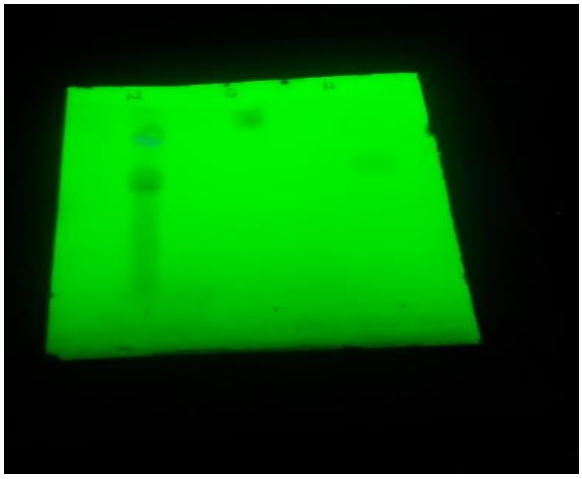


Figura 3.1 B

Figura 3.1. Placa de CCD aplicada a la muestra (M) y los patrones quercetina (Q) y hesperidina (H), en ese orden de izquierda a derecha), usando como fase estacionaria la Silicagel GF254, como fase móvil: n-butanol-ácido acético-agua (5:4:1) y como revelador la Luz UV 365 nm (Figura 3.1 A) y la Luz UV 254nm. (Figura 3.1 B)

3.1.3. Ensayos generales de pureza

Los ensayos generales incluyeron los ensayos de pérdida por desecación, cenizas totales, cenizas insolubles en ácido clorhídrico y la determinación de material extractable. Además, se determinaron los límites de especificación para los cuatro ensayos, para verificar los límites descritos en el FNFA (2017); en los tres primeros ensayos se determinó el Límite Superior de Especificación (LSE), mientras que para el material extractable se determinó el Límite Inferior de Especificación (LIE). A continuación, se discuten los resultados obtenidos para cada uno.

La determinación de los límites de especificación permite disponer de valores establecidos y confiables que formarán parte de la monografía de control de la calidad del polvo. En cada ensayo se procesaron 25 lotes, y los resultados aparecen igualmente en las **Tablas A.1, A.2 y A.3** (***Anexo A***). Los cálculos estadísticos, usando el método de Bowker **(Espinosa, 1987)** permitieron determinar el límite superior de especificación. Un

resumen de los valores obtenidos para los tres ensayos, se muestra en la tabla 3.1. Estos valores no se encuentran reportados en la literatura consultada para este material vegetal.

Tabla 3.1: Resultados obtenidos en la determinación de los límites de especificación para los ensayos generales que formaran parte de la monografía de calidad del polvo.

Parámetro	**X±SD**	**LSE**
Pérdida por desecación (%)	9,54 ± 0,45	10,61 (No mayor que 11)
Cenizas Totales (%)	4,23 ± 1,28	7,25 (No mayor que 7)
Cenizas insolubles en HCl (%)	1,21 ± 0,47	2,37 (No mayor que 2)

X: Media de 25 determinaciones; **SD**: Desviación estándar; **LSE**: Límite superior de especificación.

Al comparar los mismos con los valores registrados para ingredientes activos, de origen natural que contienen flavonoides, reportados en las farmacopeas actuales **Eur. Ph. (2016); USP (2012) y la B.P. (2013)**, (Tabla 1.1 y 1.2 del Cap. I), se puede afirmar que en el caso de la pérdida por desecación los valores son ligeramente inferiores a los reportados, aunque resultan valores altos, lo que infiere que se deben buscar alternativas para usar el polvo de la planta para su uso como ingrediente farmacéutico herbario en la elaboración de formas farmacéuticas sólidas ya que muestra criterios de cierta higroscopicidad; de igual manera, se deben tener en cuenta aspectos en cuanto a las condiciones de conservación y almacenamiento antes y después de su recepción en los CPL puesto que no se disponen de envases herméticos para su conservación y tampoco es conservada la materia prima en lugares secos y con humedad controlada, además que el clima en Cuba favorece que el material vegetal adquiera humedad, lo que facilita el crecimiento microbiano y la degradación de metabolitos secundarios con acciones importantes en la planta.

El ensayo de cenizas totales posee límites muy variados, justificado por una gran variabilidad en la composición del material vegetal, lo cual a su vez puede estar dado por la calidad del material recolectado; también, el tipo de suelo, pero como las plantas proceden del mismo lugar, este presenta baja incidencia; de igual manera, sobresale el clima, ya que las plantas se recolectaron en los meses de cosecha de la fruta, pero existen variaciones significativas en la temperatura de los tres meses principales de recolección (Noviembre-Diciembre y Febrero); y además, la conservación y estado de la

planta entregada por el Ministerio de la Agricultura (MINAGRI), donde se destaca el tiempo desde que se obtienen las cáscaras hasta que son recepcionadas en los CPL, así como las condiciones de envase y almacenamiento. Los resultados obtenidos en el presente trabajo se corresponden con los valores aceptables para este tipo de muestra

Por su parte en el ensayo de determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico los valores se corresponden, por similitud, a los reportados en la BP., 2013 para plantas medicinales, tales como la belladona, el limón y el stramonium, no obstante es importante aclarar que los mismos resultan altos para la mayoría de las plantas, lo que pudiera estar dado, fundamentalmente, por el tipo de suelo (Pardo con carbonato) donde ha sido cultivada la planta, que provoca en la misma una composición variada de elementos inorgánicos. Estos valores pudiesen ser indicativos de la contaminación del material vegetal con productos térreos; sin embargo, a pesar de que la muestra vegetal es obtenido de la cáscara de una fruta en los resultados obtenidos en el trabajo las cenizas insolubles son relativamente altos, lo que se pudiera atribuir a componentes que posee la planta intrínsecamente y que no tienen que ser necesariamente perjudiciales, ya que en algunas plantas el ensayo de cenizas refiere la presencia de materia mineral que pudiera ser responsable de alguna acción farmacológica (por ejemplo, las sales de potasio son responsables de la acción diurética presente en plantas), acción demostrada en la planta.

Por su parte para determinar en el ensayo de material extractable se determinó el LIE siguiendo la metodología descrita en la BP. 2013. Se obtuvo un valor de LIE= 3.15, lo que infiere disponer como límite un valor no menor que 3; este valor resultó ser inferior que el reportado para la naranja amarga en dicha monografía, cuyo LIE=6.

3.1.4. Ensayo cuantitativo. Determinación del límite de especificación.

La técnica espectrofotométrica, empleando la reacción de con tricloruro de aluminio, constituye el ensayo cuantitativo de elección para determinar el contenido de flavonoides presente en plantas medicinales, reportadas en las farmacopeas actuales (**B.P., 2013; Eur. Ph., 2005 y la USP, 2012*)***, lo cual fue tomado en consideración para su inclusión en la monografía en estudio. Sin embargo, la farmacopea usa el hiperosido como sustancia de referencia en el ensayo, reactivo no disponible en nuestro laboratorio lo que impidió aplicar el procedimiento descrito y obligó a aplicar una variante modificada de

esta técnica, que fue validada por Rodríguez (2010), en el cual se usa la quercetina como estándar.

Una vez verificada la técnica espectrofotométrica se aplicó la misma para determinar el límite unilateral de mínimo. Para ello se analizaron 25 réplicas correspondientes a igual número de lotes (obtenidos de diez CPL de diferentes municipios de la provincia de Villa Clara), a las mismas se les aplicó el método de Bowker. Los resultados se muestran en la **Tabla A.4** (**Anexos**). La planta en estudio posee un límite mínimo de flavonoides de 0,24%, valor que se considera bajo si se compara con plantas medicinales que tienen a los flavonoides como metabolitos de mayor interés farmacológico, como el *Ginkgo biloga* y la *Caléndula oficinales* por solo citar algunas de ellas, (Tabla 1.1, Cap. I) en las cuales los valores de LSE duplican el obtenido para el *C. sinensis*. Lo anterior hizo inferir que, aunque los flavonoides puedan contribuir a las diferentes acciones terapéuticas reportadas para la planta deben sumarse a la misma otros metabolitos que deberán ser evaluados en estudios posteriores.

3.2. Descripción de los ensayos de control de calidad del polvo de *Citrus sinensis* L. (Propuesta de Monografía).

Una vez seleccionados los ensayos cualitativos y el ensayo cuantitativo que formarían parte de la monografía analítica del polvo, se verificaron los límites de especificación de los ensayos, se procedió a redactar dicha monografía la cual se estructuró siguiendo la metodología descrita por las farmacopeas. A continuación, se describe la propuesta de derivada de los estudios realizados en el presente trabajo.

PROPUESTA DE MONOGRAFÍA

Corteza de la fruta de *C. sinensis* L.

DEFINICIÓN

Corteza seca pulverizada de *C. sinensis* L

Contenido: El polvo contiene no menos de 0.24% de flavonoides, expresado en base al contenido de Quercetina

CARACTERÍSTICAS

Polvo color pardo, con olor característico del aceite esencial de los cítricos. Sus características macroscópicas y microscópicas aparecen descritas en las pruebas de identificación A y B.

IDENTIFICACIÓN

A. Descripción Macroscópica: Se comprueba que la cáscara de esta fruta se presenta desde el punto de vista macroscópico en piezas elípticas o irregulares de 5-8 cm de largo, 3-5 cm de ancho y aproximadamente 3 mm de grosor. La superficie exterior es amarillenta o pardo claro y claramente punteada, la superficie interna es amarillenta o blanca amarillenta.

B. Descripción Microscópica: Reducir a polvo, utilizando un molino de cuchillas. El polvo es de color carmelita claro. Examínelo bajo un microscopio usando una solución de hidrato de cloral R. El polvo muestra los siguientes caracteres de diagnóstico: pequeñas células poligonales con paredes anticlinales ligeramente engrosadas, llenas de cromatóforos rojo anaranjado y estomas anomocíticos muy ocasionales; fragmentos de la hipodermis que muestran engrosamiento colenquimatoso; grupos de parénquima con cada célula que contiene un cristal prismático de oxalato de calcio; fragmentos de glándulas de aceite lisígeno; parénquima que contiene cristales de hesperidina que se disuelven en una solución de hidróxido de potasio R 20 g/L que da un color amarillo.

C. Reacción colorimétrica con $FeCl_3$: Añadir 3 g de droga en 25 mL de agua destilada, agitando durante 30 min. Filtrar y diluir en 30 mL de igual disolvente. Tomar 10 mL de esta disolución y adicionar 0,1 mL de solución de tricloruro férrico 10 %. El ensayo resulta ser positivo por la aparición de un precipitado color pardo oscuro instantáneo que demora en desaparecer.

D. Cromatografía en Capa Delgada

Examinar por cromatografía en capa delgada utilizando una placa de gel de sílice GF_{254} para CCD, Merck (dimensión 10 x 10 cm).

Fase móvil: se emplea una mezcla n- butanol- ácido acético glacial- agua (40:10:50)

Fase estacionaria gel de sílice F_{254} de dimensiones: 10 x 10 cm y 0,2 mm de espesor.

Procedimientos:

Muestra problema: Se pesa 1 g de la droga seca en polvo y se le adiciona 10 mL de metanol, posteriormente se calienta en baño de agua a 65 ^{0}C por 5 minutos con agitación constante. Se enfría y finalmente se filtra.

Muestras de referencia: Se pesan 0,5 mg de los patrones (hesperidina, quercetina), se disuelven en metanol con ayuda del baño ultrasónico, se llevan un matraz de 5 mL y se enrasa con el mismo disolvente.

Aplicación: Se aplica 5 µL para la muestra de referencia y para la muestra problema.

Desarrollo: Se aplica por separado en la placa 5 µL de muestra problema y de la muestra de referencia. Se corre el solvente hasta una distancia de 10 cm aproximadamente.

Secado: Al aire, durante 15 minutos.

Detección: Examinar en luz ultravioleta a 254 nm.

Resultados: Al revelar con la luz UV a 365 nm la muestra presenta una mancha intensa fluorescente coincidente con el patrón de hesperidina (Rf=0.84), mientras que el revelado con la luz UV a 254 nm ofrece tres manchas oscuras a los valores de Rf=0.57, Rf=0.84 y Rf=0.93

ENSAYOS GENERALES O DE IMPUREZAS

Material extractable: A 2 g de droga en polvo agregue una mezcla de 3 mL de agua destilada y 7 mL de etanol absoluto (70%) y extraiga durante 2 h agitando frecuentemente. Filtre y evapore 2 g del filtrado a sequedad en un baño de agua. Seque de 100-105 ^{0}C durante 3 horas. Deje enfriar en una desecadora sobre pentóxido de fósforo y pese.

<u>El contenido de materia extractable no es inferior a 3 %.</u>

Pérdida por desecación: De la muestra de ensayo pesar 1 g, con un error máximo de 0,5 mg, transferir a un pesafiltro, previamente tarado y desecar a 105°C durante dos horas. El pesafiltro se coloca en una desecadora, donde se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se pesa, colocar nuevamente en la estufa durante dos horas, repetir esta operación hasta obtener una masa constante. El ensayo se realiza por triplicado y la pérdida por desecación se calcula por la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{M2 - M1}{M} \times 100$$

Donde:

M2: masa del pesafiltro con la muestra (g).

M1: masa del pesafiltro con la muestra desecada (g).

M: masa de ensayo.

100: factor matemático para los cálculos.

El contenido de humedad no es superior a 11 %, determinado en 1 g de droga pulverizada por desecación en una estufa a 105°C durante 4 horas.

Cenizas Totales: Calentar al rojo un crisol de sílice o de platino durante 30 minutos. Antes de pesarlo, dejar que se enfríe en un desecador. Introducir en el crisol 2 g de la droga pulverizado. Distribuir uniformemente la muestra del ensayo en el interior del crisol. Desecar durante 1h a 100-105°C y después calcinar en un horno mufla, a una temperatura de 600 ± 25°C. La muestra no debe incendiarse en ningún momento de la operación. Después de cada calcinación, dejar enfriar el crisol en el desecador. Si tras una calcinación prolongada las cenizas contienen aún partículas negras, suspender las cenizas con agua caliente y filtrar por un filtro sin cenizas. Calcinar de nuevo el residuo con el filtro. Reunir el filtrado y las cenizas, evaporar a sequedad prudentemente y calcinar hasta masa constante.

Realizar el cálculo mediante la siguiente ecuación:

$$C1 = \frac{M2 - M}{M1 - M} X\ 100 \qquad Ct = \frac{C1 \times 100}{100 - \%H}$$

Donde:

C1: cenizas totales en base hidratadas.

M: masa del crisol vacío (g).

M1: masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M2: masa del crisol con la ceniza (g).

100: factor matemático para los cálculos.

%H: por ciento de humedad.

El contenido de cenizas totales no es más del 7 %, determinado en 2 g de droga pulverizada.

Cenizas insolubles en ácido clorhídrico: A las cenizas totales obtenidas se le añaden 15 mL de ácido clorhídrico al 10%. Se tapa el crisol y se pone a hervir suavemente en la plancha (contar 5 minutos después de hervir). Filtrar solución con papel filtro libre de cenizas. Lavar el residuo con agua caliente hasta que al añadirle al filtrado acidulado con ácido clorhídrico 1 ó 2 gotas de nitrato de plata 0.1 mol/L no muestre presencia de cloruros. Transferir al crisol inicial el filtro con residuo. Carbonizar en la plancha el crisol

tapado. Incinerar en horno mufla a 750ºC durante 2 horas. Enfriar en una desecadora durante 30 min y luego pesarlo. Repetir el proceso dos veces a partir de la incineración hasta obtener masa constante. Realizar el cálculo mediante la siguiente ecuación.

$$C1 = \frac{M2 - M}{M1 - M} x100 \qquad Ci = \frac{C1x100}{100 - \%H}$$

Donde:

Ci: cenizas insolubles

C1: por ciento de cenizas insolubles.

M: masa del crisol vacío (g).

M1: masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M2: masa del crisol con cenizas insolubles (g).

100: factor matemático para los cálculos.

%H: por ciento de humedad.

El contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico no es más del 2 %, determinado en 2 g de droga pulverizada.

VALORACIÓN

Preparación del patrón: Se pesan 1,5 mg de quercetina que se disuelve con ayuda de un baño ultrasónico en acetato de etilo, se lleva a un matraz aforado de 10 mL y se enrasa con el mismo disolvente. A partir de esta disolución (150 μg/mL) se prepara una curva de calibración en el intervalo de 6 a 30 μg/mL. De dicha disolución se toma una alícuota de 40 µL, 80 μL, 120 μL, 160 μL y 200 μL, se transfiere a un matraz aforado de 5 mL y se le adicionan 200 µl de una disolución de tricloruro de aluminio preparada al 2% con una disolución de ácido acético en metanol al 5%. A continuación, se completa el volumen con la disolución de ácido acético en metanol al 5%. Se lee la absorbancia inmediatamente a 425 nm contra un blanco.

Preparación de la muestra: Se introduce 1 g de droga pulverizada en un balón de 250 mL; se añade 1 mL de la solución de hexametiltetramina (5 mg/mL), 20 mL de acetona y 2 mL de ácido clorhídrico al 25%. Se lleva a cabo una extracción por reflujo durante 30 minutos, después se filtra con la ayuda de un algodón y el residuo es incorporado nuevamente al balón; se le adicionan 20 mL de acetona y se refluja esta vez por 20

minutos. Posteriormente se toma el algodón y se introduce nuevamente en el balón y se realiza una última extracción con 20 mL de acetona reflujando por 10 min. Enfríe y filtre usando papel de filtro. Seguidamente transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL y complete volumen con acetona. Del extracto obtenido se toman 20 mL con 20 mL de agua destilada y se adicionan en un embudo separador para realizar tres extracciones líquido- líquido con 10 ml, 5 mL y 5 mL de acetato de etilo respectivamente. Los extractos orgánicos se colocaron en un vaso de precipitado y se le adicionan 1 g de sulfato de sodio anhidro con el objetivo de eliminar el agua en el medio; a continuación, se filtra, se vierte en un matraz aforado de 25 mL y se enrasa con acetato de etilo. Seguidamente se toman 2 mL de la disolución anterior, se añaden 200 µL de tricloruro de aluminio al 2 % en ácido acético glacial en metanol al 5% y se transfiere a un matraz aforado de 5 mL. Se enrasa con una disolución de ácido acético en metanol al 5%. Se lee la absorbancia inmediatamente a 425 nm contra un blanco.

Determinación cuantitativa. Para el cálculo de las concentraciones se emplea el método de adición del patrón externo correspondiente al intervalo de 1,5 a 7,5 mg/L, empleando la ecuación de la recta obtenida en el ensayo de linealidad.

El contenido (%) de flavonoides totales, en base quercetina, no es menos que 0.2 %, determinado en 1 g de droga pulverizada.

CONSERVACIÓN

En envase hermético.

3.3. Aplicación de los ensayos de control de calidad al polvo de *Citrus sinensis* L.

Una vez verificados los límites de especificación de los ensayos y redactada la monografía de control de la calidad del polvo obtenido a partir de la corteza de *C.sinensis* L, estructurada siguiendo la metodología descrita por las farmacopeas, se aplicó la misma al control de la calidad de diez lotes suministrados por la misma cantidad de CPL de la provincia de Villa Clara. Los resultados promedios de tres determinaciones para cada lote aparecen descritos en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Resultados promedios obtenidos en el Control de calidad del polvo aplicando los ensayos de control de calidad evaluados en el trabajo.

Muestras	Ensayos de identificación			Ensayos específicos			Ensayo cuant. (% Flavonoides)
	Macro y Micro	Reacción de color	CCD a 365nm	Pérdida por desecación (%)	Cenizas totales (%)	Cenizas insolubles (%)	
Cifuentes	Cumple	++++	Cumple	9,51±0,19	2,88±0,05	1,57±0,24	0,45±0,087

Jibacoa	Cumple	++++	Cumple	9,81±0,04	2,83±0,13	1,65±0,31	0,45±0,027
Ranchuelo	Cumple	++++	Cumple	9,67±0,14	2,93±0,12	1,70±0,11	0,35±0,056
Encrucijada	Cumple	++++	Cumple	9,87±0,06	3,00±0,27	1,32±0,23	0,44±0,032
Quemado de Güines	Cumple	++++	Cumple	9,38±0,23	3,94±0,52	1,30±0,51	0,44±0,046
Santa Clara	Cumple	++++	Cumple	9,60±0,03	5,01±0,04	0,76±0,68	0,33±0,057
Sagua la Grande	Cumple	++++	Cumple	8,91±0,28	4,79±0,16	1,18±0,19	0,44±0,003
Caibarién	Cumple	++++	Cumple	8,98±0,61	4,48±0,19	1,80±0,32	0,56±0,061
Remedios	Cumple	++++	Cumple	9,79±0,06	4,35±0,07	0,79±0,28	0,45±0,010
Manicaragua	Cumple	++++	Cumple	9,51±0,29	6,95±0,17	1,69±0,28	0,50±0,077

Al aplicar la monografía a las muestras evaluadas se observa que los tres tipos de ensayos incluidos en la monografía de la farmacopea cumplen con los límites establecidos en la misma y al comparar los valores obtenidos para los diferentes lotes (Figura 3.2) se observa una similitud entre ellos, lo que permite afirmar que la materia prima entregada a los CPL posee la calidad requerida. Es importante destacar, como aspecto a tener en cuenta en la elaboración de formas terminadas, que los valores obtenidos en la perdida por desecación están muy cercanos al límite establecido, es decir la muestra tienen características de cierta higroscopicidad, típica en las materias primas de origen vegetal por lo que se deben tomar medidas en cuanto a la conservación y almacenamiento de la misma, considerando que una alta higroscopicidad le confiere a los polvos obtenidos de plantas condiciones propicias para el crecimiento microbiano y la degradación de metabolitos secundarios.

En cuanto al ensayo cuantitativo, se considera el ensayo más importante en toda monografía analítica y esta razón obliga a analizarlo con más detalle. Se muestra el comportamiento de este parámetro en cada CPL; como se observa, al igual que en los ensayos de pureza, los valores obtenidos para cada lote son bastante similares, lo que pudiera estar dado en ambos casos a la procedencia homogénea de este material herbario, que procede de una misma área de cultivo, con el mismo procedimiento de recolección y proceder para su uso como IFA herbario, aspecto muy favorable.

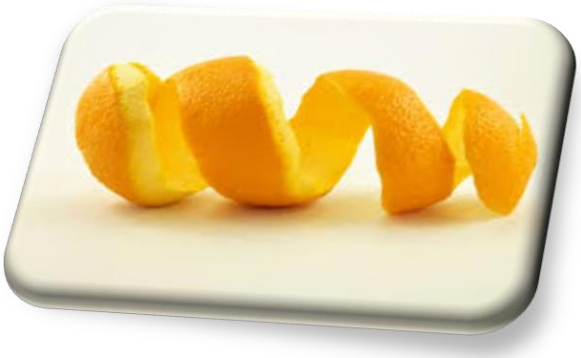
3.4. Resultados de la comparación de los valores reportados por el Formulario Nacional y los obtenidos en el presente trabajo, para el polvo de *C. sinensis* como IFAH.

En la tabla 3.3 se describen las especificaciones de calidad descritas por el FNFA (2017) y las obtenidas en el presente trabajo.

Tabla 3.3. Especificaciones de calidad reportadas y obtenidas en el presente trabajo

Parámetro	NRSP 358	Presente trabajo
Ensayos de identificación	No se describen	Se evaluaron: Análisis Macro y micromorfológico, reacción colorimétrica y CCD
Pérdida por desecación	Máximo 14 %	Máximo 11 %
Cenizas Totales	Máximo 6 %	Máximo 7 %
Cenizas insolubles	Máximo 0,5 %	Máximo 2 %
Material extractable	Mínimo 25 % (agua)	Mínimo 3 % (etanol)
Ensayo cuantitativo	Marcadores: Flavonoides sin límite	Flavonoides Mínimo: 0.2 %

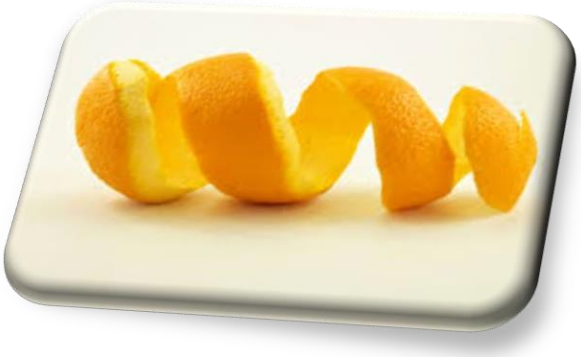
Como se observa en la tabla para este material vegetal no se describen ensayos de identificación ni límites en el ensayo cuantitativo, lo que es propuesto en el presente trabajo. Además, aunque los valores están cercanos, no hay coincidencia con los ensayos de pureza, estando las mayores diferencias en la pérdida por desecación y las cenizas insolubles; en esta última se recomienda realizar estudios que permitan dilucidar la composición de dichas cenizas, por las implicaciones que podría tener la presencia de compuestos inorgánicos no deseables en el organismo.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

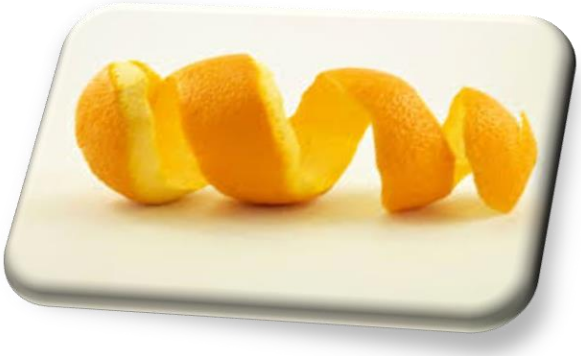
1. Se verificaron los límites de especificación establecidos por el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos para la corteza de los frutos de *Citrus sinensis L*., obteniéndose valores no coincidentes.
2. Se evaluó como ensayo cuantitativo para realizar el control de calidad de la corteza de los frutos de *Citrus sinensis L*. la determinación espectrofotométrica del total de flavonoides totales, en base quercetina, obteniéndose un LIE de 0.2%.
3. Se conformó una propuesta de monografía analítica para realizar el control de la corteza de *C. sinensis* como ingrediente farmacéutico activo herbario.
4. Se aplicó la monografía analítica propuesta para determinar la calidad del polvo de la corteza de diez lotes suministrados por los CPL de diferentes municipios de la provincia de Villa Clara, comprobándose que los mismos cumplen con los límites establecidos en la misma y por tanto están aptos para su uso como IFAH.



RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES.

1. Evaluar otra técnica analítica que permita cuantificar los flavonoides totales, con vistas a corroborar el bajo valor obtenido para estos metabolitos en el trabajo.
2. Realizar los estudios analíticos necesarios para conformar la monografía del jarabe al 10% y el champú obtenido del polvo de la corteza.
3. Realizar estudios que permitan determinar la presencia de compuestos inorgánicos en la muestra evaluada.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Directiva 2001/83/CE Del parlamento europeo y del consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 28.11.2001.

2. Ahmeda, O. M., M. A. Hassan, S. M. Abdel-Twab and M. N. Abdel Azeemc (2017). "Navel orange peel hydroethanolic extract, naringin and naringenin have antidiabetic potentials in type 2 diabetic rats." Biomedicine & Pharmacotherapy **94**: 197–205.
3. Ajikumaran Nair, S., S. R. Rajani Kurup, S. N. Akhila and B. Sabulal (2018). "Citrus peels prevent cancer." Phytomedicine. 50: 231-237.
4. Akdemir Evrendilek, G. (2015). "Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria." Int J Food Microbiol. **202**: 35-41.
5. Badawy Mohamed, E. I., E. M. Taktak Nehad and F. El-Aswad Ahmed (2018). "Chemical composition of the essential oils isolated from peel of three citrus species and their mosquitocidal activity against Culex pipiens." Natural Product Research **32**: 2829–2834.
6. Bandoni, A. L. (2011). "Evaluación farmacopeica de la calidad de drogas vegetales y productos relacionados. Estado actual en las farmacopeas argentina y brasilera." Dominguezia **27**: 35-56.
7. Baró, I., F. Cejas, M. Fernández, C. R. Martínez, J. Pérez and M. A. Vásquez (2003). Algunos ejemplos de plantas útiles. La Habana.
8. Bauer, R. (1998). "Quality Criteria and Standardization of Phytopharmaceuticals: Can Acceptable Drug Standards be Achieved?" Drug Inform. J. **32**: 101-110.
9. Benavente García, O. and J. Castillo (2008). "Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular and anti-inflammatory activity." J. Agric. Food Chem. **56**: 6185–6205.
10. Benavente García, O., J. Castillo, F. R. Marin, A. Ortuño and J. A. Del Rio (1997). "Uses and properties of citrus flavonoids." J. Agric. Food Chem **45**: 4505–4515.
11. Beyra, Á., M. C. León, E. Iglesias, D. Ferrándiz, R. Herrera, G. Volpato, D. Godínez, M. Guimarais and R. Álvarez (2004). "Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba)." Anales del jardín botánico de Madrid **61**: 185-204.
12. Blumenthal, M. (1998). The complete German Comission E Monographs. Texas, Ed. American Botanical Council.

13. Blumenthal M. Farm Bill Bans (2002). Use of Name “Ginseng” on Non-Panax Species: “Siberian Ginseng” no longer allowed as commercial term. HerbalGram. **56**: 54-55.
14. Bouchrane, E. (2014). Uso tradicional de plantas medicinales como antiasmáticas y anticatarrales en el municipio Santa Clara. Tesis para optar por el Título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas.
15. BP (2013). British Pharmacopoeia. London, Her Majesty's Stationery Office.
16. Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review." Int. J. Food Microbiol **94**: 223–253.
17. Busse, W. (2000). "The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products." Drug Inform J. **34**: 15-23.
18. Cañada Rodríguez, A., J. Antúnez Coca and J. C. Escalona Arranz (2018). "Estandarización de parámetros para el control de la calidad del extracto blando de *Caléndula oficcinalis* L." Revista Cubana de Tecnología de la Salud **9**: 1-12.
19. Cañigueral, S. (2002). "La Fitoterapia: ¿Una terapéutica para el tercer milenio?" Revista de Fitoterapia **2**: 101-121.
20. Cañigueral, S. (2006). "Las monografías de calidad seguridad y eficacia en el uso racional de los preparados a base de plantas medicinales." Revista de Fitoterapia **6**: 25-29.
21. Cañigueral, S., E. Dellacassa And A. L. Bandoni (2003). "Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?" Lat. Am. J. Pharm. **22**: 265-278.
22. Cebadera Miranda, L., L. Domínguez, M. I. Dias, L. Barros, I. Ferreira, M. Igualc, N. Martínez Navarrete, V. Fernández Ruiz, P. Morales and C. Montaña (2019). "Sanguinello and Tarocco (Citrus sinensis [L.] Osbeck): Bioactive compounds and colour appearance of blood oranges." Food Chemistry **270**: 395–402.
23. CECMED. "Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). ." Revisado Mayo 12, 2019, from http://www.cecmed.cu.
24. Chevallier, A. (1997). Enciclopedia de plantas medicinales. Madrid, Editorial Acento.

25. Cruz Arzola, D. (2017). Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos. Cuba, Editorial Ciencias Médicas. Habana.
26. Dechamp, J. F. (1999). Drug Information J. **33**: 309-313.
27. Eisenberg, D. M., R. D. Davis, S. L. Ettner, S. Appel, S. Wilkey, M. Van Rompay and R. C. Kessler (1998). "Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey." JAMA **280**: 1569-1575.
28. Elizagaray Fernández , E. and R. Castro Armas (2013). "Producción científica cubana sobre plantas medicinales y productos naturales a partir de la base de datos PlantMedCUBA, 1967-2010." Revista Cubana de Plantas Medicinales **18**: 348-360.
29. Erukainure, O. L., A. T. Osaretin Ebuehi, M. Iqbal Chaudhary, M. Ahmed Mesaik, A. Shukralla, A. Muhammad, Z. Moses Zaruwa and G. N. (2016). "Elem. Orange Peel Extracts: Chemical Characterization, Antioxidant, Antioxidative Burst, and Phytotoxic Activities." Journal of Dietary Supplements **34**: 234-240.
30. Espina, L., M. Somolinos, S. Lorán, P. Conchello, D. García and R. Pagán (2011). "Chemical Composition of Commercial Citrus Fruit Essential Oils and Evaluation of Their Antimicrobial Activity Acting Alone or in Combined Processes." Food Control **22**: 896–902.
31. Eu. Ph (2016). European Pharmacoppeia. Strasbourg, France. Council of Europe.
32. FDA (1994). The Dietary Supplement Health and Education Act of de 1994 (DSHEA). Disponible en: http://www.health.gov/dietsupp/ch1.htm
33. Ficher, K. and C. Phillips (2008). "Potential Antimicrobial Uses of Essential Oils in Food: Is Citrus the Answer?" Trends Food Sci. Technol **19**: 156–164.
34. Galati, E. M., M. T. Monforte, S. Kirjavainen, Forestieri. AM, A. Trovato and M. M. Tripodo (1994). "Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (note I): antiinflammatory and analgesic activity." Farmaco **48**: 709-712.
35. Galati, E. M., A. Trovato, S. Kirjavainen, A. M. Forestieri, A. Rossitto and M. T. Monforte (1996). "Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note III): antihypertensive and diuretic activity in rat." Farmaco **51**: 219-221.

36. Gallegos-Zurita, M. (2016). "Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador." An Fac med **77**: 327-332.
37. Geraci, A., V. Di Stefano, E. Di Martino, D. Schillaci and R. Schicchi (2016). "Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity." Natural Product research, **1**: 1-7.
38. Germosén-Robineau, L. (2005). Farmacopea Vegetal Caribeña. Managua y Santo Domingo, Enda-Caribe (Tramil).
39. Guo, K., K. Liu, W. Deng, B. Zhong, W. Yang and W. Chun (2018). "Chemical composition and antimicrobial activity of Gannan navel orange (Citrus sinensis Osbeck cv. Newhall) peel essential oils." Food Sci Nutr. **1**: 1–7.
40. Heisler, E., M. Budó, M. D. Schimith, M. R. Badke, S. Ceolin and R. M. Heck (2015). "Uso de plantas medicinais no cuidado à saúde: produção científica das teses e dissertações da enfermagem brasileira." Enferm Glob **14**: 390–417.
41. Horeau, L. and E. J. Da Silva (1999). "Medicinal plants: a re-emerging health aid " Electronic J. Biotechnol **2**: 56-70.
42. Iglesias Carres, L., A. Mas Capdevila, F. I. Bravo, G. Aragonès, B. Muguerza and A. Arola Arnal (2019). "Optimization of a polyphenol extraction method for sweet orange pulp (Citrus sinensis L.) to identify phenolic compounds consumed from sweet oranges." PLoS ONE **14**: 1-17.
43. Infomed (2019). "Efectos adversos de la naranja. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ang/vol3_2_02/ang07202.htm."
44. Infomed. (2019). "Naranja Dulce." from www.sld.cu.
45. ISO (1990). General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboraratories. Guide 25.
46. Klimczak, I., M. Małecka, M. Szlachta and A. Gliszczyńska-Świgło (2007). "Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices." J Food Compos Anal **20**: 313-322.
47. Kondo, S., K. Tsuda, N. Muto and J. Ueda (2002). "Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars." Sci Hortic **96**: 177-185.

48. Kumar, P., S. Mishra, A. Malik and S. Satya (2012). "Insecticidal Evaluation of essential oils of Citrus sinensis L. (Myrtales: Myrtaceae) against housefly, Musca domestica L. (Diptera: Muscidae)." Parasitol. Res. **110**: 1929–1936.
49. Lange, D. (1998). Europe's Medicinal and Aromatic Plants: their use, trade and conservation. Cambridge, Ed. Traffic International
50. Lazarowych, N. J. and P. Pekos (1998). "Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products." Drug Inform. J. **32**: 493-512.
51. Liew, S. S., W. J. Ho, S. Keong Yeap and S. H. B. Sharifudin (2018). "Phytochemical composition and in vitro antioxidant activities of Citrus sinensis peel extracts." PeerJ **6**: 1-16.
52. Longa, X., X. Zenga, H. Yana, M. Xua, Q. Zenga, C. Xua, Q. Xua, Y. Lianga and J. Zhang (2019). "Flavonoids composition and antioxidant potential assessment of extracts from Gannanzao Navel Orange (Citrus sinensis Osbeck Cv. Gannanzao) peel." Natural Product Research.DOI: 10.1080/14786419.2019.1593162. Aceptado.
53. Manthey, J., N. Guthrie and K. Grohmann (2001). "Biologial properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation." Curr. Med. Chem. **8**: 135–153.
54. Marinoff, M. A., J. L. Martínez and M. A. Urbina (2009). "Precauciones en el empleo de plantas medicinales." Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas **8**: 184-187.
55. Márquez Hernández, I., T. L. Bastidas Guerrero, G. K. Fernández Valarezo, M. Campo Fernández, C. G. Jaramillo Jaramillo and L. Rojas de Astudillo (2017). "Estudio farmacognóstico preliminar de tallo y raíz de la especie *Moringa Oleífera lam* cosechada en Machala." Revista Cubana de Plantas Medicinales **22**: 1-13.
56. Martínez Ávila, Y. and L. L. Gómez López (2013). "Impacto social de una estrategia de intervención sobre prescripción racional de medicina verde en Céspedes durante 2011." Rev Cuba Plantas Med **18**: 609–618.
57. Mehmood, B., K. K. Dar, S. Ali, U. A. Awan, A. Q. Nayyer and T. Ghous (2015). "Short communication: in vitro assessment of antioxidant, antibacterial and phytochemical analysis of peel of Citrus sinensis." Pak J Pharm Sci **28**: 231-239.

58. Minsap (1991). NSRP 311:91. Medicamentos de origen vegetal. Extractos y Tinturas. Procesos Tecnológicos Cuba.
59. Minsap (1997). NSRP 358:97. Medicamentos de origen vegetal. Corteza de Naranja dulce. Especificaciones.
60. Molina Calle, M., F. Priego Capote and M. D. Luque de Castro (2015). "Development and application of a quantitative method for determination of flavonoids in orange peel: Influence of sample pretreatment on composition." Talanta **144** 349–355.
61. Nesrin Fayek, M., A. Mohamed Farag, R. Azza Abdel Monem, Y. M. Moussa, S. M. Abd-Elwahab and N. D. El-Tanbouly (2019). "Comparative Metabolite Profiling of Four Citrus Peel Cultivars via Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with QuadrupoleTime-of- light-Mass Spectrometry and Multivariate Data Analyses." Journal of Chromatographic Science **1**: 1–12.
62. Onda, K., N. Horike, T. Suzuki and T. Hirano (2013). " Polymethoxyflavonoids tangeretin and nobiletin increase glucose uptake in murine adipocytes." Phytotherapy Research **27**: 312–316
63. Park, J. H., M. Lee and E. Park (2014). "Antioxidant Activity of Orange Flesh and Peel Extracted with Various Solvents." Prev. Nutr. Food Sci. **19**: 291-298.
64. Pascual Casamayor, D., Y. E. Pérez Campos, I. Morales Guerrero, I. Castellanos Coloma and E. González Heredia (2014). "Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional." Medisan **18**: 1467–1474.
65. Pereira Carolina, V., M. Duarte, P. Silva, A. Bento da Silva, M. M. Duarte Catarina, A. Cifuentes, V. García Cañas, M. R. C. Bronze Albuquerque and A. T. Serra (2019). "Polymethoxylated Flavones Target Cancer Stemness and Improve the Antiproliferative Effect of 5-Fluorouracil in a 3D Cell Model of Colorectal Cancer " Nutrients **11**: 326.
66. Qiu, P., H. Guan, P. Dong, S. Guo, J. Zheng, S. Li, Y. Chen, C. T. Ho, M. H. Pan, D. J. McClements and H. Xiao (2011). "The inhibitory effects of 5-hydroxy-3,6,7,8,30,40- hexamethoxyflavone on human colon cancer cells." Molecular Nutrition & Food Research **55**: 1523–1532.

67. Queart Álvarez, R. And M. Miranda Martinez (2000). "Contenido de aceite esencial en el follaje de Pinus caribean." Revista Cubana de Farmacia **34**: 125-128.
68. Rafiq, S., R. Kaul, S. A. Sofi, N. Bashir, F. Nazir and G. A. Nayik (2018). "Citrus peel as a source functional ingredient: a review." Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences **17**: 351-358.
69. Rawson, N. E., C. T. Ho and S. Li (2014). "Efficacious anti-cancer property of flavonoids from citrus peels." Food Science and Human Wellness **3**: 104–109
70. Reuter, H. D. (1991). "What are the possibilities and limits of therapy with European native drugs in modern clinical medicine? ." J. Ethnopharmacol **32**: 187-193.
71. Rodríguez Hernández, M. A. (2010). Evaluación de ensayos analíticos para la monografía de control de la calidad del polvo obtenido de *Psidium guajava* L. Tesis de maestría.
72. Roig, J. T. (1877). Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos, por el Dr. Juan Tomas Roig y Mesa. , The United States and its Territories, 1870 - 1925: The Age of Imperialism.
73. Roig, J. T. (1974). Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. La Habana, Editorial Revolución y progreso.
74. Roig, J. T. (1983). Compendio de obras. Cuba, Editorial Científico- Técnica.
75. Rojas Sazo, C. S., N. C. Cruz Palencia And A. R. Román Escobar (2011). Propuestas de normas de calidad farmacobotánica de cuatro especies de leguminosas con actividad antifúngica comprobada. Seminario de investigación para optar al título de químicas biólogas. Tesis de Grado.
76. Romero Gamero, M. Á. (2001). Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de la calidad de la industria farmacéutica. Tesis para aspirar por el grado de doctor en Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Barcelona.
77. Ruiz Pérez, N. J., M. González Ávila, J. Sánchez Navarrete, J. D. Toscano Garibay, M. A. Moreno Eutimio, T. Sandoval Hernández and M. Arriaga Alba (2016). "Antimycotic Activity and Genotoxic Evaluation of Citrus sinensis and Citrus latifolia Essential Oils." Scientific RepoRts **6**: 1-9.

78. OMS. (2003). Directrices de la Organización Mundial de la Salud sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra**:** 5.
79. Sapna, B. S., M. S. I. Prabu, S. Varghese, T. G. Bibin, T. Pathinettam Kandathil, B. Deepak, H. Shaista, S. Sreeja and D. D. Darshan (2016). "Antimicrobial effects of Citrus sinensis peel extracts against dental caries bacteria: An in vitro study." J Clin Exp Dent **8**: 70-77.
80. Shamloo, M. M., M. Sharifani, A. Daraei Garmakhany and E. Seifi (2015). " Alternation of secondary metabolites and quality attributes in Valencia Orange fruit (*Citrus sinensis)* as influenced by storage period and edible covers ." J Food Sci Technol **52**: 1936–1947.
81. Soler Cardoso, B. A. and M. Porto Verdecia (1997). " Experiencia cubana en el estudio y aplicación de medicamentos herbarios." Rev Cubana de Plant Med **2**: 30-34.
82. Steinegger, E. and R. Hänsel (1998). Pharmakognosie. Berlin, Ed. Springer-Verlag.
83. Taringa. net. (2019). "Hábitat de la naranja." Disponible en: http://www.taringa.net/posts/salud-bienestar/13245960/Todo-loque-deves-saber-de-la-naranja.html.
84. USP (2012). The United States Pharmacopeia. 30th ed. Rockville, MD, U.S.Pharmacopeial Convention, Inc.
85. Vlietinck, A. (1999). Phytomedicines and the European Pharmacopoeia. Memois of Section IV of the II World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare" (M. P. Gupta, A. Vlietinck and A. Cáceres. Panamá, Guatemala**:** 29-65.
86. WHO (2013). World Health Organization traditional medicine strategy 2014–2023. Geneva, WHO.