

DOI: <https://doi.org/10.46502/issn.2710-995X/2024.12.03>

Cómo citar:

Vega Fonseca, M. de los A., Ochoa-Pacheco, A., Igarza-Vázquez, G., & López Martínez, Y. (2024). Calidad y estabilidad de tinturas de la hoja seca de *Citrusxaurantium*L. *Orange Journal*, 6(12), 27-45. <https://doi.org/10.46502/issn.2710-995X/2024.12.03>

Calidad y estabilidad de tinturas de la hoja seca de *Citrusxaurantium*L

Quality and stability of tinctures of the dried leaf of *Citrusxaurantium*L.

Recibido: 11 de octubre de 2024

Aceptado: 22 de diciembre de 2024

Escrito por:

María de los Angeles Vega Fonseca¹ <https://orcid.org/0009-0004-6611-2184>**Ania Ochoa-Pacheco²** <https://orcid.org/0000-0002-1028-6626>**Georgina Igarza-Vázquez³** <https://orcid.org/0000-0002-9965-4367>**Yumisleydis López Martínez⁴** <https://orcid.org/0009-0007-9792-0469>

Resumen

En la provincia de Santiago de Cuba, existen limitaciones en el suministro de la corteza seca del fruto de *Citrus x aurantium* L. (Naranja agria) para la elaboración de la tintura al 20% establecida en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos de Cuba. Por consiguiente, la producción de este fitomedicamento con acción flebotónica se ha visto afectada desde 2016. En el presente trabajo, se realizó la evaluación de la calidad y de la estabilidad física, físico-química y química de dos tinturas formuladas a partir de la hoja seca de esta especie vegetal, con el objetivo de sustituir la formulación a base de la corteza seca.

Se elaboraron tinturas al 20% y al 50%, ambas con etanol al 70% y por el método de percolación. Se les determinaron parámetros de control de la calidad físicos, físico-químicos, químicos cualitativos y cuantitativos según la Norma Ramal de Salud Pública de Cuba 312 y otras referencias. La evaluación de la estabilidad se realizó por un periodo de 180 días a temperatura ambiente, envasadas en frascos de vidrio de color ámbar.

Ambas tinturas son similares en cuanto a propiedades organolépticas, pH, análisis capilar, composición química cualitativa y estabilidad en 180 días. Sin embargo, difieren desde el punto de vista estadístico en el índice de refracción, densidad relativa, sólidos totales y concentración de fenoles totales, a tiempo cero y a los 180 días. La selección de la tintura al 50% estuvo determinada por la mayor semejanza a la tintura normada a partir de la corteza seca del fruto, reflejado en el aspecto y valores de densidad relativa, pH, presencia de flavonoides, aceites esenciales, fenoles y taninos, y principalmente en los sólidos totales, que solo este cumple con el límite establecido. Además, posee la mayor concentración de fenoles totales.

Palabras claves: Calidad, *Citrusxaurantium*L., composición química cualitativa, fenoles totales, sólidos totales y tintura.

¹ Bachelor's degree in Pharmacy, Provincial Pharmacy and Optical Company (OPTIMED), Specialist in Pharmaceutical Services and Medicinal Plants, Santiago de Cuba, Cuba. Email: maria.v@uo.edu.cu

² Doctor in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy, Faculty of Natural and Exact Sciences, University of Oriente, Full Professor, Santiago de Cuba, Cuba. Email: aocchoap@uo.edu.cu

³ MSc., OPTIMED, Technical-Commercial director, Santiago de Cuba, Cuba. Email: georginaigarza@infomed.sld.cu

⁴ Bachelor's degree in Pharmacy, Provincial Pharmacy and Optical Company (OPTIMED), job-trained, Santiago de Cuba, Cuba. Email: yumisleydislopez73@gmail.com





Abstract

In the province of Santiago de Cuba, there are significant limitations in the supply of dried fruit peel from *Citrus x aurantium* L. (Sour orange) for the preparation of the 20% tincture established in the National Formulary of Phytopharmaceuticals and Apipharmaceuticals of Cuba. Consequently, the production of this phlebotonic phytochemistry has been affected since 2016. In this work, the quality and physical, physicochemical, and chemical stability of two tinctures formulated from the dried leaves of this plant species were evaluated, with the aim of replacing the formulation based on the dried peel.

Tinctures at 20% and 50% were prepared, both using 70% ethanol and the percolation method. Physical, physicochemical, qualitative, and quantitative chemical quality control parameters were determined according to the Cuban National Public Health Standard 312 and other references. The stability evaluation was performed for a period of 180 days at room temperature, packaged in amber glass bottles.

Both tinctures are similar in organoleptic properties, pH, capillary analysis, qualitative chemical composition, and stability over 180 days. However, they differ statistically in refractive index, relative density, total solids, and total phenol concentration at both time zero and 180 days. The selection of the 50% tincture was determined by its greater similarity to the standard tincture made from dried fruit peel, reflected in the appearance and values of relative density, pH, presence of flavonoids, essential oils, phenols, and tannins, and mainly in total solids, which only this one meets the established limit. Furthermore, it possesses the highest concentration of total phenols.

Keywords: Quality, *Citrus x aurantium* L., qualitative chemical composition, total phenols, total solids and tincture.

Introducción

Las enfermedades venosas son comunes a nivel mundial, afectando a amplios sectores de la población. Diversos artículos en la literatura científica reportan la mortalidad por enfermedades circulatorias dentro del patrón de mortalidad de cada país (Seuc et al., 2004). Entre las enfermedades que pueden afectar al sistema venoso, destacan por su frecuencia e importancia la insuficiencia venosa crónica, cuya principal manifestación son las varices, y la trombosis venosa profunda (Moñux, 2007). La insuficiencia venosa está presente entre un 10% y un 50% de la población adulta del mundo desarrollado (Rodríguez et al., 2014).

Estas enfermedades adquieren gran importancia a nivel global, debido a su elevada frecuencia, la repercusión laboral derivada de las molestias que producen a quienes las padecen y el gasto médico que generan (Moñux, 2007).

En Cuba, se calcula que del 10% al 15% de la población adulta padece varices y entre un 1% y un 2% sufre de úlceras flebotómicas. La flebitis y la tromboflebitis ocupan el octavo lugar como causa básica de muerte en la población cubana dentro del grupo de afecciones circulatorias periféricas (Gallardo et al., 2005). La importancia de la trombosis venosa profunda se debe a su potencial gravedad por la posibilidad de dar lugar a una embolia pulmonar, situación que puede resultar mortal (Moñux, 2007). Las enfermedades vasculares periféricas, motivo frecuente de consulta a nivel de la atención primaria y en los servicios de angiología, tienen un importante impacto socioeconómico en la población cubana y se han convertido en un problema de salud pública, que se pone de manifiesto por la necesidad frecuente de ingresos hospitalarios en los individuos afectados y el alto costo para el paciente, la familia y el estado (Landrove & Gámez, 2005).

En Cuba, existe un déficit de medicamentos con acción flebotónica, pues el único que se comercializa es la diosmina (500 mg tableta) (industrial e importado). En su composición se encuentran bioflavonoides naturales, en especial la hesperidina y diosmina, que son metabolitos abundantes en la corteza de los frutos cítricos (Kawai et al., 1999). El Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos de Cuba (MINSAP, 2017) establece fitomedicamentos con acción flebotónica, elaborados a partir de la corteza seca del fruto de *Citrus limon* (L.) Osbeck (Limón) y *Citrus x aurantium* L. (Naranja agria), respectivamente. Sin embargo, en la provincia de Santiago de Cuba existen grandes limitaciones con el suministro de este órgano vegetal para ambas especies, lo que ha conllevado a una producción muy reducida de estos desde el año 2016 (OPTIMED, 2016-2022). Entre las causas están: la cosecha de estos frutos se realiza en una



determinada época del año y la dificultad que presenta la agricultura para el procesamiento de estas materias primas.

Teniendo en cuenta estas limitaciones, la Empresa de Farmacias y Ópticas de Santiago de Cuba (OPTIMED) ha establecido dentro de sus líneas de investigaciones, estudios tecnológicos de estos fitomedicamentos con acción flebotónica. *Citrus x aurantium* L. (naranja agria o naranjo amargo) no solo es apreciada por el valor nutritivo de sus frutos, sino también por su actividad biológica demostrada como protectora de los pequeños vasos, antiespasmódica, diurética, antifúngica y antibacteriana. El fruto resulta una fuente importante de vitamina C; el pericarpio de la corteza contiene flavonoides como naringenina, hesperidina y diosmina; aceites esenciales (MINSAP, 2017); ácidos fenólicos; carotenoides y pectina (Maksoud et al., 2021). La hoja contiene también flavonoides, como neohesperidina, neodiosmina, naringina, roifolina (MINSAP, 2017) y diosmetina (Haggag et al., 1999); aceite esencial (MINSAP, 2017), ácido ascórbico, taninos, saponinas, fitoesteres, terpenoides, proantocianidinas y carbohidratos (Maksoud et al., 2021). Los alcaloides biológicamente activos, como la sinefrina (MINSAP, 2017; Haggag et al., 1999), se encuentran mayormente en el jugo y la corteza del fruto; además de otras vitaminas y minerales (MINSAP, 2017).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se realizó esta investigación con el objetivo general de evaluar la calidad y estabilidad física, físico-química, química cualitativa y cuantitativa de tinturas de *Citrus x aurantium* L. formuladas a partir de la hoja seca. Se seleccionó este órgano vegetal, debido a que esta especie es un árbol perennifolio o siempreverde, que no pierde sus hojas y pueden obtenerse todo el año; además, la agricultura dispone de la tecnología necesaria para el secado de este órgano vegetal. También, la hoja posee una composición química similar a la corteza del fruto, en cuanto a flavonoides, fenoles, aceites esenciales y ácido ascórbico. La diosmetina presente en la hoja es una flavanona con potente efecto antiplaquetario (Gohel & Davies, 2009; Ahmad et al., 2022) y esta no contiene sinefrina (MINSAP, 2017).

Son escasas las formulaciones con la hoja de esta especie vegetal a nivel internacional; solo se encontró una con la hoja fresca para su uso en microdosis (Muñoz et al., 2024). El desarrollo de esta investigación contribuirá a garantizar la disponibilidad de fitomedicamentos de producción nacional con acción flebotónica en el Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba para así satisfacer las demandas de salud de la población y la calidad de vida; con un gran impacto social, económico y ambiental.

Marco Teórico

Citrus x aurantium L., cuyo término común es cítrico, designa las especies de grandes arbustos o arbolillos perennes de la familia Rutaceae. Esta es una familia de plantas angiospermas que agrupa alrededor de 160 géneros y 1600 especies. El nombre específico *aurantium* hace referencia al color dorado de sus frutos y deriva del latín *auratus*, que significa "de color de oro". La fruta es conocida generalmente como naranjo agrio (Cuba), naranjo amargo, naranja bigarade, naranja andaluza, naranja de Sevilla, naranja cajera o naranja cachorreña (Venezuela y Argentina). En Paraguay y el noreste de Argentina, se suele nombrar como aepé.

Entre los usos demostrados por la ciencia se encuentran la actividad antioxidante (México), antiinflamatoria, protectora de los vasos sanguíneos, antiagregante plaquetario y antiaterogénico, como posibles opciones para el tratamiento de enfermedades vasculares (Ecuador) (Maksoud et al., 2021).

En la literatura científica, se reporta que los flavonoides, polifenoles, proantocianidinas y antioxidantes aislados de los cítricos actúan como flebotónicos y protectores vasculares, ya que ejercen su acción sobre la permeabilidad y fragilidad capilar, inhiben la agregación plaquetaria humana, elevan el tono venoso en venas periféricas y pueden ser un factor adyuvante para la cicatrización de úlceras en las piernas (Suntar et al., 2018; Cook & Samman, 1996; Benavente-García et al., 1997; Lyseng-Williamson & Perry, 2003; Gismondi et al., 2017; Belcaro et al., 2014; Pokrovsky et al., 2007; Gohel & Davies, 2009). También pueden ejercer su acción sobre el sistema vascular por sus efectos vasodilatadores e inhibiendo distintos sistemas enzimáticos relacionados con la funcionalidad de los vasos (Varona et al., 2003).



Los estudios de formulación farmacéutica a partir de diversas plantas medicinales han tomado una gran relevancia y auge a nivel mundial y en Cuba, porque no solo permiten disponer de preparados novedosos, sino también contar con fitoterapéuticos de gran interés farmacológico, eficaces y de menor costo para el tratamiento de distintas enfermedades (Mesa Vanegas, 2017).

Metodología

Recolección y procesamiento del material vegetal

Las hojas secas de *Citrus x aurantium* L. fueron suministradas con su certificado de calidad por la UBPC “La Rosita”, ubicada en Sabana Ingenio, latitud 20,055710 oeste y 200 3’ 21” norte, El Caney, municipio de Santiago de Cuba, Cuba. Adicionalmente, una muestra de este órgano vegetal fue llevada al Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO) de la ciudad de Santiago de Cuba, Cuba, para corroborar su identificación taxonómica. Posteriormente, se procedió a la determinación de la humedad residual, por el método infrarrojo, según el procedimiento descrito en el Manual de Procedimiento del Laboratorio MEDICUBA-SUIZA de la Universidad de Oriente, Cuba (2018).

Formulación de las tinturas

Para la formulación de las tinturas, se analizaron cuatro aspectos:

- **Selección de la materia prima a utilizar en las tinturas:** Se tuvieron en cuenta la sostenibilidad económica de la droga vegetal, su composición química y los efectos farmacotoxicológicos de los componentes químicos presentes (MINSAP, 2017; Gutiérrez et al., 2021; Haggag et al., 1999; Ojito Ramos, 2012).
- **Selección de la concentración de droga seca a utilizar en las tinturas:** Se consideraron las dos concentraciones de droga seca a utilizar en las tinturas, establecidas en la Norma Ramal de Salud Pública de Cuba (NRSP) 311 (MINSAP, 1991) para drogas no heroicas.
- **Selección del método de extracción a utilizar en las tinturas:** Se consideró el método de extracción establecido en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos de Cuba (MINSAP, 2017) para la tintura al 20% a partir de la corteza seca del fruto.
- **Selección del menstuo a utilizar en las tinturas:** Se consideró el menstuo establecido en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos para la tintura al 20% a partir de la corteza seca del fruto (MINSAP, 2017).

Elaboración de las tinturas

Se prepararon tres lotes de cada una de las dos formulaciones diseñadas, según la NRSP 311 (MINSAP, 1991) con una modificación, que consistió en la maceración durante 48 h para garantizar una mayor extracción de los constituyentes bioactivos.

- Tintura a la menor concentración de droga seca, normada para drogas no heroicas (MINSAP, 1991), con el menstuo normado para la tintura al 20% a partir de la corteza seca del fruto (MINSAP, 2017).
- Tintura a la mayor concentración de droga seca, normada para drogas no heroicas (MINSAP, 1991), con el menstuo normado para la tintura al 20% a partir de la corteza seca del fruto (MINSAP, 2017).

Determinación de los parámetros de control de la calidad físicos, físico-químicos, químicos cualitativos y cuantitativos a las tinturas elaboradas

Una vez obtenidas las tinturas, se les realizaron los controles de calidad físicos y físico-químicos según establece la NRSP 312 (MINSAP, 1991), excepto para el parámetro pH, que se realizó con papel pH. Los parámetros determinados fueron: características organolépticas, pH, índice de refracción, densidad relativa, porcentaje de sólidos totales y análisis capilar. Todos se realizaron por triplicado y se informaron los valores medios de las determinaciones $\pm$ desviación estándar (DE).



Adicionalmente, se determinó la composición química cualitativa a través de los ensayos del tamizaje fitoquímico (Ochoa et al., 2002) para los siguientes grupos de metabolitos secundarios: fenoles y taninos (ensayo de cloruro férrico), aceites esenciales (ensayo de Sudán III) y flavonoides (ensayos de Shinoda, álcalis, ácido sulfúrico concentrado y Rosemheim). Para determinar el índice de refracción, se utilizó un refractómetro ABBE de procedencia alemana.

Para la determinación de la composición química cuantitativa, se realizó el contenido de fenoles totales por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, según Palomino, García, Rojano & Diego (2009), con algunas modificaciones. Se leyó la absorbancia a 760 nm utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S, de procedencia americana. Se usaron disoluciones de ácido gálico (Sigma, USA) para construir la curva de calibración ($y = 15,94x - 0,047$, $R^2 = 0,998$). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes (Eq) de ácido gálico (AG)/g del extracto. Los valores se expresaron como la media de los análisis realizados por triplicado $\pm$ DE.

Evaluación de la estabilidad de las tinturas

Los tres lotes de las tinturas al 20% y 50% formuladas, respectivamente, fueron evaluados en su estabilidad física, físico-química, química cualitativa y cuantitativa (NRSP 312, MINSAP, 1991; Ochoa et al., 2002; Palomino et al., 2009), durante un período de 180 días, a temperatura ambiente y envasadas en frascos de vidrio de color ámbar. Para ello, se realizaron varias mediciones por triplicado: al momento de su extracción del percolador (tiempo cero), a los 30 días, a los 90 días y a los 180 días. Los parámetros determinados fueron los mismos que se emplearon en la determinación de los parámetros de control de la calidad física, físico-químico, química cualitativa y cuantitativa. Se consideró que la tintura era estable cuando no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros determinados con respecto al tiempo cero.

Selección de la tintura que cumpla con la calidad física, físico-química y química correspondiente

Los criterios establecidos para la selección de la mejor tintura fueron:

- Mayor porcentaje de sólidos totales.
- Mayor concentración de fenoles totales.
- pH entre 5 y 7.
- Presencia de flavonoides, aceites esenciales, fenoles y taninos.
- Estabilidad física, físico-química y química cualitativa y cuantitativa en el mayor período de tiempo.

Adicionalmente, se realizó una comparación de los resultados de calidad obtenidos con estas tinturas y la formulación normada a partir de la corteza seca del fruto (Tintura 20%) (MINSAP, 2017).

Análisis estadístico

Se llevó a cabo empleando el software Statgraphics Centurion XV versión 15.2.14 del 2007. Para el análisis de la determinación de los parámetros de calidad entre los tres lotes de ambas tinturas y el estudio de estabilidad en el período de 180 días, se empleó un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA). Las diferencias significativas entre grupos fueron determinadas aplicando el test de rangos múltiples: HSD de Tukey (máximas diferencias significativas). En todos los casos se trabajó con un nivel de significación del 95%.

Resultados y Discusión

Recolección y procesamiento del material vegetal

La identificación taxonómica de la especie vegetal corroboró que se trabajó con la hoja de *Citrus x aurantium* L.

El porcentaje de humedad residual determinado por el método infrarrojo fue de 9,446%, el cual se encuentra dentro de los límites permisibles para drogas no oficiales (entre 8-14%), según establece la Farmacopea Británica (British Pharmacopoeia, 2000). Se puede afirmar, bajo este criterio, que el proceso de secado resultó efectivo en la reducción de la cantidad de agua. Chil Núñez et al. (2022) informaron sobre los resultados de la determinación del porcentaje de humedad residual en las hojas secas de esta especie vegetal por el método azeotrópico de tolueno, en dos poblados del municipio de Santiago de Cuba, Cuba (La Gran Piedra y Siboney), siendo de 12,9 y 8,9% respectivamente. El resultado del poblado de Siboney es relativamente similar al obtenido en este estudio para este parámetro. Castillo-Téllez et al. (2017) reportaron el porcentaje de humedad residual para las hojas de esta especie secadas en un secador solar, con valores entre 8,75 y 8,85%; también relativamente cercanos a este estudio.

Formulación de las tinturas

Selección de la materia prima, concentración de droga seca, método de extracción y mensturo a utilizar en las tinturas

Selección de la materia prima a utilizar en las tinturas: El análisis realizado permitió seleccionar como materia prima la hoja, debido a los criterios que se describen a continuación:

- Esta especie es un árbol perennifolio o siempreverde, que no pierde sus hojas y pueden obtenerse todo el año, con lo que se garantiza la sostenibilidad económica de la materia prima.
- El Ministerio de la Agricultura de Santiago de Cuba dispone de la tecnología necesaria para el secado de este órgano vegetal.
- La hoja posee una composición química cualitativa similar a la corteza, en cuanto a flavonoides, fenoles, aceites esenciales y ácido ascórbico, que justifiquen la indicación como flebotónico. En la literatura científica se reporta que los flavonoides aislados de los cítricos actúan sobre la permeabilidad y fragilidad capilar, inhiben la agregación plaquetaria humana, elevan el tono venoso en venas periféricas y pueden ser un factor adyuvante para la cicatrización de úlceras en las piernas (Benavente-García et al., 1997; Lyseng-Williamson & Peerry, 2003). La diosmetina presente es una flavona con potente efecto antiplaquetario (Gohel & Davies, 2009). Los polifenoles, proantocianidinas y antioxidantes presentes pueden aliviar los síntomas de las enfermedades crónicas venosas (Ordoñez-Gómez et al., 2022).
- La ausencia del alcaloide sinefrina en la hoja es una ventaja, pues se ha demostrado que posee toxicidad cardiovascular, como arritmias ventriculares con alargamiento del complejo QRS (esto representa la despolarización ventricular en un electrocardiograma) y mortalidad en ratas (MINSAP, 2017). Determinadas personas pueden presentar factores de riesgo para ciertas reacciones adversas asociadas con el uso de productos con sinefrina, como: personas con factores de riesgo conocidos para enfermedad cardiovascular, como: alteraciones cardíacas, diabetes, alteraciones tiroideas, enfermedades del Sistema Nervioso Central, glaucoma, feocromocitoma e hipertensión; personas con hiperplasia de próstata, de bajo peso y con tratamiento con hormonas tiroideas y con inhibidores de la monoaminoxidasa, medicamentos para controlar el ritmo cardíaco o la presión sanguínea, o que tomen productos con cafeína (incluidas las bebidas de cola) (Gray & Wolf, 2005).
- La ausencia de furanocumarinas en la hoja con efecto fototóxico (MINSAP, 2017).

Selección de la concentración de droga seca a utilizar en las tinturas: El análisis realizado permitió definir la utilización de dos concentraciones de droga seca para la elaboración de las tinturas: 20% y 50% como establece la NRSP 311 (MINSAP, 1991), para drogas con menor actividad (drogas no heroicas). Además, se tuvieron en cuenta las siguientes fundamentaciones: La concentración al 20% está normada para la tintura de esta especie vegetal a partir de la corteza seca del fruto (MINSAP, 2017) y la concentración al 50%, se estima que permitirá garantizar la presencia de una mayor cantidad de principios activos con acción flebotónica comparable a la corteza, si se tiene en cuenta que esta posee un mayor número de componentes y concentración de algunos de los responsables de esta acción.



Selección del método de extracción a utilizar en las tinturas: Se seleccionó el método por percolación, por ser el establecido en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos (MINSAP, 2017) para la tintura al 20% a partir de la corteza seca del fruto.

Selección del menstuo a utilizar en las tinturas: Se seleccionó el etanol al 70% por ser el normado para la tintura 20% a partir de la corteza seca del fruto (MINSAP, 2017).

Elaboración de las Tinturas

Se prepararon seis lotes de las tinturas a partir de la hoja seca: tres lotes al 20% (T20E70) y tres lotes al 50% (T50E70), mediante el método de percolación según la NRSP 311 (MINSAP, 1991). El procedimiento de elaboración se desarrolló acorde a lo establecido por los investigadores y en la norma correspondiente (MINSAP, 1991).

Determinación de los Parámetros de Control de la Calidad Físicos, Físico-Químicos, Químicos Cualitativos y Cuantitativos a las Tinturas Elaboradas

Control de la Calidad Física y Físico-Química a las Tinturas

Requisitos organolépticos:

Las características organolépticas para los tres lotes en las tinturas al 20% y 50% fueron similares, mostrando un aspecto de líquido transparente y homogéneo, color ámbar verdoso y olor característico a la planta. El color obtenido para las tinturas a partir de la hoja (ámbar verdoso) difiere de lo reportado en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos (MINSAP, 2017) para la tintura al 20% a partir de la corteza seca del fruto (color amarillo claro). Esto puede deberse a las diferencias en las características propias de ambos órganos vegetales de la especie. Sin embargo, el aspecto coincide con lo normado para la tintura a partir de la corteza seca del fruto (MINSAP, 2017) y el olor, aunque característico a la planta, es más suave para la hoja (MINSAP, 2017).

El comportamiento del color, el olor y el aspecto obtenidos en las tinturas estudiadas se asemejan a lo reportado por Muñoz et al. (2024), quienes informaron que las características organolépticas de las tinturas madres elaboradas a partir de la hoja fresca de esta especie vegetal para ser utilizadas en microdosis fueron un líquido de color verde olivo con olor característico. No se encontraron otras publicaciones científicas que permitieran comparar este resultado para este parámetro.

pH:

Los valores de pH (6) son iguales para los tres lotes en ambas tinturas. El valor obtenido revela las características ácido débil de los constituyentes extraídos en ambas tinturas. Estas se pudieran atribuir a la presencia de ácido ascórbico, fenoles, taninos y flavonoides (Gutiérrez et al., 2021). Este valor de pH, además, se encuentra dentro del rango reportado en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos (MINSAP, 2017) para la tintura al 20% a partir de la corteza seca del fruto (5.2-6.2), por lo que se muestra coincidencia con lo normado. Se podría inferir que las tinturas elaboradas a partir de la hoja (20% y 50%) y a partir de la corteza del fruto (20%), poseen componentes químicos con características ácidas débiles similares. Al comparar estos resultados con lo reportado en un estudio realizado en el Estado de Campeche, México, para tinturas madres a partir de la hoja fresca de esta especie vegetal, se muestran coincidencias en cuanto a las características ácido débil (pH de 6.76) (Muñoz et al., 2024). No se encontraron otras publicaciones científicas que permitieran comparar este resultado para este parámetro.

Índice de refracción, densidad relativa y sólidos totales

En la Tabla 1 se recogen los valores de los parámetros: índice de refracción, densidad relativa y sólidos totales.

Tabla 1.

Parámetros de calidad físicos para las tinturas de Citrus x aurantiumL.

Tinturas/ Lotes	T20E70			T50E70		
	3001	3002	3003	3001	3002	3003
Índice de refracción	1,3663 ± 0,0003 ^a	1,3666 ± 0,0004 ^a	1,3669 ± 0,0001 ^c	1,3681 ± 0,0004 ^b	1,3681 ± 0,0006 ^b	1,3692 ± 0,0004 ^d
Densidad relativa (g/mL)	0,896 ± 0,0003 ^a	0,896 ± 0,0003 ^a	0,895 ± 0,0006 ^a	0,902 ± 0,0006 ^c	0,900 ± 0,0006 ^b	0,898 ± 0,0006 ^b
Sólidos Totales (%)	1,93 ± 0,03 ^a	1,93 ± 0,04 ^a	1,94 ± 0,01 ^a	3,23 ± 0,03 ^b	3,09 ± 0,03 ^b	2,80 ± 0,11 ^c

Leyenda: T20E70: tintura 20%; T50E70: tintura 50%

Valores medios ± DE. Letras diferentes entre las tinturas 20 y 50% para cada lote denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (ANOVA con prueba post-hoc de Tukey)

Fuente: autoría propia

Como se puede observar en la tabla 1, los valores de los índices de refracción en los tres lotes para cada tintura son bastantes similares e indican que se han extraído sustancias, pues son mayores al del etanol al 70% utilizado como menstruo (1,3638) (PanReacAppliChem ITW Reagents, n/f). Entre las tinturas, para cada lote, los valores son diferentes y resultan superiores para la tintura al 50 %. Por tanto, se podría inferir que los compuestos químicos extraídos en ambas tinturas difieren en la propiedad de refractar la luz. Esta observación se corroboró con el análisis estadístico realizado para este parámetro, el que reveló que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas tinturas para los tres lotes, para un 95% de confianza ($p < 0,05$).

Los valores del índice de refracción que se obtuvieron para ambas tinturas de la hoja en sus tres lotes, se encuentran por debajo del rango normado en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos de Cuba (MINSAP, 2017) para la tintura al 20% a partir de la corteza seca del fruto (1,370-1,380); aunque el valor del lote 3003 para la tintura al 50% está más cercano (1,3692 ± 0,0004). Por tanto, se podría estimar que las tinturas elaboradas a partir de la hoja (20% y 50%) y a partir de la corteza (20%), difieren en la propiedad de refractar la luz de los componentes químicos extraídos.

En cuanto a la densidad relativa (Tabla 1), se observa que son bastantes cercanos los valores entre los tres lotes en ambas tinturas; sin embargo, son diferentes entre estas para los tres lotes evaluados. Resultó superior la tintura al 50% en los tres lotes; debido a la mayor concentración de la droga seca utilizada y por tanto una mayor cantidad de metabolitos extraídos. Esta observación se corrobora con el análisis estadístico realizado para este parámetro, el que reveló que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas tinturas para los tres lotes, para un 95% de confianza ($p < 0,05$).

Los valores de la densidad relativa obtenidos en ambas tinturas muestran que se extrajeron compuestos presentes en la hoja, pues difieren de los del etanol 70% (0,789 g/mL) (Djoukeng et al., 2008). Estos valores coinciden con el rango de la densidad relativa establecido en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos de Cuba (MINSAP, 2017) para la tintura al 20% a partir de la corteza seca del fruto (0,8581-0,9581); por lo que se podría inferir que las tinturas elaboradas a partir de la hoja (20% y 50%) y a partir de la corteza (20%), poseen compuestos químicos con densidades relativas similares.

Para el porcentaje de sólidos totales (Tabla 1), se observó que existen diferencias en los valores entre ambas tinturas evaluadas, aunque entre los lotes para cada una de estas son relativamente cercanos, preferentemente para la tintura 20%. Estos resultaron superiores para la tintura al 50%

en los tres lotes; debido a la mayor concentración de droga seca utilizada y por tanto mayor cantidad de metabolitos. El análisis estadístico reveló que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas tinturas en los tres lotes para un 95% de confianza ($p < 0,05$); por tanto, el porcentaje de sólidos totales extraídos es diferente.

Los valores de la tintura al 50% en los tres lotes coinciden con lo normado para este parámetro en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos de Cuba (MINSAP, 2017) para la tintura al 20% a partir de la corteza seca del fruto (mínimo 2%); pero no en los tres lotes de la tintura al 20% pues se encuentran por debajo del 2%. Por tanto, solo la tintura 50% se asemeja a la normada a partir de la corteza seca del fruto (MINSAP, 2017) para este parámetro.

Análisis capilar

En la Tabla 2 se recogen los resultados del análisis capilar realizado a ambas tinturas.

Tabla 2.
Análisis capilar por lotes en cada tintura

Tinturas	Lotes	FRANJA				SF	BANDA		SUBBANDA
		A	Altura (cm)	Color	C	A y Color	Color	Altura (cm)	Color
T20E70	3001	No translúcida	14,2	Carmelita tenue	festonada	Color tenue, translúcida	Verde oscuro, no translúcida	6,0	Amarillo tenue
	3002	No translúcida	14,2	Carmelita tenue	festonada	Color tenue, translúcida	Verde oscuro, no translúcida	5,5	Amarillo tenue
	3003	No translúcida	13,4	Carmelita tenue	festonada	Color tenue, translúcida	Verde oscuro, no translúcida	5,0	Amarillo tenue
T50E70	3001	No translúcida	14,3	Carmelita tenue	festonada	Color tenue, translúcida	Verde oscuro, no translúcida	5,0	Amarillo tenue
	3002	No translúcida	12,9	Carmelita tenue	festonada	Color tenue, translúcida	Verde oscuro, no translúcida	4,5	Amarillo tenue
	3003	No translúcida	14,1	Carmelita tenue	festonada	Color tenue, translúcida	Verde oscuro, no translúcida	5,2	Amarillo tenue

Leyenda: A: aspecto, C: característica, SF: Subfranja.

Fuente: autoría propia

En este análisis se observó que los aspectos que se definen en la NRSP 312 (MINSAP, 1991) para su interpretación son similares de forma general para los tres lotes en ambas tinturas y entre estas. El color de la imagen en conjunto para cada uno de los lotes en ambas tinturas fue poco coloreada.

Como se observa en la Tabla 2, la altura de la franja para los tres lotes de ambas tinturas fue mayor a ocho, valor que la define como alta (NRSP 312, MINSAP, 1991); por lo que no hay diferencias entre las seis muestras. El aspecto de la franja para los tres lotes en ambas tinturas fue no translúcida, con color carmelita tenue y festonada. Para la subfranja, se obtuvo un color tenue en todas las muestras y es translúcida. Para la banda un color verde oscuro, no translúcida y los valores de la altura similares. Para la subbanda, se pudo apreciar un color amarillo tenue en todas las muestras.

Al observar los tres lotes de las tinturas al 20% con la lámpara ultravioleta a 366nm, se pudo apreciar que en el borde de las franjas presentan una fluorescencia azul violáceo intensa y no hubo cambios en la banda; sin embargo en los tres lotes de la tintura 50% se observó una ligera fluorescencia en esta misma zona y no hubo cambios en ninguna otra parte de la muestra. De forma general, el análisis capilar solo muestra una pequeña diferencia entre ambas tinturas, relacionada a la presencia o concentración de compuestos que presentan fluorescencia a la luz ultravioleta.

Para los parámetros: índice de refracción, densidad relativa, sólidos totales y análisis capilar no se encontraron publicaciones científicas de formulaciones farmacéuticas a partir de la hoja de la especie que permitieran comparar los resultados para estos parámetros.

Control de la calidad químico a las tinturas

Composición química cualitativa

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la composición química cualitativa para los tres lotes de ambas tinturas.

Tabla 3.

Composición química de las tinturas evaluadas

METABOLITOS/ ENSAYOS	TINTURAS/ LOTES	T20E70			T50E70		
		3001	3002	3003	3001	3002	3003
Aceites esenciales	Sudán III	+	+	+	+	+	+
Fenoles y taninos	Cloruroférico	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	Shinoda	+	+	+	+	+	+
	Ácidosulfúricoconcentrado	+	+	+	+	+	+
	Álcalis	+	+	+	+	+	+
	Rosemheim	+	+	+	+	+	+

Leyenda: T20E70: tintura 20 %; T50E70: tintura 50%; evidencias:+ positivo

Fuente: autoría propia

El comportamiento de ambas tinturas, en sus tres lotes, con relación a la composición química cualitativa, fue similar y positivo para los aceites esenciales, flavonoides, fenoles y taninos; metabolitos marcadores normados en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos de Cuba (MINSAP, 2017) para la corteza de los frutos y la tintura al 20% a partir de este órgano vegetal.

Se plantea en la literatura la presencia de linalool (11%) en el aceite esencial de la hoja (MINSAP, 2017); lo que coincide con los estudios de Azhdarzadeh & Mohammad (2016), que obtuvieron una proporción de 32,6% de linalool y 17,24% de α -terpineol por el método de hidrodestilación. Sarrou et al., (2013) reportaron que los principales componentes del aceite esencial de la corteza de la naranja agria que crece en Grecia fueron: limoneno (94,67%), mircenol (2%) y linalool (0,67%). Wang et al., (2023), reportaron un total de 17 compuestos identificados en un extracto de la hoja obtenido por ultrasonido, donde los principales constituyentes fueron: linalool (30,46%), acetato de linalilo (13,18%), limoneno (9,28%) y α -terpineol (9,25%).

Se obtuvo una coloración verde oscura para las seis muestras en el ensayo de cloruro férrico, por lo que se sugiere la posible presencia de taninos del tipo pirocatecólicos (Ochoa et al., 2002); resultado este que coincide con lo reportado por Ojito Ramos et al. (2012) y Villarreal_Ibarra et al. (2023).

En los ensayos para la determinación de flavonoides, en los tres lotes de las tinturas estudiadas, se pudieron apreciar una gama de colores que van desde el amarillo hasta el rojo intenso, lo que puede estar relacionado con la naturaleza de las estructuras químicas de estos metabolitos secundarios, resultando por ello de gran utilidad práctica. En la reacción con ácido sulfúrico concentrado todas las tinturas mostraron una coloración naranja, indicando la posible presencia de flavanonas (Ochoa et al., 2002; Ojito Ramos et al., 2012). En el ensayo de Shinoda, la aparición de una coloración roja para todas las tinturas, indica la posible presencia de flavonas (Ochoa et al., 2002; Ojito Ramos et al., 2012). En el ensayo con álcalis, los cambios de coloración fueron amarillo-naranja para las tinturas, indicativo de flavanonas y flavonol (Ochoa et al., 2002; Ojito Ramos et al., 2012). En el ensayo de Rosemheim, fue positivo para las antocianidinas, resultado que coincide con Gutiérrez et al. (2021), para extractos en etanol de las hojas de esta especie.

La presencia de flavonoides en esta especie vegetal, ha sido reportada por varios autores. Villareal et al. (2024), desarrollaron una caracterización fitoquímica del extracto hidroalcohólico de la hoja, mediante pruebas básicas, encontrándose estos metabolitos secundarios. Detectaron mediante cromatografía en capa fina en este extracto la presencia de naringina. Otros autores también han reportado diferentes flavonas, flavonas polimetoxiladas, flavonoles y flavanonas (neohesperidina y naringina) en las hojas de varias especies de cítricos incluyendo *Citrus x aurantium* L. (Djoukeng et al., 2008; Kawaii et al., 2000; Suntar et al., 2018). Haggag et al. (1999), identificaron por primera vez en un extracto en etanol de la hoja de la especie, los flavonoides: naringina glucósido (7,3 mg), vicenina (57,7 mg), neodiosmina (109,2 mg), diosmetina glucósido (133,4 mg), isovitexina (70,4 mg); entre otros (Figura 1).

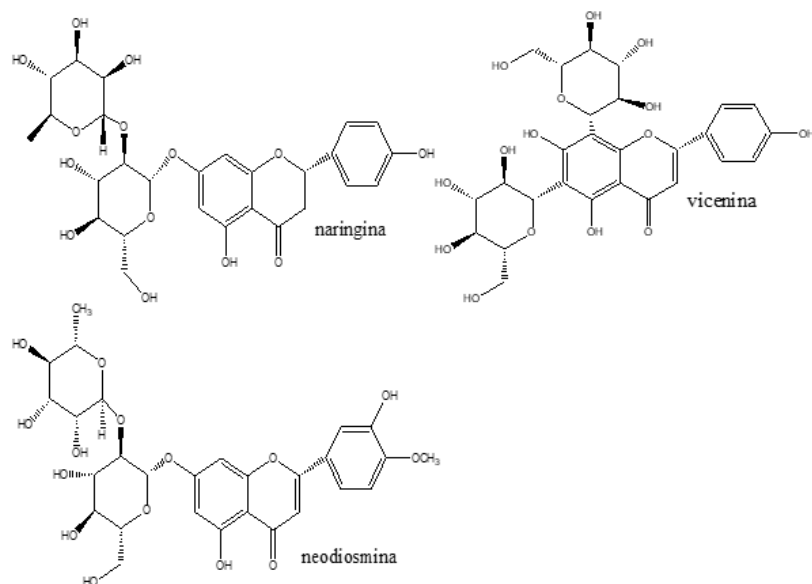


Figura 1. Estructuras químicas de flavonoides aislados en la hoja de *Citrus x aurantium* L.
Fuente: autoría propi.

Chil Núñez et al. (2022) y Camba Ramirez et al., (2022), también obtuvieron los mismos resultados de los grupos de metabolitos determinados en este estudio. Este resultado también coincide con los obtenidos por Murillo, Correa, Cerquera & Méndez (2018), donde se evalúa la presencia de aceites esenciales en la especie *Citrus x aurantium* L.

Los flavonoides, son uno de los metabolitos secundarios que juegan un papel importante en las propiedades farmacológicas de *Citrus x aurantium* L. Se ha reportado, que estos proporcionan actividad flebotónica y vasoprotectora, reforzado por las leucoantocianidinas; así como acción antioxidante comprobada en estudios *in vitro* (Ojito Ramos et al., 2012). La diosmina posee propiedades antiinflamatorias y reduce la permeabilidad capilar, siendo prescrita como diferentes especialidades farmacéuticas. La hesperidina tiene propiedades venotónicas, vasculoprotectoras, flevolíticas, antiartrítica antiinflamatoria y diurética. Su acción es sobre la microcirculación, aumentan la resistencia y la permeabilidad y protegen el endotelio vascular (Alonso, 2024). También poseen efectos analgésicos y antiagregantes plaquetarios. La diosmina y hesperidina, reducen el edema inducido por obstrucción venosa (Granados Loarca, 2003). Las flavonas, como la diosmetina poseen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antiagregantes plaquetaria y antihipertensivas y la neodiosmina tiene acción antiproliferativa en muchos tumores. Con relación a las flavanonas se plantea que la naringina tiene propiedades antitumoral, cardioprotector, inmunomodulador y la neohesperidina se utiliza como hipolipidémico e hipoglucémico (Gutiérrez et al., 2021). Los fenoles en general tienen acción antioxidante, los taninos le proporcionan a las hojas propiedades astringentes y antiinflamatorias (Bruneton, 1993).

Composición química cuantitativa

La cuantificación de fenoles totales se muestra en la tabla 4 para los tres lotes en ambas tinturas evaluadas.

Tabla 4.
Concentración de fenoles totales en las tinturas evaluadas

Tinturas	LOTES	Concentración de fenoles totales (miligramos Eqde AG/g del extracto) (media± DE)
T20E70	3001	0,016 ± 0,001 ^a
	3002	0,017 ± 0,001 ^a
	3003	0,016 ± 0,000 ^a
T50E70	3001	0,020 ± 0,001 ^c
	3002	0,024 ± 0,002 ^b
	3003	0,025 ± 0,001 ^b

Leyenda: T20E70: tintura 20%; T50E70: tintura 50%

Letras diferentes entre las tinturas 20 y 50% para cada lote denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (ANOVA con prueba post-hoc de Tukey)

Fuente: autoría propia

Como se puede apreciar en la tabla 4, la concentración de fenoles totales en los tres lotes de ambas tinturas fue similar y resultó mayor para la tintura al 50%, lo que coincide con el resultado de los sólidos totales y la densidad relativa. El análisis estadístico mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas tinturas en los tres lotes, para un 95% de confianza ($p < 0,05$); por tanto, la concentración de fenoles totales es diferente entre estas.

Ojito Ramos et al. (2012), obtuvieron un valor de fenoles totales de $31,82 \pm 2,81$ mgEqAG/mL, para un extracto de la hoja seca de la especie en etanol 70% obtenido por ultrasonido. Haraoui et al. (2020), reportaron una concentración de fenoles totales para un extracto de la hoja en metanol 80% obtenido por maceración, de $106,62 \pm 1,87$ mg EqAG/g de peso seco. Wang et al. (2023), obtuvieron valores de $69,09 \pm 0,61$ mg Eq AG/g de peso seco para un extracto en agua de la hoja obtenido por ultrasonido. Villareal et al. (2023), reportaron una concentración de $69,42 \pm 3,47$ Eq AG/g para un extracto en etanol de la hoja seca por maceración. En estudios realizados por Ordoñez-Gómez et al. (2018), para cuantificar fenoles en hojas y cáscaras de 12 cítricos, demostraron que las hojas de *Citrus x aurantium* L. poseen mayor contenido de fenoles (1,68 g/100 g) que las cortezas. Como se observa, estos reportes presentan variaciones a pesar de que las unidades de medidas del contenido de fenoles totales son diferentes.

Son diversas las causas que pueden influir en el contenido de un determinado metabolito, como: método de extracción y menstuo, factores genéticos, ontogenéticos, morfogenéticos y ambientales (época de recolección de la planta, la temperatura ambiental, precipitaciones, suelo, luz, organismos, entre otros) (Verma & Shukla, 2015; Li et al., 2020; Vanz et al., 2017; Ashraf et al., 2018; Isah, 2019).

Teniendo en cuenta factores genéticos, la literatura apunta a la existencia de varios miles de genes encontrados en los genomas de las plantas, de los cuales se supone que solo entre el 15 y el 25% contribuyen al metabolismo secundario que conduce a la síntesis de los metabolitos. Estos genes están regulados por diferentes factores de transcripción que influyen en la expresión génica y a su vez afectan el flujo metabólico. En el metabolismo secundario de las plantas, muchas enzimas catalizan la síntesis de múltiples productos a partir de diferentes sustratos. La ontogenia es el proceso completo de desarrollo de un organismo, que comienza con las semillas y pasa por varias etapas: plántula, juvenil vegetativa, maduración y senescencia. Cada etapa presenta características específicas y a lo largo de este ciclo, la concentración de metabolitos primarios y secundarios, como alcaloides y compuestos fenólicos, varía según las condiciones ambientales y las necesidades de defensa de la planta, lo que significa que no se mantienen constantes durante toda su vida (Verma & Shukla, 2015). Desde el punto de vista ambiental, las plantas interactúan con el medio circundante para su supervivencia y, por lo tanto, están influenciadas por varios factores ambientales, incluidos estímulos bióticos y abióticos que regulan la biosíntesis de los metabolitos secundarios. Las plantas de la misma especie cultivadas en diferentes entornos pueden tener diferencias en la concentración de un metabolito secundario particular. Como consecuencia a estos factores se producen en la planta estrés de tipo biótico y abiótico, respectivamente. En respuesta a esto, las plantas producen metabolitos secundarios específicos para contrarrestarlos (Ashraf et al., 2018; Isah, 2019).

Evaluación de la estabilidad de las tinturas

Las características organolépticas y el pH se mantuvieron similares en los 180 días en estudio, para los tres lotes en ambas tinturas y entre estas, con respecto al tiempo cero; por lo que mantuvieron su estabilidad en cuanto a estos dos parámetros.

En la Tabla 5 se muestra el comportamiento del índice de refracción en el periodo de 180 días para los tres lotes de las tinturas al 20 y 50%, respectivamente.

Tabla 5.
Comportamiento del índice de refracción en el periodo de 180 días

TINTURAS	LOTES/ TIEMPO (t) (Días)	t=0	t=30	t= 90	t= 180
T20E70	3001	1,3663 ± 0,0003 ^{ab}	1,3651 ± 0,0003 ^{ab}	1,3665 ± 0,0004 ^{ab}	1,3665 ± 0,0005 ^{ab}
	3002	1,3666 ± 0,0004 ^{ab}	1,3665 ± 0,0003 ^{ab}	1,3660 ± 0,0008 ^{ab}	1,3663 ± 0,0002 ^{ab}
	3003	1,3669 ± 0,0001 ^{ab}	1,3670 ± 0,0003 ^{ab}	1,3671 ± 0,0002 ^{ab}	1,3671 ± 0,0001 ^{ab}
T50E70	3001	1,3681 ± 0,0004 ^{ac}	1,3684 ± 0,0005 ^{ac}	1,3684 ± 0,0005 ^{ac}	1,3682 ± 0,0007 ^{ac}
	3002	1,3681 ± 0,0006 ^{ac}	1,3681 ± 0,0006 ^{ac}	1,3680 ± 0,0006 ^{ac}	1,3680 ± 0,0006 ^{ac}
	3003	1,3692 ± 0,0004 ^{ac}	1,3692 ± 0,0003 ^{ac}	1,3694 ± 0,0003 ^{ac}	1,3692 ± 0,0004 ^{ac}

Leyenda: T20E70: tintura 20%; T50E70: tintura 50%

Valores medios ± DE. Letras iguales en los lotes para cada tintura en el tiempo denotan no diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (ANOVA con prueba post-hoc de Tukey)

Fuente: autoría propia

El comportamiento del índice de refracción para los tres lotes de la tintura al 20% y al 50% en el periodo de 180 días fue bastante cercano, se mantuvo la superioridad de los valores de la tintura al 50% y la inferioridad al intervalo de 1,370-1,380 normado para la tintura al 20% de la corteza de los frutos (MINSAP, 2017). El análisis estadístico reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en cada uno de los lotes de las tinturas al 20 y 50%, respectivamente, en el periodo de 180 días con un nivel del 95% de confianza; pero sí entre ambas tinturas en cada uno de los tres lotes, lo que permite confirmar que existen diferencias en la propiedad de refractar la luz de los componentes químicos presentes en estas dos formulaciones en el tiempo. Por tanto, los tres lotes de ambas tinturas mantienen su estabilidad física en el periodo de 180 días de acuerdo al índice de refracción; pero son diferentes entre las dos tinturas.

En la Tabla 6 se muestra el comportamiento de la densidad relativa en el periodo de 180 días para los tres lotes de las tinturas al 20 y 50%, respectivamente.

Tabla 6.
Comportamiento de la densidad relativa (g/mL) en el periodo de 180 días

TINTURAS	LOTES/ TIEMPO (t) (Días)	t=0	t=30	t= 90	t= 180
T20E70	3001	0,896 ± 0,000 ^{ab}	0,895 ± 0,001 ^{ab}	0,896 ± 0,001 ^{ab}	0,896 ± 0,001 ^{ab}
	3002	0,896 ± 0,000 ^{ab}	0,896 ± 0,001 ^{ab}	0,896 ± 0,001 ^{ab}	0,896 ± 0,001 ^{ab}
	3003	0,895 ± 0,001 ^{ab}	0,896 ± 0,001 ^{ab}	0,890 ± 0,001 ^{ab}	0,895 ± 0,001 ^{ab}
T50E70	3001	0,902 ± 0,001 ^{ac}	0,903 ± 0,001 ^{ac}	0,903 ± 0,001 ^{ac}	0,902 ± 0,001 ^{ac}
	3002	0,900 ± 0,001 ^{ac}	0,900 ± 0,001 ^{ac}	0,900 ± 0,001 ^{ac}	0,901 ± 0,001 ^{ac}
	3003	0,898 ± 0,001 ^{ac}	0,900 ± 0,002 ^{ac}	0,900 ± 0,001 ^{ac}	0,900 ± 0,001 ^{ac}

Leyenda: T20E70-tintura 20%; T50E70: tintura 50%

Valores medios ± DE. Letras iguales en los lotes para cada tintura en el tiempo denotan no diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (ANOVA con prueba post-hoc de Tukey)

Fuente: autoría propia

El comportamiento de la densidad relativa para los tres lotes de la tintura al 20% y al 50% en el periodo de 180 días fue bastante cercano, se mantuvo la superioridad de los valores de la tintura al 50% con respecto

al 20% y ambos dentro del intervalo de 0,8576-0,9586 normado para la tintura al 20 % de la corteza de los frutos (MINSAP, 2017). El análisis estadístico reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en cada uno de los lotes de las tinturas al 20 y 50%, respectivamente, en el periodo de 180 días con un nivel del 95% de confianza; pero sí entre ambas tinturas en cada uno de los tres lotes en el tiempo, lo que permite confirmar que existen diferencias en la densidad relativa de los componentes químicos presentes en estas formulaciones. Por tanto, los tres lotes de ambas tinturas mantienen su estabilidad física de acuerdo a este parámetro en el periodo de 180 días; pero son diferentes entre las tinturas.

En la Tabla 7 se muestra el comportamiento del porcentaje de los sólidos totales en el periodo de 180 días para los tres lotes de las tinturas al 20 y 50%, respectivamente.

Tabla 7.
Comportamiento del porcentaje de sólidos totales (%) en el periodo de 180 días

TINTURAS	LOTES/ Tiempo (t) (Días)	t=0	t=30	t= 90	t= 180
T20E70	3001	1,93 ± 0,03 ^{ab}	1,94 ± 0,04 ^{ab}	1,94 ± 0,03 ^{ab}	1,93 ± 0,03 ^{ab}
	3002	1,93 ± 0,04 ^{ab}	1,97 ± 0,02 ^{ab}	1,96 ± 0,02 ^{ab}	1,93 ± 0,03 ^{ab}
	3003	1,94 ± 0,01 ^{ab}	1,94 ± 0,02 ^{ab}	1,98 ± 0,02 ^{ab}	1,98 ± 0,02 ^{ab}
T50E70	3001	3,23 ± 0,03 ^{ac}	3,23 ± 0,03 ^{ac}	3,22 ± 0,04 ^{ac}	3,23 ± 0,03 ^{ac}
	3002	3,09 ± 0,03 ^{ac}	3,10 ± 0,04 ^{ac}	3,06 ± 0,07 ^{ac}	3,11 ± 0,03 ^{ac}
	3003	2,80 ± 0,11 ^{ac}	2,80 ± 0,12 ^{ac}	2,91 ± 0,03 ^{ac}	2,91 ± 0,02 ^{ac}

Leyenda: T20E70: tintura 20%; T50E70: tintura 50%

Valores medios ± DE. Letras iguales en los lotes para cada tintura en el tiempo denotan no diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (ANOVA con prueba post-hoc de Tukey)

Fuente: autoría propia

El comportamiento de los sólidos totales para los tres lotes de la tintura al 20% y al 50% en el periodo de 180 días fue bastante cercano desde el punto de vista matemático y se mantuvo la superioridad de los valores de la tintura al 50%. Los valores de los tres lotes de la tintura 50% cumplieron en el tiempo el valor normado para la tintura al 20% de la corteza de los frutos (superior al 2%) (MINSAP, 2017), lo que no ocurrió con los de la tintura 20%. El análisis estadístico reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en cada uno de los lotes de las tinturas al 20 y 50%, respectivamente, en el periodo de 180 días con un nivel del 95% de confianza; pero sí entre ambas tinturas en cada uno de los tres lotes, lo que permite confirmar que existen diferencias en los sólidos totales extraídos en estas dos formulaciones. Por tanto, los tres lotes de ambas tinturas mantienen su estabilidad física en cuanto al porcentaje de sólidos totales en el periodo de 180 días; pero son diferentes entre las tinturas.

El comportamiento del análisis capilar en el periodo de 180 días para los tres lotes de las dos tinturas y entre estas fue similar, todas mostraron el mismo patrón, caracterizado por poseer un borde de la franja festonado de color carmelita tenue, no translúcida y alta; la subfranja translúcida de color tenue, la banda de color verde oscuro no translúcida y la subbanda de color amarillo tenue. Sólo se observa una ligera variación en la altura de la franja y la banda, lo que puede estar influenciado por la temperatura, ya que se ha comprobado que a bajas temperaturas la altura disminuye, mientras que a temperaturas mayores de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, tiende a subir por encima de lo normal (NRSP 311/91) (MINSAP, 1991). Durante el estudio de la estabilidad hubo fluctuaciones de la temperatura ambiental. En el examen bajo la luz UV a 366nm, se pudo observar que los tres lotes de las tinturas al 20% mantuvieron la fluorescencia azul violáceo en la zona superior de la franja, mientras que las del 50% muy ligera fluorescencia durante los 180 días del estudio. Por tanto, los tres lotes de ambas tinturas mantienen su estabilidad física en cuanto al análisis capilar en el periodo de 180 días y son similares ambas tinturas.

La composición química cualitativa se mantuvo sin variación en todos los ensayos realizados hasta los 180 días, demostrándose la presencia de aceites esenciales, flavonoides, fenoles y taninos, para todos los lotes, tanto de las tinturas al 20%, como al 50%. Por tanto, los tres lotes de ambas tinturas mantienen su estabilidad en cuanto a la composición química cualitativa en el periodo de 180 días y son similares ambas tinturas.

En la Tabla 8 se muestra el comportamiento de la cuantificación de fenoles totales en el periodo de 180 días para los tres lotes de las tinturas al 20 y 50%, respectivamente.

Tabla 8.

Comportamiento de la cuantificación de fenoles totales (miligramos Eq de AG/g del extracto) en el periodo de 180 días

TINTURAS	LOTES/ Tiempo (t) (Días)	t=0	t=30	t= 90	t= 180
T20E70	3001	0,016 ± 0,001 ^{ab}	0,015 ± 0,001 ^{ab}	0,018 ± 0,001 ^{ab}	0,018 ± 0,001 ^{ab}
	3002	0,017 ± 0,001 ^{ab}	0,017 ± 0,001 ^{ab}	0,018 ± 0,001 ^{ab}	0,016 ± 0,001 ^{ab}
	3003	0,016 ± 0,000 ^{ab}	0,016 ± 0,001 ^{ab}	0,018 ± 0,001 ^{ab}	0,018 ± 0,002 ^{ab}
T50E70	3001	0,020 ± 0,001 ^{ac}	0,020 ± 0,001 ^{ac}	0,021 ± 0,001 ^{ac}	0,021 ± 0,002 ^{ac}
	3002	0,024 ± 0,002 ^{ac}	0,023 ± 0,001 ^{ac}	0,024 ± 0,001 ^{ac}	0,024 ± 0,002 ^{ac}
	3003	0,025 ± 0,001 ^{ac}	0,025 ± 0,001 ^{ac}	0,024 ± 0,001 ^{ac}	0,022 ± 0,003 ^{ac}

Leyenda: T20E70: tintura 20%; T50E70: tintura 50%

Valores medios ± DE. Letras iguales en los lotes para cada tintura en el tiempo denotan no diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (ANOVA con prueba post-hoc de Tukey)

Fuente: autoría propia

El comportamiento de la cuantificación de los fenoles totales para los tres lotes de la tintura al 20% y al 50% en el periodo de 180 días fue bastante cercano y se mantuvo la superioridad de los valores de la tintura al 50%. El análisis estadístico reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en cada uno de los lotes de las tinturas al 20 y 50%, respectivamente, en el periodo de 180 días con un nivel del 95% de confianza; pero sí entre ambas tinturas en cada uno de los tres lotes, lo que permite confirmar que existen diferencias en la concentración de fenoles totales presentes en estas dos formulaciones. Por tanto, los tres lotes de ambas tinturas mantienen su estabilidad química en cuanto a la concentración de fenoles totales en el periodo de 180 días; pero las tinturas son diferentes.

No se encontraron publicaciones científicas para formulaciones de la hoja de la especie en el tiempo que permitieran comparar los resultados de los parámetros: características organolépticas, pH, índice de refracción, densidad relativa, sólidos totales, análisis capilar, composición química cualitativa y concentración de fenoles totales.

Selección de la tintura que cumpla con la calidad física, físico-química y química correspondiente

Un análisis integral de los resultados del control de la calidad y estudio de estabilidad a las tinturas elaboradas a partir de la hoja seca de *Citrus x aurantium* L., permitió arribar a las siguientes consideraciones, teniendo en cuenta los criterios establecidos para la selección de la mejor formulación y la comparación con la normada a partir de la corteza seca del fruto (MINSAP, 2017).

Se seleccionó la tintura al 50%, pues aunque ambas formulaciones son similares en el periodo de 180 días en cuanto a propiedades organolépticas, pH, análisis capilar, composición química cualitativa de flavonoides, aceites esenciales, fenoles y taninos; solo esta cumple con el valor de los sólidos totales normado para la tintura 20% a partir de la corteza seca del fruto (MINSAP, 2017) y resulta superior este parámetro al igual que la concentración de fenoles totales, con diferencias estadísticamente significativas (95%).

Por tanto, la tintura al 50% a partir de la hoja seca de esta especie vegetal es la que posee una calidad física, físico-química y una composición química cualitativa comparable a la elaborada a partir de la corteza seca del fruto (MINSAP, 2017) para los parámetros aspecto, pH, densidad relativa, sólidos totales y la presencia de flavonoides, aceites esenciales, fenoles y taninos.

Conclusiones



1. Las tinturas al 20% y 50% elaboradas a partir de la hoja seca poseen similares características organolépticas, pH, composición química cualitativa y análisis capilar; pero difieren desde el punto de vista estadístico en el índice de refracción, densidad relativa, porcentaje de sólidos totales y concentración de fenoles totales. Ambas tinturas cumplen con lo normado para la tintura al 20% a partir de la corteza seca del fruto, en cuanto a los parámetros de calidad: aspecto, densidad relativa, pH y composición química cualitativa; no así para el porcentaje de sólidos totales que solo coincide la tintura al 50%.
2. Las seistinturas elaboradas a partir de la hoja seca de *Citrus x aurantium* L. resultaron estables desde el punto de vista físico, físico-químico y químico cualitativo y cuantitativo por un período de 180 días en las condiciones de estudio. El comportamiento de los parámetros evaluados mantiene las mismas semejanzas y diferencias entre la tintura 20 y 50% en el tiempo.
3. La tintura al 50% a partir de la hoja seca de esta especie vegetal posee una calidad física, físico-química y una composición química cualitativa comparable a la tintura al 20% normada a partir de la corteza seca del fruto; lo que constituye una primera evidencia que sienta las bases de futuros estudios tecnológicos como flebotónico.

Proyecciones futuras

1. Evaluar otros parámetros de calidad física, química cualitativa y cuantitativa para la tintura al 50% elaborada a partir de la hoja seca, en un mayor número de lotes y épocas del año.
2. Desarrollar estudio de estabilidad físico, físico-químico y químico a la tintura al 50% elaborada a partir de la hoja seca, en un periodo de dos años.

Referencias bibliográficas

- Ahmad, T., Javed, A., Khan, T., Althobaiti, Y. S., Ullah, A., Almutairi, F. M., & Shah, A. J. (2022). Investigation into the antihypertensive effects of diosmetin and its underlying vascular mechanisms using rat model. *Pharmaceuticals*, 15(8), 951. <https://doi.org/10.3390/ph15080951>
- Alonso, J.R. (2024). *Aparato cardiovascular. Várices*. Asociación Argentina de Fitomedicina. http://www.colfarn.org.ar/biblio/biblio_archivos/VARICES.pdf
- Ashraf, M.A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., & Arif, M.S. (2018). Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*, 153-67. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00008-X>
- Azhdarzadeh, F., & Mohammad, H. (2016). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Leaf, Ripe and Unripe Peel of Bitter Orange (*Citrus aurantium*) Essential Oils. University of Khuzestan, Iran. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(1), 43-50. <http://doi.org/10.18869/acadpub.nfsr.3.1.43>
- Belcaro, G., Dugall, M., Luzzi, R., Hosoi, M., & Corsi, M. (2014). Improvements of venous tone with pycnogenol in chronic venous insufficiency: An *ex vivo* study on venous segments. *International Journal of Angiology*, 23(1), 47-52. <http://doi.org/10.1055/s-0033-1363785>
- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., & Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(12), 4505-4515. <http://doi.org/10.1021/JF970373S>
- British Pharmacopoeia Commission (2000). *British Pharmacopoeia 2000: Published on the Recommendation of the Medicines Commission Pursuant to the Medicines Act 1968 and Notified in Draft to the European Commission in Accordance with Directive 98/34/EEC*. Editor: Stationery Office, 2000: Great Britain. Dept. of Health and Social Services, Northern Ireland. Vol. 1. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/>
- Bruneton, J. (1993). *Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales*. Segunda edición. Editorial Acribia S.A. ISBN 978-84-200-0956-8
- Camba Ramirez, W. E., Petroche Torres, D. J., Cortez Suarez, L. A., & Mariscal Santi, W. E. (2022). Tamizaje fitoquímico, fenoles totales y actividad antioxidante del *Citrus aurantium*. *RECIAMUC Ecuador*, 6(3), 470-479. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.\(3\).julio.2022.470-479](https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.(3).julio.2022.470-479)
- Castillo-Téllez, M., Ovando-Sierra, J.C., Andrade-Durán, J.E., & Lezamazárraga, F. (2017). Cinética de secado de la hoja de naranja amarga (*Citrus aurantium*), bajo condiciones controladas y en un



- secador solar directo con convección natural y forzada. *Revista de Sistemas Experimentales*, 4(11), 34-41. Disponible en: <https://acortar.link/jsDFOG>
- Chil Núñez, I., Pérez Rondón, L., Hanlan Paumier, K., & Costa Acosta, J. (2022). Influencia de variables meteorológicas en la especie medicinal *Citrus x aurantium* L. *Revista Científica Del Amazonas*, 5(9), 14-25. <https://doi.org/10.34069/RA/2022.9.02>
- Cook, N.C., & Samman, S. (1996). Flavonoid-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66-76. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9)
- Djoukeng, J. D., Arbona, V., Argamasilla, R., & Gomez-Cadenas, A. (2008). Flavonoid Profiling in Leaves of *Citrus* Genotypes under Different Environmental Situations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11087-97. <https://doi.org/10.1021/jf802382y>
- Empresa de Farmacias y Ópticas (OPTIMED) (2016-2022). *Planes de Producción de Fito y Apifármacos 2016-2022*, Santiago de Cuba, Cuba
- Gallardo, U. J., Seuc, A. H., Zangronis, L., Rubio, Y., Puentes, I., López, L., & Domínguez, E. (2005). Impacto de la mortalidad por enfermedades vasculares periféricas, Cuba 2000. *Rev Cubana Angiol Cir Vasc*, 6(1). <https://acortar.link/CiyW41>
- Gismondi, A., Di Marco, G., Canuti, L., Canini, A. (2017). Antiradical activity of phenolic metabolites extracted from grapes of white and red *Vitis vinifera* L., cultivars. *Bitis*, 56, 19-26. <https://doi.org/10.5073/vitis.2017.56.19-26>
- Gohel, M.S., & Davies, A.H. (2009). Pharmacological agents in the treatment of venous disease: an update of the available evidence. *Current vascular pharmacology*, 7(3), 303-308. <https://doi.org/10.2174/157016109788340758>
- Granados Loarca, E. A. (2003). Uso de flavonoides (Hesperidina) en el tratamiento de venas varicosas vesicales sangrantes. *Actas Urológicas Españolas*, 27(9), 732-734. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062003000900012
- Gray, S., & Woolf, A. D. (2005). *Citrus aurantium* used for weight loss by an adolescent with anorexia nervosa. *Journal of adolescent health*, 37(5), 414-415. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2004.12.011>
- Gutiérrez, M. D. C. V., Méndez, M. D. R. L., Ramírez, M. D. J. G., Tun, S. G. D. R. C., & Rosado, L. O. V. (2021). El tamizaje fitoquímico de la naranjaagria (*Citrus aurantium* L.), estrategia para su valoración por los estudiantes de la carrera en químico farmacéutico biológico de la UACAM. *Revista de Boletín REDIPE*, 10(10), 125-130. <https://doi.org/10.36260/rbr.v10i10.1471>
- Haggag, E. G., Mahmoud, I. I., Abou-Moustafa, E. A., & Mabry, T. J. (1999). Flavonoids from the leaves of *Citrus aurantium* (Sour Orange) and *Citrus sinensis* (Sweet Orange). *Asian Journal of Chemistry*, 11(3), 707-714. <https://acortar.link/wKuzsc>
- Haraoui, N., Allem, R., Chaouche, T.M., & Belouazni, A. (2020). In-vitro antioxidant and antimicrobial activities of some varieties *Citrus* grown in Algeria. *Advances in Traditional Medicine*, 20, 23-34. <https://doi.org/10.1007/s13596-019-00379-9>
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52(39). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., & Yano, M. (1999). Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3565-71. <https://doi.org/10.1021/jf990153+>
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., Koizumi, M., ... & Furukawa, H. (2000). Quantitative Study of Flavonoids in Leaves of citrusPlants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3865-71. Doi: <https://doi.org/10.1021/jf000100o>
- Laboratorio MEDICUBA-SUIZA. (2018). *Manual de Procedimiento. Balanza de Humedad Residual MB-110*. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente. Disponible en: www.pce-instruments.com
- Landrove, O.R., & Gámez, A.B. (2005). La Transición epidemiológica y las Enfermedades Crónicas No Transmisibles en las Américas y en Cuba: el Programa de intervención cubano. *Reporte Técnico de Vigilancia*, 10(6). http://bvs.sld.cu/uats/rtv_files/2005/landrove.html
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant physiology biochemistry*, 148, 80-9. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>



- Lyseng-Williamson, K.A., & Perry, C.M. (2003). Micronised purified flavonoid fraction: a review of its use in cronic venous insufficient, venous ulcers and haemorrhoids. *Drugs*, 63, 71. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363010-00005>
- Maksoud, S., Abdel-Massih, R. M., Rajha, H. N., Louka, N., Chemat, F., Barba, F. J., & Debs, E. (2021). *Citrus aurantium* L. Active Constituents, Biological Effects and Extraction Methods. An Updated Review. *Molecules*, 26(19), 5832. <https://doi.org/10.3390/molecules26195832>
- Mesa Vanegas, A. M. (2017). Una visión histórica en el desarrollo de fármacos a partir de productos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(3), 16-27. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57956616003.pdf>
- MINSAP. (1991). NRSP311. *Extractos fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. Disponible en: <https://acortar.link/nNEOvb>
- MINSAP. (1991). NRSP312. *Extractos fluidos y tinturas. Métodos de Ensayos*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. Disponible en: <https://acortar.link/yIrY3i>
- MINSAP. (2017). Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos. 2da Edición. Cuba: ECIMED. Disponible en: <https://acortar.link/59wQDp>
- Moñux, G.D. (2007). *Libro de la Salud Cardiovascular, Capítulo 61: Enfermedades de las venas*. Varices y trombosis venosa profunda. Disponible en: https://www.fbbva.es/microsites/salud_cardio/mult/fbbva_libroCorazon_cap61.pdf
- Muñoz, C.A., Jaimes, K.A., Reyes, C.U., & Suárez, M.J. (2024). Obtención de Tinturas Madres a partir de Plantas Medicinales de uso común en el Estado de Campeche. En: López F, editor. *Investigación en Ciencias de la Salud, revisión interdisciplinaria* (Tomo II). México: Científico- Técnica Ocronos. <https://doi.org/10.58842/NEYF7432>
- Murillo, E.P., Correa, J.L.C., Cerquera, C.C.O., & Méndez, J.J.A. (2018). Potencial antimicrobiano y citotóxico del aceite esencial de *Citrus aurantium* Engl (naranja agria) y de *Swingleaglutinosa* Merr (limón de cerco). *Revista Cubana De Plantas Medicinales*, 23(3). Recuperado a partir de <https://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/795>
- Ochoa, A., López, T., & Colombat, M. (2002). *Farmacognosia y Química de los productos naturales*. Santiago de Cuba: Editorial UO. ISBN959-207-012-1. 12-30
- Ojito Ramos, K., Herrera Sánchez, Y., Vega Pérez, N., & Portal Villafañá, O. (2012). Actividad Antioxidante *in vitro* y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* pp. (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(4), 368-379. <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v17n4/pla08412.pdf>
- Ordoñez-Gómez, E.S., Reátegui-Díaz, D., & Villanueva-Tiburcio, J.E. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cascara y hojas de doce cítricos. Facultad de ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 113-121. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.13>
- Palomino, L.R., García, C.M., Rojano, B.A., & Diego, L. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3), 388-95.
- PanReacAppliChem ITW Reagents (n/f). *Etanol 70 % para análisis*. Disponible en: <https://itwreagents.com/iberia/es/product/etanol-70-para-analisis/A2192>
- Pokrovsky, A. V., Saveljev, V. S., Kirienko, A. I., Bogachev, V. Y., Zolotukhin, I. A., Sapelkin, S. V., ... & Tolstikhin, V. Y. (2007). Surgical correction of varicose vein disease under micronized diosmin protection (results of the Russian multicenter controlled trial DEFANS). *Angiology and Vascular Surgery*, 13(2), 47-55. <https://europepmc.org/article/med/18004259>
- Rodríguez, J. R. E., Quesada, F. F., & Montoya, S. B. (2014). Prevalencia y características clínicas de la enfermedad venosa crónica en pacientes atendidos en Atención primaria en España: resultados del estudio internacional Vein Consult Program. *Cirugía Española*, 92(8), 539-546. <https://doi.org/10.1016/j.cireng.2013.09.028>
- Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Therious, K., & Therios, I. (2013). Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flower and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules*, 18(9), 10639-10647. <https://doi.org/10.3390/molecules180910639>





- Seuc, A., Domínguez, E., Gallardo, U., López, L., García, R., López, L., & González, O. (2004). Mortalidad y Años de Vida Perdidos por Mortalidad prematura en mujeres cubanas: 1990, 1995 y 2000. *Revista Cubana Salud Pública*, 30(4). http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662004000400002
- Suntar, I., Khan, H., Patel, S., Celano, R., & Rastrelli, L. (2018). An Overview on *Citrus aurantium* L: Its functions as food ingredient and therapeutic agent. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018(1), 7864269. <https://doi.org/10.1155/2018/7864269>
- Vanz, B.C., Minatel, O.I., Gómez-Gómez, H.A., & Pereira, L.G.P. (2017). Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. In: Ghorbanpour, M., Varma, A. (eds) *Medicinal plants environmental challenges*. Springer, Cham. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9>
- Varona, M., Martin, A., Sanchez, J., Tamargo, J., Cancio, M., Sanchez, S., ... & Coll-Vinent, B. (2023). Sex-related differences in benefits of anticoagulation therapy in elderly patients with atrial fibrillation: a subanalysis of the EMERG-AF study. *Emergencias*, 35, 252-260. DOI: <https://doi.org/10.55633/s3me/E040.2023>
- Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal Aromatic Plants.*, 2(4), 105-13. <http://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>
- Villarreal_Ibarra, E., Cadenas-González, M., Méndez- Morales, F., Bolio-López, G., Hernández-Villegas, M., Rivera-Torres, N., Almenares-López, D., & Rivas Morales, C. (2024). Validación del potencial antioxidante de *Citrus aurantium* en Tabasco, México. *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*, 35(1), 248–59. <https://doi.org/10.33975/riuq.vol35n1.1157>
- Wang, G.H., Huang, C.T., Huang, H.J., Tang, C.H., & Chung, Y.C. (2023). Biological Activities of *Citrus aurantium* Leaf Extract by Optimized Ultrasound-Assisted Extraction. *Molecules*, 28, 7251. <https://doi.org/10.3390/molecules28217251>

