

DOI: <https://doi.org/10.46502/issn.2710-995X/2021.6.06>

Igarza Vázquez, G., Licea Jiménez, I., San Román, R., & Ochoa Pacheco, A. (2021). Reformulación y estabilidad de la tintura del fruto de Citrus limon (L.) Osbeck al 20%. *Orange Journal*, 3(6), 58-69. <https://doi.org/10.46502/issn.2710-995X/2021.6.06>

## Reformulación y estabilidad de la tintura del fruto de Citrus limon (L.) Osbeck al 20%

### Reformulation and stability of the fruit tincture of Citrus limon (L.) Osbeck at 20%

Recibido: 14 de octubre de 2021

Aceptado: 18 de diciembre de 2021

Escrito por:

**Georgina Igarza Vázquez**<sup>21</sup>

<https://orcid.org/0000-0002-9965-4367>

**Irina Licea Jiménez**<sup>22</sup>

<https://orcid.org/0000-0002-4178-0977>

**Reynier San Román**<sup>23</sup>

<https://orcid.org/0000-0003-0033-1080>

**Ania Ochoa Pacheco**<sup>24</sup>

<https://orcid.org/0000-0002-1028-6626>

#### Resumen

El Citrus limon (L.) Osbeck o limón como comúnmente se le conoce, resulta un valioso recurso medicinal, cuya actividad farmacológica principal está asociada a la actividad flebotónica o de disminución de la fragilidad capilar, siendo sustitutiva de fármacos importados y de gran déficit en la red de farmacias cubanas. Sus formulaciones oficiales emplean la corteza de la cáscara del fruto seco, materia prima de difícil obtención. Por ello en el presente trabajo se realiza un estudio de reformulación en la que se preparan por el método de maceración durante 3 días un total de seis tinturas de Citrus limon (L.) al 20%, empleando como materia prima el fruto entero fresco con y sin zumo; así como la corteza seca anteriormente descrita y un disolvente en concentraciones diferentes: Etanol al 50 y 70 %. Las tinturas son caracterizadas en sus propiedades físicas, físico-químicas y químicos cualitativos y además se les determina su estabilidad por 30 días a través de estos propios parámetros: pH, índice de refracción, densidad y sólidos totales (NRSP 312). Los resultados revelan que ninguna de las variantes que emplearon el fruto entero fresco de Citrus limon (L.) Osbeck como materia prima resulta equivalente a la calidad obtenida para las tinturas preparadas a partir de la corteza seca del fruto con valores de pH mucho más ácidos y la mitad del contenido de sólidos totales. El estudio de estabilidad demuestra que las seis tinturas preparadas resultan estables por un período de 30 días en las condiciones de estudio consideradas.

**Palabras claves:** Citrus limon, estabilidad, flavonoides, reformulación, tinturas.

#### Abstract

The Citrus limon (L.) Osbeck or lemon as is commonly known is a valuable medicinal plant, whose main activity is associated to the flebotonic action or capillary fragility protection, being an alternative of imported conventional drugs that have a great deficit in the Cuban pharmacies network. Their official formulations use the dry bark as raw material, which is difficult to obtain. In the present work, a pre-formulation study allows the preparation by 3-day maceration methods a total of six tinctures at 20 % using

<sup>21</sup> Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Director técnico-comercial. Empresa Provincial de Farmacias y Ópticas. Santiago de Cuba. Cuba.

<sup>22</sup> Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Especialista de calidad. Empresa Provincial de Farmacias y Ópticas. Santiago de Cuba.

<sup>23</sup> Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Especialista B en servicios farmacéuticos y plantas medicinales. Empresa Provincial de Farmacias y Ópticas. Santiago de Cuba. Cuba.

<sup>24</sup> Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Profesora Titular. Departamento de Farmacia. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. Cuba.

like raw material the entire fresh fruit with and without juice as well as the dry bark previously mentioned and two dissolvents: ethanol 50 and 70%. Tinctures were characterized in their physic, physic-chemical and qualitative chemist point of view properties, determining their stability for 30 days through these selves' parameters measured to the formulations: pH, refractive index, density and total soluble substances. Results reveal that no one of the variants that used the entire fruit of *Citrus limon* (L.) Osbeck as raw material proves to be equivalent to the quality obtained for the tinctures prepared from the dry bark, exerting much more acidic values of pH and a half of the content of total soluble substances. The study of stability confirms that the six prepared tinctures prove to be stable for a 30-day period in the conditions of study considered.

**Keys words:** *Citrus limon*, stability, flavonoids, reformulation, tinctures.

### Introducción

El *Citrus limon* (L.) Osbeck (Beurton, 2008), *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (*sinonimia*) (Ministerio de Salud Pública MINSAP, 2017) como es conocido tradicionalmente como limón resulta en un valioso recurso medicinal. Esta planta no sólo es apreciada por el valor nutritivo de sus frutos, sino también por las propiedades medicinales que se le atribuyen, empleándose como protectora de los vasos capilares, antiespasmódica, carminativo, antiinflamatoria, antipirética, diurética, antiescorbútica y antídoto (Morón y Levy, 2002; González-Molina, Domínguez-Perles, Moreno, y García-Viguera, 2010). Para la especie se han estudiado una amplia variedad de actividades farmacológicas, por la diversidad de sus metabolitos y el amplio uso popular para disímiles afecciones.

Un estudio realizado por García et al., (2002) reveló una respuesta antiinflamatoria importante para el zumo fresco del limón, a través del modelo de edema inducido por aceite de *Croton* utilizando la vía tópica. Se obtuvo un 54,83 % de inhibición para la especie, clasificada como respuesta antiinflamatoria moderada.

También se sugiere que las hojas, frutos y jugo de limón son útiles para terapia flebotónica y antitrombótica. Además, resulta fuente importante de vitamina C, potasio y cantidades menores de otras vitaminas y minerales. La vitamina C está implicada en la producción del colágeno, tiene la propiedad de mejorar la cicatrización y la función del sistema inmunitario. Su capacidad antioxidante ayuda a neutralizar sustancias cancerígenas como las nitrosaminas y otras especies reactivas de oxígeno. Diversos estudios han mostrado que las personas con altas ingestas de vitamina C tienen un menor riesgo de desarrollar otras enfermedades crónicas como enfermedad cardiovascular, cataratas o enfermedades neurodegenerativas (García et al., 2002; MINSAP, 2017).

En la provincia Santiago de Cuba existen grandes limitaciones con el suministro de esta materia prima, no se dispone de la tecnología requerida para ofrecer la materia prima conforme lo describe el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos de Cuba (MINSAP, 2017): corteza seca del fruto. Por ello resultan necesarios estudios farmacéuticos de reformulación que permitan la obtención de estos preparados medicinales empleando el fruto del limón en condiciones diferentes a lo exigido por el Formulario Nacional (MINSAP, 2017) Con esta investigación, se propone reformular y evaluar preliminarmente la estabilidad física, físico-química y química cualitativa de la tintura al 20 % del fruto de *Citrus limon* (L.) Osbeck (limón), en etanol al 50 % y al 70 %, hasta 30 días de elaborada.

### Marco Teórico

El origen del género *Citrus* se sitúa en el sureste de Asia y el centro de China, Filipinas y el archipiélago Indo malayo hasta Nueva Guinea. Las primeras variedades e híbridas de cítricos fueron el resultado de un largo proceso de identificación, recolecta y reproducción de plantas silvestres.

Esta especie tan distribuida por el mundo ha sido clasificada por diferentes especialistas. Puede encontrarse bajo los nombres de: *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle, *Citrus limon* (L.) Blanco, *Citrus medica* L. variedad limon (Acevedo-Rodríguez y Strong, 2012) entre otros. Según la última revisión de la familia Rutáceas en Cuba, todas estas denominaciones corresponden a lo que actualmente se reconoce como *Citrus limon* (L.) Osbeck, constituyendo por tanto todos estos nombres científicos como lo que se conoce como sinónimos de la misma planta o especie.

La maceración es un método de extracción discontinuo en el cual el material vegetal es puesto en contacto directo con el disolvente de extracción en un recipiente cerrado, a temperatura ambiente durante un tiempo entre 2-14 días. El mismo puede ser auxiliado o no por agitación constante del recipiente, evitando así el aumento de la viscosidad por un ascenso de la concentración de la capa límite entre la célula vegetal y el disolvente y aumentando la velocidad de transporte de este. Tiene como ventaja que es un método de elección para aquellos metabolitos que pueden sufrir alteración con el calor y que puede emplearse en volúmenes grandes de material vegetal y como desventaja que la posible ocurrencia de saturación del disolvente impedirá la extracción total de los metabolitos secundarios.

La percolación consiste en privar una droga de sus principios activos solubles haciendo descender un menstroo a través de la misma, una vez que ha sido colocada en un recipiente especial llamado percolador, de acuerdo al procedimiento descrito en la Norma Ramal de Salud Pública de Cuba 311 (NRSP 311) (MINSAP, 1991).

En este, a diferencia de la maceración primaria el recipiente es un sistema abierto, que tiene un lugar B para cargar y otro para descargar. Con la percolación se logra un agotamiento total de la droga. La disolución que se obtiene se le denomina percolado y la droga agotada se le denomina barra.

La estabilidad se define como la extensión o el tiempo durante el cual un producto mantiene dentro de unos límites específicos y a través del período de almacenamiento y uso (vida útil) las mismas propiedades y características que poseía en el momento de su fabricación.

Según los parámetros de estabilidad que se tengan en cuenta, esta será clasificada de la siguiente manera (Wells, 1988):

1. Estabilidad Física. Se estudia si ha ocurrido algún cambio en las propiedades físicas, por ejemplo, color, olor, uniformidad, redispersibilidad, transparencia, solubilidad, etc. Este análisis generalmente acompaña al análisis químico. Algunos signos físicos de deterioro en formas farmacéuticas líquidas son: turbidez o precipitación de la solución, rotura de emulsión, pérdida de la suspendibilidad por endurecimiento, cambios organolépticos, formación de gas, crecimiento microbiano, entre otros.
2. Estabilidad Química. Es la más estudiada y se basa en la determinación a través del tiempo de la conservación de la integridad química del medicamento, así como su potencia establecida en la etiqueta durante el tiempo de vencimiento señalado, empleando para ello métodos de análisis químico-físicos específicos. Puede contemplar el aislamiento, purificación y determinación de productos de degradación.

Las pérdidas del principio activo son normalmente consecuencia de un cambio químico siendo las reacciones más comunes: la hidrólisis, la oxidación-reducción y la fotólisis. Los cambios químicos pueden también darse por interacción entre los ingredientes del producto y ocasionalmente entre el producto y el envase.

## Metodología

### Características generales de la investigación

Se realizó un estudio de reformulación de la tintura al 20 % de *Citrus limon* (L.) Osbeck. Adicionalmente, se le realizaron estudios de estabilidad formal a las tinturas elaboradas por un período de 30 días. Los mismos se efectuaron en los laboratorios experimentales pertenecientes a las carreras de Ciencias Farmacéuticas y Química (Facultad de Ciencias Naturales y Exactas Universidad de Oriente). Este estudio se realizó entre los meses de febrero a junio del 2016.

### Recolección y procesamiento del material vegetal

El fruto de *Citrus limon* (L.) Osbeck, fue adquirido en el municipio de Contramaestre, suministrado por la Empresa Comercializadora de Productos Agropecuarios, extraídos de la finca EL ALCAZAR, Guaninao,

municipio de Contramaestre de la provincia de Santiago de Cuba. Una muestra de la planta fue identificada taxonómicamente en el Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO).

El fruto del limón se utilizó bajo tres condiciones diferentes:

- Cáscara seca (**CS**): secada a la sombra en la farmacia principal municipal del municipio Santiago de Cuba.
- Fruto entero (**FE**): fragmentado en pequeñas porciones manualmente empleando para ello un cuchillo comercial.
- Fruto entero sin el zumo (**SZ**): extraído por expresión manual y fragmentada en porciones pequeñas manualmente empleando para ello un cuchillo comercial.

#### **Reformulación de la tintura al 20 % de *Citrus limon* (L.) Osbeck**

El Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos (MINSAP, 2017) contiene la fórmula de la preparación del extracto fluido a partir de la corteza de la cáscara del fruto secado a la sombra. Dicho extracto fluido es preparado por el método de repercolación con etanol al 80 % según NRSP 311/91. No está definido en este documento (MINSAP, 2017) la obtención de la tintura a partir del extracto fluido ni por otro método de extracción. El grupo de investigación de la Empresa de Farmacias y Ópticas (OPTIMED Santiago de Cuba) decidió formular todas las tinturas a evaluar por preparación directa (tintura al 20%) empleando el método de maceración siguiendo las indicaciones de la NRSP 311 (MINSAP, 1991).

Se prepararon un total de 6 tinturas al 20 % resultado de la combinación de tres materias primas diferentes (CS, FE y SZ) y un disolvente a diferentes concentraciones (Etanol 50 y 70 %) correspondiente a un diseño experimental 3x1.

La selección de las materias primas fruto fresco entero (FE) y fruto fresco entero sin zumo (SZ) fueron escogidas por resultar las formas de mayor facilidad y factibilidad de ser procesadas una vez que el Ministerio de la Agricultura suministre la materia prima (fruto fresco entero). La selección del etanol al 50 y al 70 % como disolventes obedece a que estos poseen elevados valores de grado etanólicos que favorecen la extracción de los flavonoides, metabolitos asociados a la actividad flebotónica.

#### **Control de la calidad físico, físico-químico de las tinturas**

El control de la calidad a las tinturas se les realizó según procedimiento descrito en la NRSP 312 (MINSAP, 1991). Los parámetros determinados fueron: Características organolépticas, pH, sólidos totales, índice de refracción y densidad relativa. Adicionalmente se le realizó un tamizaje fitoquímico acorde al protocolo establecido (Ochoa, López y Colombat, 2002).

#### **Determinación de los requisitos organolépticos**

*Determinación del olor:* Este procedimiento se basó en tomar una tira de papel secante e introducir un extremo en la muestra de ensayo. Posteriormente se determinó el olor y la correspondencia de la característica del producto.

*Determinación del color:* Este procedimiento se basó en la toma de un tubo para ensayos bien limpio y seco, se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observó el color y la transparencia. Se informó el resultado.

#### **Determinación de pH**

Se determinó según se establece en NRSP 312 (MINSAP, 1991) y la NC 90-13-13 (MINSAP, 2008). Con el peachímetro Microprocessor pH Meter HANNA pH 213 de procedencia española. El ensayo fue realizado por triplicado para cada uno de los tres lotes preparados de cada una de las seis formulaciones. Se informó el valor medio de las determinaciones, así como la desviación estándar obtenida.

### **Determinación del Índice de refracción**

La determinación del índice de refracción se basó en el procedimiento descrito en la NRSP 312 (MINSAP, 1991). Se utilizó un refractómetro ABBE de procedencia alemana. El ensayo fue realizado por triplicado para cada uno de los tres lotes preparados de cada una de las seis formulaciones. Se informó el valor medio de las determinaciones, así como la desviación estándar obtenida.

### **Determinación de la densidad relativa**

Se determinó acorde al procedimiento descrito por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2011) en su resolución relativa al control de la calidad de Plantas Medicinales.

El ensayo fue realizado por duplicado para cada uno de los tres lotes preparados de cada una de las seis formulaciones. Se informó el valor medio de las determinaciones, así como la desviación estándar obtenida. Expresión de los resultados.

La densidad relativa se calculó mediante la siguiente ecuación y se expresa en g/mL:

$$D = (m_1 - m) / (m_2 - m)$$

Donde:

m- masa del picnómetro vacío (g).

m<sub>1</sub> - masa del picnómetro con la muestra de ensayo (g).

m<sub>2</sub> - masa del picnómetro con agua (g).

### **Determinación de sólidos totales**

Se realizó acorde al procedimiento descrito por las normas sugeridas por la Organización Mundial de la Salud para el control de la calidad de Plantas Medicinales (WHO, 2011).

El ensayo fue realizado por duplicado para cada uno de los tres lotes preparados de cada una de las seis formulaciones. Se informó el valor medio de las determinaciones, así como la desviación estándar obtenida. Los sólidos totales (St) se calcularán mediante la fórmula siguiente y se expresaron en porcentaje:

$$St = (Pr-P)/V \times 100$$

Donde:

Pr..... masa de la cápsula más el residuo (g)

P..... Masa de la cápsula vacía (g)

V..... Volumen de la porción de ensayo (mL)

100..... factor matemático

### **Determinación de la composición química cualitativa de las tinturas**

A cada una de las seis tinturas preparadas se les realizó la evaluación de su composición química cualitativa. Para ello se emplearon reacciones específicas para los diversos tipos de metabolitos secundarios más importantes de las especies vegetales (Ochoa, López y Colombat, 2002).

### **Evaluación de la estabilidad física y físico-química de las tinturas**

Las seis tinturas formuladas (tres lotes de cada una) fueron evaluadas en su estabilidad por un período de 30 días. Para ello se realizaron mediciones en cuatro momentos: al momento de su extracción del percolador o tiempo cero, a la semana de preparado (7 días), a las dos semanas (15 días) y a los 30 días.

Los parámetros evaluados para determinar la estabilidad de las tinturas fueron los mismos que se emplearon en la caracterización de las mismas según NRSP 312 (MINSAP, 1991). Se consideró que las tinturas formuladas eran estables cuando no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables monitoreadas con respecto al tiempo cero. Para cada una de las tinturas formuladas se prepararon un total de 3 lotes, los cuales fueron preparados a intervalos de 7 días.

### Procesamiento estadístico de la Información

Con el software Statgraphics se llevó a cabo el análisis estadístico. En el caso de la estabilidad en el tiempo (cuatro grupos de datos) y para la comparación entre las tinturas de similar grado alcohólico pero diferente sustrato o materia prima (tres grupos de datos) 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). Para la comparación de las tinturas formuladas a partir de unas mismas materias primas y diferentes concentraciones (dos grupos de datos) se empleó una prueba de hipótesis para comparación de medias empleando el estadígrafo t de student, definiendo como Hipótesis nula la igualdad de medias y como alternativa la desigualdad de las mismas. En todos los casos se trabaja con un nivel de significación del 95%.

### Resultados

#### Determinación de parámetros de control de la calidad físico, físico-químico y químico- cualitativo de las tinturas

Los parámetros organolépticos para la corteza seca a las concentraciones de etanol 50 y 70 %, reveló ser un líquido oscuro de color marrón y olor característico; para el fruto entero sin zumo y el fruto enterose observó un líquido transparente de color amarillo verdoso para la concentración al 50 % y verde amarillo para la concentración al 70 % ambas con olor característico.

**Tabla 1.**

*Parámetros de calidad de las tinturas al 20 % de Citrus limon (L.) Osbeck*

Formulación	pH (U)	IR	D (g/mL)	ST (%)
<b>Cortezaseca</b>				
CS 50 %	5,13±0,065 <sup>a,II</sup>	1,3623±0,0005 <sup>a,II</sup>	0,955±0,002 <sup>b,II</sup>	1,69±0,16 <sup>a,II</sup>
CS 70 %	5,35±0,046 <sup>b,III</sup>	1,3629±0,0003 <sup>b,II</sup>	0,904±0,003 <sup>a,I</sup>	1,70±0,20 <sup>a,II</sup>
<b>Fruto entero sin zumo</b>				
SZ 50 %	3,62±0,105 <sup>a,I</sup>	1,3542±0,0001 <sup>a,I</sup>	0,948±0,003 <sup>b,I</sup>	0,84±0,13 <sup>a,I</sup>
SZ 70 %	3,90±0,01 <sup>b,II</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a,I</sup>	0,913±0,032 <sup>a,I</sup>	0,82±0,18 <sup>a,I</sup>
<b>Fruto entero</b>				
FE 50 %	3,53±0,13 <sup>a,I</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a,I</sup>	0,949±0,001 <sup>b,I</sup>	0,83±0,34 <sup>a,I</sup>
FE 70 %	3,70±0,24 <sup>b,I</sup>	1,3542±0,0001 <sup>a,I</sup>	0,924±0,018 <sup>a,I</sup>	0,81±0,32 <sup>a,I</sup>

**Leyenda:** ST: sólidos totales; IR: índice de refracción; D: densidad relativa.

*Letras diferentes significan diferencias estadísticas entre formulaciones de una misma materia prima por t student para  $\alpha=0,05$ .*

*Números diferentes significan diferencias estadísticas entre formulaciones de un mismo disolvente por el test HSD de Tukey para  $\alpha=0,05$ .*

**Tabla 2.**  
Resultados del tamizaje fitoquímico a las tinturas.

Metabolitos	Ensayos	Evidencias					
		CS 50%	CS 70%	FE 50%	FE 70%	SZ 50%	SZ 70%
Alcaloides	Dragendorff	+++	+++	++	++	++	++
	Mayer	+	+	+	+	+	+
	Wagner	++	++	+	+	+	+
Triterpenos y esteroides	Solkowski	+	+	+	+	+	+
	Lieberman-Burchard	+	+	-	-	-	-
	Rosemheim	-	-	-	-	-	-
Quinonas	Borntrager	-	-	-	-	-	-
	Variante con benceno	+	+	+	+	+	+
Cumarinas	Baliet	++	++	++	++	++	++
Saponinas	Espuma	-	-	-	-	-	-
Resinas	Resinas	-	-	-	-	-	-
Mucílagos	Mucílagos	-	-	-	-	-	-
Azúcares reductores	Fehling	+	+	+	+	+	+
	Benedict	+	+	+	+	+	+
Fenoles y taninos	Cloruro férrico	+++	+++	+	+++	+	+
Aminoácidos y aminas en general	Ninhidrina.	+	+	-	-	-	-
Glicósidos cardíacos	Kedde	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	Ácido sulfúrico	++	++	+	+	+	+
	Shinoda	+	+	+	+	+	+
	Álcalis	+	+	+	+	+	+
	Rosemheim	+	+	+	+	+	+

CS: cáscara seca; SZ: fruto entero sin zumo; FE: fruto entero, + positivo leve, ++ positivo evidente, +++ positivo intenso, - negativo

**Tabla 3.**  
Resultados del estudio de estabilidad (pH e índice de refracción)

Tinturas	pH(U)				Índice de refracción			
	t=0	t=7	t=15	t=30	t=0	t=7	t=15	t=30
CS 50%	5,13±0,07 <sup>a</sup>	5,11±0,05 <sup>a</sup>	5,10±0,07 <sup>a</sup>	5,06±0,07 <sup>a</sup>	1,3623±0,0005 <sup>a</sup>	1,3627±0,0004 <sup>a</sup>	1,3628±0,0005 <sup>a</sup>	1,3641±0,0001 <sup>a</sup>
CS 70%	5,35±0,05 <sup>a</sup>	5,33±0,05 <sup>a</sup>	5,31±0,05 <sup>a</sup>	5,30±0,07 <sup>a</sup>	1,3629±0,0003 <sup>a</sup>	1,3640±0,0003 <sup>a</sup>	1,3641±0,0003 <sup>a</sup>	1,3628±0,0010 <sup>a</sup>
FE 50%	3,53±0,13 <sup>a</sup>	3,46±0,18 <sup>a</sup>	3,54±0,14 <sup>a</sup>	3,42±0,12 <sup>a</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a</sup>	1,3542±0,0001 <sup>a</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a</sup>
FE 70%	3,70±0,24 <sup>a</sup>	3,72±0,14 <sup>a</sup>	3,75±0,12 <sup>a</sup>	3,63±0,05 <sup>a</sup>	1,3542±0,0001 <sup>a</sup>	1,3542±0,0001 <sup>a</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a</sup>	1,3541±0,0002 <sup>a</sup>
SZ 50%	3,62±0,10 <sup>a</sup>	3,54±0,17 <sup>a</sup>	3,59±0,09 <sup>a</sup>	3,57±0,08 <sup>a</sup>	1,3542±0,0001 <sup>a</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a</sup>	1,3541±0,0002 <sup>a</sup>
SZ 70%	3,90±0,01 <sup>a</sup>	3,82±0,06 <sup>a</sup>	3,84±0,05 <sup>a</sup>	3,85±0,06 <sup>a</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a</sup>	1,3541±0,0001 <sup>a</sup>

**Leyenda:** CS: cáscara seca; SZ: fruto entero sin zumo; FE: fruto entero. Letras iguales significan no diferencias significativas en el tiempo según el test de HSD de Tukey aplicado para un  $\alpha=0,05$

**Tabla 4.**  
*Resultados del estudio de estabilidad (Densidad y sólidos totales)*

Tinturas	Densidad (g/mL)				Sólidos Totales (%)				
	Tiempo	t=0	t=7	t=15	t=30	t=0	t=7	t=15	t=30
CS 50%		0,956±0,002 <sup>a</sup>	0,955±0,002 <sup>a</sup>	0,955±0,001 <sup>a</sup>	0,955±0,002 <sup>a</sup>	1,69±0,16 <sup>a</sup>	1,60±0,23 <sup>a</sup>	1,57±0,17 <sup>a</sup>	1,57±0,18 <sup>a</sup>
CS 70%		0,905±0,003 <sup>a</sup>	0,904±0,003 <sup>a</sup>	0,904±0,004 <sup>a</sup>	0,902±0,002 <sup>a</sup>	1,70±0,20 <sup>a</sup>	1,71±0,23 <sup>a</sup>	1,69±0,16 <sup>a</sup>	1,68±0,22 <sup>a</sup>
FE 50%		0,924±0,019 <sup>a</sup>	0,912±0,148 <sup>a</sup>	0,912±0,001 <sup>a</sup>	0,818±0,001 <sup>a</sup>	0,94±0,34 <sup>a</sup>	0,92±0,27 <sup>a</sup>	0,89±0,29 <sup>a</sup>	0,83±0,29 <sup>a</sup>
FE 70%		0,916±0,032 <sup>a</sup>	0,915±0,031 <sup>a</sup>	0,913±0,005 <sup>a</sup>	0,913±0,005 <sup>a</sup>	0,85±0,32 <sup>a</sup>	0,84±0,32 <sup>a</sup>	0,81±0,27 <sup>a</sup>	0,79±0,32 <sup>a</sup>
SZ 50%		0,950±0,003 <sup>a</sup>	0,950±0,002 <sup>a</sup>	0,948±0,004 <sup>a</sup>	0,948±0,003 <sup>a</sup>	0,84±0,13 <sup>a</sup>	0,84±0,11 <sup>a</sup>	0,83±0,10 <sup>a</sup>	0,82±0,11 <sup>a</sup>
SZ 70%		0,948±0,003 <sup>a</sup>	0,915±0,032 <sup>a</sup>	0,913±0,031 <sup>a</sup>	0,912±0,005 <sup>a</sup>	0,88±0,18 <sup>a</sup>	0,87±0,15 <sup>a</sup>	0,84±0,16 <sup>a</sup>	0,82±0,17 <sup>a</sup>

**Legenda:** CS: cáscara seca; SZ: fruto entero sin zumo; FE: fruto entero.

Letras iguales significan no diferencias significativas en el tiempo según el test de HSD de Tukey aplicado para un  $\alpha=0,05$ .

## Discusión

Referente al parámetro olor, todas las tinturas presentaron el olor característico a la fruta, sin que fuese posible diferenciarlos entre ellos. Se observa en el caso de las tinturas elaboradas con el fruto fresco (SZ y FE) que no se evidencian diferencias en el color cuando se trata de una misma concentración alcohólica, mientras que cuando se cambia la concentración alcohólica del 50% al 70% las tinturas preparadas tienden a tener una coloración más verdosa que amarilla, producida probablemente por la extracción de clorofilas y otros pigmentos verdes presentes en la corteza del fruto fresco del limón.

Cuando se consideran las diferentes concentraciones, resulta una tendencia general que las formulaciones a base de etanol al 70 % logran valores de pH superiores y valores de densidad inferiores. El mayor valor de pH puede estar condicionado al hecho de que como se ha descrito en la bibliografía (Asghar, Maryam, Mahmood, Hamid, 2011; Do-Hoon et al, 2012), la presencia de ácidos orgánicos en el fruto del limón resulta común, y esas sustancias se disuelven más fácilmente en disolventes acuosos, al ser estos más básicos que las disoluciones alcohólicas. Por su parte, la menor densidad de ellos está asociado a la naturaleza del disolvente mismo, pues es conocido que la densidad del agua es mayor que la del etanol (1,00 vs 0,79 g/mL a 25 °C) y resulta evidente que en el disolvente a la concentración de etanol 50 % la proporción de agua con respecto al etanol 70 % resulta mayor. La densidad además está condicionada a la masa del producto y los resultados de sólidos totales no ofrecen diferencias significativas entre las sustancias extraídas por un disolvente u otro.

Por ello y considerando solamente estos parámetros estudiados, el disolvente etanol al 70 % parece ser el de mejores opciones para emplear en la reformulación de tinturas a base del fruto del limón independientemente de las condiciones en que se encuentre el mismo.

Referente a la materia prima, en la propia tabla 1 se puede observar que cuando se consideran las formulaciones preparadas a base de etanol 50 %, para todos los parámetros establecidos la tintura de la cáscara seca presenta mayores valores que las de las otras dos condiciones de la materia prima. Para el pH se observa una diferencia que llega casi a 1,5 unidades de pH superior para el caso de la formulación a base de la cáscara seca. Está marcada diferencia define que la misma resulta mucho menos ácida que las otras dos, las cuales son estadísticamente iguales bajo las condiciones experimentales empleadas. Esta elevada acidez de las formulaciones a base de FE y SZ podría estar relacionada a la presencia de los ácidos orgánicos anteriormente mencionados, los cuales son muy abundantes en el endocarpio del fruto del limón, el cual ha sido retirado en la materia prima CS previo a su secado. En el caso de los sólidos totales, las diferencias entre las tinturas formuladas a base de corteza seca logran extraer más del doble que las formuladas a partir del fruto entero y del fruto entero sin el zumo. Estas diferencias están precisamente en el orden en que los tejidos vegetales son contenedores de agua en su estado fresco. Es importante recordar que las formulaciones a base del fruto entero y del fruto entero sin el zumo no han sufrido proceso de secado y por ello más del 50 % de su peso estará asociado a la presencia de agua en sus células, un agua que fue

retirada de la materia prima corteza seca. Además, resulta internacionalmente reconocido el hecho de que la extracción de sustancias solubles es mayor en plantas secas que en su forma fresca (Ruiz et. al, 2016).

El índice de refracción superior para el caso de la formulación a base de corteza seca debe estar relacionado con los mayores índices de sólidos totales obtenidos para esta formulación. Algo similar ocurre cuando se considera la densidad, es una función matemática que está directamente relacionada con la masa de una sustancia y esta masa está representada para los estudios realizados por la cantidad de sólidos totales extraídos en la tintura.

Respecto al parámetro densidad, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las tinturas preparadas a partir de diferentes materias primas siendo sorprendente este resultado, por el hecho de que si los valores de sólidos totales son estadísticamente diferentes, también lo debería ser la densidad relativa. Se considera que estas observaciones estadísticas podrían estar condicionadas a la alta variabilidad (desviación estándar) de los datos experimentales obtenidos para esta variable. En la tabla 1 se nota que los valores de la desviación estándar de las determinaciones de densidad de las tinturas SZ 70 % y FE 70 % son muy superiores a las obtenidas para las cuatro tinturas restantes.

Los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a las tinturas elaboradas se recogen en la tabla 2. En la misma se constata que los alcaloides, los triterpenos y esteroides, las quinonas, las cumarinas, azúcares reductores, los fenoles y taninos y los flavonoides resultan ser los metabolitos determinados en las tinturas formuladas independientemente de las características de la materia prima y del mensturo a partir de los cuales fue preparado; no obstante, sí se observan diferencias en cuanto a las intensidades de las reacciones empleadas. En el caso de los alcaloides se puede observar que para las tinturas de fruto entero la evidencia resulta más débil que en aquellas tinturas preparadas a partir de la corteza seca al igual que en los triterpenos y esteroides, pues para la reacción con Lieberman-Burchard solamente se obtienen resultados positivos para las tinturas de la corteza seca y no para el resto. Los reportes bibliográficos referentes a la presencia de alcaloides en el limón resultan ambiguos. Mientras que Álvarez y colaboradores en el 2005 refieren la presencia de los mismos en la corteza de la fruta, Kumar y colaboradores en 2014, plantean la no existencia de este tipo de metabolitos cuando investigaron la corteza del fruto de esta planta. De cualquier forma, en nuestro estudio empleamos tres reactivos generales para alcaloides y en los tres las evidencias resultaron positivas, por lo que en este sentido nuestros resultados coinciden con los de Álvarez y colaboradores (Alvares, Arias y Laca, 2005).

La presencia de triterpenos y esteroides fue corroborada por el ensayo de Solkowski en todas las tinturas, mientras que solo en las tinturas de cáscara seca se pudo observar su presencia por el ensayo de Lieberman-Burchard, aunque solo se detecta un pequeño cambio de coloración que ocurre rápidamente. Resulta ampliamente conocida la presencia de compuestos aromáticos en la corteza de todos los cítricos y en especial en la del limón. Estos compuestos aromáticos son de naturaleza terpénica, pero del tipo mono y sesquiterpeno, los cuales no reaccionan con los reactivos de Solkowski ni el de Lieberman-Burchard. Atendiendo que los triterpenos y esteroides son sustancias lipófilas y los disolventes empleados para la preparación de las tinturas no lo son, unido al hecho de que en la bibliografía consultada no fue posible hallar reportes de este tipo de sustancia en el limón; resulta posible que las evidencias positivas encontradas se deban a otro tipo de sustancia que haya reaccionado creando lo que se conoce como falsos positivos.

Las quinonas son otros de los metabolitos que resultó positivo a los ensayos realizados en la presente investigación, al colorearse de rápidamente de amarillo cuando se aplicó la variante con benceno, señalando la posible presencia de 1-4-naftoquinonas benceno. En la bibliografía consultada, no fue posible hallar ningún reporte de la presencia de este metabolito en el limón, sin embargo, en otras especies del género sí han sido reportados como es el caso del estudio realizado por Correa y colaboradores en el 2016 (Correa, Quiñones y Echeverría, 2016).

El ensayo de las cumarinas es otro de los metabolitos que resultó positivo a los ensayos de Baljet, reconociendo la presencia de compuestos con agrupamientos lactónicos.

El ensayo se consideró positivo ya que se observó un cambio de coloración evidente y rápida una vez que se hizo reaccionar el reactivo con las tinturas. Este tipo de sustancia ha sido extensamente reportada para

la corteza del limón, tal y como se evidencia en los trabajos publicados por Zobel y colaboradores en 1991 en donde identificaron ocho cumarinas (escopoletina, escoparona, ostol, imperatonina, feloterina, angelicina, pimpenellina y seselina) (Zobel, Wang, March & Brown, 1991). Mikayi y colaboradores en 1999 con tres cumarinas aisladas (8-geranilopsolareno, bergamotina y la 5-geraniloxi-7-metoxicumarina) (Miyake, Murakami, Sugiyama, Isobe, Koshimizu & Ohigashi, 1999); mientras que Ledesma-Escobar y colaboradores en el 2015 aislaron otras seis (Ledesma-Escobar, Capote, Luque de Castro, 2015). Otras sustancias muy comunes en la corteza del limón y que reaccionan positivamente ante el reactivo de Baljet son los limonoides (Avula, Sagi, Wang, Wang, Gafner, Manthey & Khan, 2016; Wang et al., 2016). Estas sustancias se diferencian de las cumarinas en que no presentan la insaturación  $\alpha$ - $\beta$  respecto al sistema lactónico.

Para la identificación de la presencia de azúcares reductores se realizaron los ensayos de Fehling y Benedict, los cuales corroboraron la presencia de estos metabolitos al observarse durante el ensayo la aparición de un precipitado color rojizo en el fondo del tubo de ensayo. La producción y acumulación de azúcares es una función común en los frutos, por lo que la presencia de los mismos resulta esperada, siendo informada frecuentemente en la literatura para el caso del fruto del *Citrus limon* (Oikieh, Omoregie, Oviasogie & Oriakhi, 2015).

Durante la determinación de los flavonoides en todos los casos, se observó una gama de colores que va desde el amarillo claro hasta el rojo intenso que hace pensar en una diferencia en cuanto a la naturaleza química de los mismos, preferentemente por una mayor concentración de flavonoles, resultando por ello de gran utilidad práctica. La reacción con ácido sulfúrico concentrado las tinturas a partir del fruto fresco dieron coloración naranja, indicativo de la presencia de flavanonas, mientras que para las tinturas de la cáscara seca la coloración fue mucho más intensa, sugiriendo una mayor concentración de estos compuestos. Para el ensayo de Shinoda, a las tinturas de fruto fresco se les evidenció un resultado positivo por la aparición de una coloración carmelita oscura, lo cual es indicativo de la presencia de flavonas, mientras que para las de cáscara seca la evidencia positiva fue una coloración naranja lo cual es indicativo también de la presencia de este tipo de flavonoide y también de flavonoles. En los ensayos con álcalis, los cambios de coloración fueron a amarillo para las tinturas FE 50 %, FE 70 % y SZ 50 %, indicativa de flavonas, flavanonol e isoflavonas; mientras que para las SZ 70 % y las CS 50 % y CS 70 % la evidencia fue de un color naranja igual que para las de cáscara seca esto quiere decir la presencia de Flavanonas y flavonoles. El ensayo de Rosenhein, arrojó que hay presencia de leucoantocianidinas y antocianidinas por la aparición de una coloración marrona (Fabroni, Ballistrerri, Amenta, Romeo y Rapisarda, 2016).

En el caso de la identificación de los fenoles y taninos se pudo determinar su presencia mediante el ensayo del cloruro férrico el cual evidenció la aparición de una coloración verde intensa clara para las tinturas del fruto fresco y un color verde oscuro para las de cáscara seca esto se debe a que hay menor cantidad de sustancias expresadas como sólidos totales en las de fruto fresco. Solamente la tintura FE 70 % fue capaz de mostrar coloraciones similares a las obtenidas a partir de la corteza seca ante este reactivo. Diversos metabolitos de naturaleza fenólica, además de los flavonoides previamente mencionados, han sido identificados en el limón. Derivados del ácido hidroxicinámico como el ácido ferulico, caféico y clorogénico han sido reportados (Bocco, Cuvelier, Richard & Berset, 1998); además de derivados del ácido benzoico como el ácido vainillínico, protocateico y orto-benzóico (Hertog, Hollman & Van de Putte, 1993).

La identificación de aminoácidos y aminos en general se pudo constatar sólo en las tinturas de cáscara seca y esto pudo estar dado por la mayor concentración de alcaloides demostrados en estas formulaciones, pues como resulta conocido estas sustancias pueden provocar interferencias evidenciando la coloración violeta al reaccionar con el extracto.

En sentido general, los resultados de la determinación química cualitativa de los componentes de las tinturas permitieron establecer diferencias marcadas entre los tipos de materias primas porque los ensayos de Lieberman-Burchard y Ninhidrina solo dan positivo a la corteza seca, mientras que los ensayos de Dragendorff, Wagner, ácido sulfúrico concentrado y cloruro férrico poseen mayor intensidad de las evidencias en la corteza seca, que en la fresca excepto para la tintura FE 70 %. Por tanto, las mayores y mejores evidencias están en la corteza seca. Como bien se observa en las tablas 3 y 4, para ninguna de las

formulaciones preparadas los parámetros varían con una significación estadística (Test HSD de Tukey al 95 % de confianza).

### Conclusiones

Se obtuvieron un total de seis formulaciones a las que se les determinaron sus parámetros de calidad físicos, físico-químicos y químicos cualitativos; demostrándose que ninguna de las variantes que emplearon el fruto entero de *Citrus limon* (L.) Osbeck como materia prima resulta equivalente a la calidad obtenida para las tinturas preparadas a partir de la corteza seca del fruto. Los mejores resultados se obtienen con la tintura preparada a partir del fruto entero sin zumo en etanol al 70 % al presentar un mayor valor de pH. Las seis tinturas preparadas a partir del fruto del *Citrus limon* (L.) Osbeck resultan estables por un período de 30 días en las condiciones de estudio, según los parámetros físicos y físico-químicos considerados

### Referencias Bibliográficas

- Acevedo-Rodríguez, P., & Strong, M. (2012). Catalogue of seed plants of West Indies. En Smithsonian Contributions to Botany No. 98. Washington DC: Smithsonian Institution Scholarly Press, 284.
- Alvares Arias, B., & Laca, L. R. (2005). Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean región. *Journal Ethnopharmacology*, 97(1), 89–95.
- Asghar, G., Maryam, N., Mahmood, J.T., & Hamid, Z. (2011). The citrus flavonoid hesperidin induces p53 and inhibits NF- $\kappa$ B activation in order to trigger apoptosis in NALM-6 cells: invol of PPARc-dependent. *A European Journal of Nutrition*, 51(1), 39-46.
- Avula, B., Sagi, S., Wang, Y.H., Wang, M., Gafner, S., Manthey, J.A., & Khan, I.A. (2016). Liquid Chromatography-Electro Spray Ionization Mass Spectrometry Analysis of limonoids and flavonoids in Seeds of Grapefruit, other citrus species, and dietary supplements. *Plantas Medicinales*, 5, 379-438.
- Beurton, C. (2008). Rutaceae. En: Greuter, W. y Rankin, R (eds.). *Flora de La República de Cuba. Serie A, Plantas Vasculares. Fascículo*, 14(3). Publisher: A. R. Gantner Verlag. ISBN: 9783906166667.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., & Berset. C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal. Agric. Food Chem.*, 46, 2123–2129.
- Correa, E., Quiñones, W., & Echeverría, F. (2016). Methyl-N-methylantranilate, a pungent compound from *Citrus reticulata* Blanco leaves. *Pharmaceutical Biology.*, 54(4), 569-571. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1044618>.
- Do-Hoon, L., Kwang-Il, P., Hyeon-Soo, P., Sang-Rim, K., Arulkumar, N., Jin-A, K., Eun-Hee, K., Won-Sup, L., Young-Sool, H., Hyon-Jong, C., Su-Jin, A., & Gon-Sup, K. (2012). Flavonoids isolated from Korea *Citrus aurantium* L. induce G2/M phase arrest and apoptosis in human gastric cancer AGS cells. *Evid Based Complement Alternat*, 1–11.
- Fabroni, S., Ballistrerri, G., Amenta, M., Romeo, F.V., & Rapisarda, P. (2016). Screening of the anthocyanin profile an in vitro pancreatic lipase inhibition by anthocyanin containing extracts of fruits, vegetables, legumes and cereals. *J. Sci. Food Agric.* <https://doi.org/10.1002/jsfa7708>.
- García, M., Armenteros, D.M., Mahía M., Coma, C, Hernández, J., Díaz, A., & Fernández, F. (2002). Plantas Cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares. *Rev cubana Angiol y Cir Vasc*; 3(2), 39-46.
- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A., & García-Viguera, C. (2010) Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *J. Pharm. Biom. Anal.*, 51, 327–345.
- Kumar, S., Pushpak, A., Shilpi, M., Anup, K., & Shraddha, V. (2014). Phytochemical analysis of *Citrus limon* and *Citrus sinensis* peels and identification of beta-carotene pigment using ethanolic extract. *Int. Res. J. Pharm*, 5(10), 789-781. Software Statgraphics Centurión XV versión 15.2.14. (2007)
- Ledesma-Escobar, C., Capote, F., Luque de Castro, M.D. (2015). Characterization of lemon (*Citrus Limon*) polar extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high-resolution mode. *J Mass Spectrom*, 50(11), 1196-1205. <https://doi.org/10.1002/jms.3637>.
- MINSAP. (1991). Norma Ramal de Salud Pública 311 (NRSP 311). Extractos fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos. Cuba, La Habana: Editorial Ciencias Médicas. Recuperado de [www.cecmecd.cu](http://www.cecmecd.cu).
- MINSAP. (1991). NRSP 312. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de Ensayos. Cuba, La Habana: Editorial Ciencias Médicas. Recuperado de [www.cecmecd.cu](http://www.cecmecd.cu).

- MINSAP. (2008). Norma Cubana (NC) 90-13-13. Aseguramiento metrológico. Medidores de pH. Reglas generales para efectuar mediciones de pH. Cuba, La Habana. Recuperado de [www.nconline.cubaindustria.cu](http://www.nconline.cubaindustria.cu).
- MINSAP. (2017). Colectivo de autores. Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos. Recuperado de <http://www.instituciones.sld.cu>.
- Miyake, Y., Murakami, A., Sugiyama, Y., Isobe, M., Koshimizu, K., & Ohigashi, H. (1999). Identification of coumarins from lemon fruit (Citrus Limon) as inhibitors of in vitro tumor promotion and superoxide and nitric generation. *J. Agric. FoodChem.*, 47(8), 3151-3157.
- Morón, F., y Levy, M. (2002) *Farmacología General*. La Habana. Editorial Ciencias Médicas, 195-205. ISBN: 959-212-070-6
- Ochoa, A., Lopez, T., & Colombat, M. (2002). *Farmacognosia y Química de los productos naturales*. Monografía. Editado en CD-ROM. ISBN 959-207-012-1. 15-30.
- Oikieh, E.L, Omoregie, E.S, Oviasogie, F.E, & Oriakhi, K. (2015). Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juices concentrates. *Food Sci. Nutr.*, 4(1), 103-109. DOI: 10.1002/fsn3.268.
- Ruiz, V.E, Interdonato, R, Cerioni, L, Albornoz, P, Ramallo, J, Prado, F.E, Hilal, M, & Rapisarda, V.A. (2016). Short tem UV-B exposure induces metabolic and anatomical changes in peel of harvested lemons contributing in fruit protection againts green mold. *J. Photochem. Photobiol B.*, 159, 59-65. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.016
- Wang, S., Tu, H., Wan, J., Chen, W., Liu, X., Luo, J., & Zhang, H. (2016). Spatio-temporal distribution and natural variation of metabolites in citrus fruits. *Food Chem*, 199, 8-17
- Wells, J.I (1988). *Pharmaceutical Preformulation: The physichemical Properties of drug substances*. New York USA: Ed. John Wiley Soas, 215-219.
- WHO. (2011). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva, Switzerland: Edit. WHO Press, 33-35. ISBN 978 92 4 150073 9.
- Zobel, A.M., Wang, J., March, R.E., & Brown, S.A. (1991). Identification of eight coumarins occurring with psoralen, xanthotoxin, and bergapten on leaf surfaces. *J. Chem. Ecol*, 17(9), 1859-1870. <https://doi.org/10.1007/BF00993733>.