



POSGRADOS

Maestría en **PRODUCTOS FARMACÉUTICOS NATURALES**

RPC-SO-09-NO.174-2020

Opción de Titulación:

Proyecto de titulación con componentes de investigación aplicada y/o de desarrollo

Tema:

Extracción de cannabidiol (CBD) mediante métodos de maceración dinámica y ultrasonido en diferentes solventes.

Autor(es)

Francisco José Andrango Lincango
Verónica Alexandra Velásquez Freire

Director:

Edison Antonio Osorio Muñoz

QUITO – Ecuador
2023



Autor(es):



Francisco José Andrango Lincango

Químico Farmacéutico

Candidato a Magíster en Productos Farmacéuticos Naturales por la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.

franciscoandrango02@gmail.com



Verónica Alexandra Velásquez Freire

Ingeniera en Biotecnología

Candidata a Magíster en Productos Farmacéuticos Naturales por la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.

verito_27alexa@hotmail.es

Dirigido por:



Edison Antonio Osorio Muñoz

Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales.

Máster en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales.

Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.

eosorio@ups.edu.ec

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra para fines comerciales, sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Se permite la libre difusión de este texto con fines académicos investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los autores.

DERECHOS RESERVADOS

2023 © Universidad Politécnica Salesiana.

QUITO– ECUADOR – SUDAMÉRICA

Francisco José Andrango Lincango; Verónica Alexandra Velásquez Freire

“Extracción de cannabidiol (CBD) mediante métodos de maceración dinámica y ultrasonido en diferentes solventes”

DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón, este trabajo de titulación a Dios que es el motor de mi vida y nunca me desamparó durante todo el proceso. Tu palabra fue la fortaleza y mi guía para lograr todos mis objetivos. Te ofrendo este trabajo en agradecimiento por tu amor y tu misericordia, padre celestial, te amo con todo mi ser.

Verónica Velásquez

Dedico a Dios por todas las bendiciones recibidas, a mi virgen la Madre Dolorosa que ha sido mi motor de vida, y a mi familia por ser fuente de inspiración durante toda mi trayectoria personal, académica y profesional.

Francisco Andrango

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres Luis Eduardo y Fabiola por todo el apoyo brindado durante todo este proceso; a mis sobrinos Doménica y Alejandro por ser mi inspiración y por su cariño sincero; a mi hijo Snoopy por ser mi compañero fiel durante la ejecución de este proyecto; a mis amigos Francisco, Esteban, Jhonny, Klever, Juan Carlos, Christopher, Sherilin, David, Antonio, Johana, Elvis, María José, Fernanda y Ramiro por sus palabras de aliento que me ayudaron salir adelante, por su aporte profesional que fue importante para la culminación de este trabajo y sobre todo por su amistad verdadera.

A la Universidad Politécnica Salesiana por abrirme las puertas hacia nuevos horizontes. Al Dr. Paco Noriega y al Dr. Edison Osorio por su tutela y consejos que han sido de gran aporte para el desarrollo de este proyecto de titulación, a CENTROCESAL, especialmente al Dr. Germánico Silva, quien con su apoyo y amistad colaboró en el desarrollo técnico y analítico de este trabajo.

Verónica Velásquez

Agradezco a Dios por haberme dado sabiduría, fortaleza en los momentos difíciles de mi vida y dado la bendición de poder terminar mi trabajo de investigación. A mi madre Dolorosa por ser mi guía y motivo de salir adelante. A mis amores Yesy e Ian por todo el apoyo y el amor incondicional, doy gracias a Dios por regalarme una familia tan linda. A mis padres Francisco y Carmen, a mi hermana Diana por ser el motivo de superación y por estar en las situaciones buenas y en las malas de mi vida. A toda mi familia materna y paterna por ser las personas de inspiración y ser la fortaleza en poder concluir mi investigación. A todos mis amigos de la universidad, trabajo y ex trabajo por ser las personas que me han ayudado a salir adelante y sobre todo apoyarme emocionalmente.

A la Universidad Politécnica Salesiana, especialmente al Dr. Edison Osorio y Dr. Paco Noriega por sus enseñanzas, experiencias y ser pilares en mi trabajo de investigación.

Francisco Andrango

Tabla de Contenido

Resumen	11
Abstract.....	12
Términos, definiciones y abreviaturas	13
1 Introducción.....	14
2 Determinación del Problema.....	16
2.1 Formulación del problema	17
2.2 Justificación	17
2.3 Objetivos.....	18
2.3.1 Objetivo General.....	18
2.3.2 Objetivos Específicos	18
2.3.3 Hipótesis de Investigación	18
3 Marco teórico referencial.....	20
3.1 Taxonomía.....	20
3.2 Descripción botánica.....	20
3.3 Cannabinoides.....	22
3.3.1 Cannabidiol (CBD).....	22
3.3.2 Tetrahidrocannabinol (THC)	23
3.3.3 Cannabinol (CBN).....	24
3.3.4 Cannabigerol (CBG).....	24
3.4 Beneficios.....	25
3.5 Métodos de extracción	26
3.5.1 Extracción con solventes	28
3.5.2 Extracción por maceración dinámica	30
3.5.3 Extracción por ultrasonido	30
3.6 Método de cuantificación	31
4 Materiales y metodología.....	33
4.1 Muestreo.....	33
4.2 Caracterización del material vegetal	33
4.3 Métodos de Extracción	36
4.4 Cuantificación de CBD extraído	38
4.5 Análisis Estadístico	44
5 Resultados y discusión.....	45
5.1 Caracterización del material vegetal	45

5.2	Cuantificación de CBD extraído en los diferentes métodos de extracción	46
5.3	Análisis estadístico	52
6	Conclusiones	57
7	Recomendaciones.....	58
8	Referencias	59
9	Anexos	61

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de Cannabis sativa L.	20
Tabla 2 Concentración de CBD con su respectivo factor de disolución	39
Tabla 3 Caracterización del material vegetal	45
Tabla 4 Datos obtenidos para la curva de calibración.....	46
Tabla 5 Rendimiento de extracción de Cannabidiol por medio de maceración dinámica 48	
Tabla 6 Porcentaje de Cannabidiol por medio de maceración por ultrasonido	50
Tabla 7. Resultados del análisis de varianza ANOVA de dos vías de los porcentajes de Cannabidiol extraídos	53
Tabla 8 Test de Normalidad de Shapiro-Wilk.....	54
Tabla 9 Prueba t no pareada	54
Tabla 10 Pruebas de comparación multiples	55
Tabla 11 Análisis de costos por solvente por gramo de material vegetal.....	55

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1 Morfología de <i>Cannabis sativa</i> L.	21
Ilustración 2 Tipos de Cannabinoides CBD	23
Ilustración 3 Tipos de Cannabinoides THC	23
Ilustración 4 Tipos de Cannabinoides CBN	24
Ilustración 5 Tipos de Cannabinoides CBG	25
Ilustración 6 Proceso de descarboxilación de THCA y CBDA.....	27
Ilustración 7 Extracción Soxhlet.....	30
Ilustración 8 Fenómeno de cavitación, colapso y liberación de metabolito a partir de material vegetal.....	31
Ilustración 9 Ubicación Kañamu593 S.A.....	33
Ilustración 10 Proceso de descarboxilación, molienda y tamizado del material vegetal (cogollo)	34
Ilustración 11 Proceso del tratamiento vegetal	35
Ilustración 12 Proceso de Maceración Dinámica	37
Ilustración 13 Maceración por ultrasonido	38
Ilustración 14 Preparación del Estándar.....	40
Ilustración 15 Preparación de la muestra.....	42
Ilustración 16 Curva de calibración del Cannabidiol	47
Ilustración 17 Variación de porcentaje entre solventes.....	49
Ilustración 18 Variación de porcentaje entre solventes por ultrasonido.....	51
Ilustración 19 Comparación entre métodos de extracción y tipos de solventes	52

Índice de Ilustraciones

Anexo 1 Certificado de análisis de parte florida Cannabis sativa L.....	61
Anexo 2 Cromatogramas de estándares de Cannabidiol, CBD	62
Anexo 3 Muestras de tratamientos de Cannabidiol, CBD	63
Anexo 4 Cromatogramas de muestras de CBD por Maceración dinámica	64
Anexo 5 Cromatogramas de muestras de CBD por Maceración por ultrasonido	65
Anexo 6 Certificado de análisis del estándar mix de referencia	66
Anexo 7 Certificado de análisis del Hexano	68
Anexo 8 Certificado de análisis del etanol absoluto	69
Anexo 9 Certificado de análisis del etanol al 70 %	71
Anexo 10 Certificado de análisis del etanol al 70 %	72
Anexo 11 Certificado de análisis de Acetonitrilo.....	73
Anexo 12 Certificado de análisis de Ácido Acético glacial.....	74

Extracción de cannabidol (CBD) mediante métodos de maceración dinámica y ultrasonido en diferentes solventes

Autor(es):

Francisco José Andrango Lincango; Verónica Alexandra
Velásquez Freire

Resumen

En el Ecuador, la industria del Cannabis en los últimos años ha tenido un crecimiento acelerado debido a la legalización de sus componentes lo que ha permitido establecer varios modelos de negocios relacionados con los componentes del Cannabis. Esta planta está constituida por múltiples componentes siendo uno de los más importantes el Cannabidiol (CBD) que representa el 40% del extracto total. Es por esta razón que el estudio se enfocó en determinar el método adecuado y representativo para extraer la mayor concentración de este compuesto.

Se recolectaron muestras de Cannabis sativa L. en el sector de Angumba, la cual se sometió a diversos procesos de extracción con Alcohol absoluto, Etanol al 70% y n-Hexano, la comparación de la eficacia de extracción se evidenció en función al porcentaje de extracción desde el material vegetal vs el estándar certificado de CBD.

Dentro del estudio se logró establecer que el método más eficaz y con porcentaje de recuperación de CBD en base de los solventes n-Hexano, Alcohol Absoluto y Etanol al 70% y facilidad de obtención de los componentes fue el Etanol al 70%.

Palabras clave:

Cannabis, Cannabinos, CBD, THC, método de extracción, método analítico.

Abstract

In Ecuador, the Cannabis industry has had an accelerated growth in recent years due to the legalization of its components. This has allowed the establishment of several business models related to the components of Cannabis. One of the most important components which this plant is made up of is Cannabidiol (CBD). It represents 40% of the total extract. It is for this reason that the study was focused on determining the adequate and representative method to extract the highest concentration of this compound.

Samples of Cannabis sativa L. were collected in the sector of Angumba, which were subjected to various extraction processes with absolute alcohol, 70% ethanol and n-Hexane. The comparison of the extraction efficiency was evidenced in terms of the percentage of extraction from the plant material vs. the certified standard of CBD.

Within the study, it was possible to establish that the most effective method including percentage of CBD recovery based on the solvents n-Hexane, Absolute Alcohol and 70% Ethanol and ease of obtaining the components, was 70% Ethanol.

Keywords:

Cannabis, Cannabinols, CBD, THC, extraction method, analytical method.

Términos, definiciones y abreviaturas

CBCA:	Ácido cannabicromico
CBDA:	Ácido cannabidiolico
CBGA:	Ácido cannabigerólico
CBNDA:	Ácido cannabinodiolico
CBNA:	Ácido cannabinólico
THCA:	Ácido tetrahidrocannabinólico
CBC:	Cannabicromeno
CBD:	Cannabidiol
CBG:	Cannabigerol
°C:	Centígrados
cm:	Centímetro
C21:	Compuestos terpenofenólicos con 21 carbonos
C22:	Compuestos terpenofenólicos con 22 carbonos
HPLC:	High-Performance Liquid Chromatography o cromatografía líquida de alta resolución.
g:	Gramos
H0:	Hipótesis nula
H1:	Hipótesis arquitecto
m:	metro
µg:	microgramos
µl:	microlitro
µm:	micrometro
mL:	mililitro
mm:	milímetro
min:	minuto
nm:	nanómetro
%:	Porcentaje
Alcaloides:	Componente orgánico nitrogenado, considerado como metabolito secundario de interés.
Anova:	El análisis de varianza, utilizado para establecer si existe diferencia significativa entre las medias de tres o más grupos.
Estilbenos:	Son una clase de polifenoles, considerados como beneficiosos para la salud.
Flavonoides:	Son metabolitos secundarios polifenólicos comúnmente con un grupo cetona con acción antioxidante.
Terpenos:	Son hidrocarburos orgánicos que se encuentran en las plantas, incluido el cannabis.

1 Introducción

Las plantas medicinales son especies que contienen metabolitos que ejercen una acción beneficiosa para el ser vivo, las propiedades medicinales son atribuidas a compuestos producidos en su metabolismo llamados metabolitos secundarios, como por ejemplo alcaloides, flavonoides, taninos, glucósidos cianogénicos, saponinas, aceites esenciales entre otros, estos metabolitos presentan un alto valor en la industria (Astudillo, 2015).

Entre las plantas medicinales tenemos el *Cannabis sativa L.* que es una especie químicamente compleja ya que contiene gran cantidad de metabolitos secundarios entre los cuales tenemos el ácido cannabidiólico (CBDA), ácido tetrahidrocannabinólico (THCA), ácido cannabinólico (CBNA), ácido cannabigerólico (CBGA), ácido cannabicrómico (CBCA) y el ácido cannabinodiólico (CBNDA), cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), entre otros. Además, se encuentran metabolitos secundarios no cannabinoides aproximadamente 419 compuestos, entre estos tenemos los terpenos, flavonoides, alcaloides, estilbenos, amidas fenólicas y lignanamidas (Elsohly et al., 2017).

En el Ecuador, la Asamblea Nacional aprobó el uso de los derivados del Cannabis para fines medicinales y terapéuticos lo que permitió la despenalización por medio de la reforma a la Ley Orgánica de Prevención Integral del Fenómeno Socio Económico de las Drogas y de Regulación y Control del uso de sustancias catalogadas sujetas a fiscalización. (Asamblea Nacional de la República del Ecuador, 2019).

El Cannabis viene acompañando al ser humano desde hace más de 10000 años tanto a nivel recreativo como medicinal, los orígenes surgen del Himalaya, este tipo de plantas pueden desarrollarse en una variedad de hábitats y altitudes (Elsohly et al., 2017), especialmente se adapta a latitudes septentrionales y climas templados (Fassio et al., 2013). Los primeros relatos que se han evidenciado la utilización del Cannabis en usos medicinales han sido en el Oriente Medio y Asia durante el siglo

VI a. C, en cambio en el occidente sus inicios fueron en el siglo XIX; entre los beneficios terapéuticos usados son tratamiento del dolor, glaucoma, náuseas, depresión y neuralgia, hay que destacar que también ha contribuido en los tratamientos de los síntomas del VIH / SIDA y en la esclerosis múltiple (Elsohly et al., 2017).

Para la extracción de compuestos cannabinoides existen diferentes metodologías, como son extracción con solventes, destilación, maceración, sonicación y técnicas de extracción modernas tales como la extracción asistida por ultrasonido, extracción supercrítica y la extracción con agua caliente a presión (Nuapia et al., 2020).

Entre las técnicas más utilizadas para la extracción de cannabidiol (CBD) es la inmersión en solventes como el metanol, etanol, isopropanol, hexano, entre otros; lo fundamental en dicha técnica es la polaridad de los solventes, ya que dependiendo de esta puede haber mayor extracción del metabolito secundario (Castillo & Rico, 2020).

Por lo tanto, en el trabajo de investigación se evaluó los métodos de extracciones convencionales usando diferentes solventes orgánicos para poder comparar y determinar que método de extracción de cannabidiol es el más eficiente, evaluando tecnologías al alcance de las pequeñas y medianas industrias además de utilizar solventes no tóxicos con el medio ambiente.

2 Determinación del Problema

La Asamblea Nacional del Ecuador aprobó el 17 de septiembre de 2019 el uso de los derivados del cannabis para fines medicinales y terapéuticos lo que permitió la despenalización por medio de la reforma a la Ley Orgánica de Prevención Integral del Fenómeno Socio Económico de las Drogas y de Regulación y Control del uso de sustancias catalogadas sujetas a fiscalización en el cual en la disposición General Tercera indica “Se excluye de las sustancias catalogadas sujetas a fiscalización al cannabis no psicoactivo o cáñamo, entendido como la planta de cannabis y cualquier parte de dicha planta, cuyo contenido de delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) es inferior a 1% en peso seco, cuya regulación es competencia de la Autoridad Agraria Nacional”(Asamblea Nacional de la República del Ecuador, 2019).

De igual manera el Ministerio de Agricultura y Ganadería y la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria mediante Acuerdo Ministeriales y Normativas han establecido “la importación, siembra, cultivo, cosecha, post cosecha, almacenamiento, transporte, procesamiento, comercialización y exportación de cannabis no psicoactivo o cáñamo y cáñamo para uso industrial” (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2020), además de la regularización de productos terminados y materias primas que sean de uso y consumo humano en productos farmacéuticos (Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria, 2021).

Por lo tanto marca el comienzo de la industria ecuatoriana, debido a las ventajas geográficas y características climáticas que permiten al menos dos o tres cosechas anuales, además al despenalizar el proceso de obtención *Cannabis sativa L.* genera nuevos ingresos al país, por lo tanto, se requiere de métodos de extracción de cannabinoides a bajos costos siempre y cuando se obtengan productos de calidad, para esto se analiza la necesidad de desarrollar procesos de extracción que puedan ser reproducidos a nivel industrial, garantizando la calidad de los productos y satisfacer los requerimientos legales como las diferentes necesidades de los clientes.

Para que los métodos de extracción sean eficientes se debe tomar en consideración la calidad de la materia prima (*Cannabis sativa L.* no psicoactiva), esto depende de varios factores como la genética, edad, condiciones de cultivo, periodo de cosecha, postcosecha y almacenamiento. Además, se debe tomar en consideración los tipos de solventes a ser utilizados para la extracción para que el producto final no existan residuos tóxicos, sean amigables con el medio ambiente, fáciles de adquirir, y estos no produzcan efectos colaterales en el ser humano cuando hayan sido procesados como una forma cosmética, nutracéutica o terapéutica (Fassio et al., 2013).

2.1 Formulación del problema

¿Actualmente las pequeñas empresas y medianas industrias han determinado métodos de extracción de CBD utilizando tecnología a su alcance con el menor impacto al medio ambiente y sea factible de adquisición?

2.2 Justificación

Con el comienzo de la industrialización del Cannabis hoy en día la pequeña y mediana industria ecuatoriana no dispone de grandes recursos para la implementación de tecnología de alta eficiencia por lo tanto se ve la necesidad de desarrollar procesos de extracción que puedan ser reproducidos, garantizando la calidad de los productos y satisfacer los requerimientos legales como las diferentes necesidades de los clientes.

Además, se debe tomar en consideración el cuidado del medio ambiente y la salud humana utilizando solventes amigables con el medio ambiente, fáciles de adquirir, no tóxicos, ni produzcan efectos colaterales en el ser humano.

En la actualidad la sociedad está eliminando el paradigma del uso psicoactivo de *Cannabis sativa L.* y se está empezando a notar la importancia de los efectos terapéuticos que posee de acuerdo a los metabolitos como CBD, CBG, CBN entre otras. Siendo el más representativo el CBD por sus innumerables beneficios. Es una realidad que surge de la necesidad de tratar síntomas derivados de enfermedades que aquejan a la población como sida, cáncer, alzheimer, parkinson, epilepsia,

artritis reumatoidea, cefaleas entre otras, siendo este un remedio paliativo que puede contribuir con la disminución de estos malestares y mejorar la calidad de vida de los pacientes (Suntaxi, 2021).

El presente trabajo de titulación se enfocó en determinar métodos de extracción a bajos recursos y utilizando solventes adecuados para la extracción con el fin de ser evaluados a través de técnicas de cuantificación por cromatografía de alta eficiencia en la determinación de Cannabidiol.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Comparar la obtención de Cannabidiol mediante métodos de maceración dinámica y ultrasonido en diferentes solventes.

2.3.2 Objetivos Específicos

Analizar la extracción de Cannabidiol mediante método de maceración dinámica y ultrasonido.

Establecer la obtención de Cannabidiol utilizando n-Hexano, Alcohol Absoluto y Etanol 70%.

2.3.3 Hipótesis de Investigación

Tratamientos

H0: No Existe diferencias significativas entre tratamientos empleados en la extracción del Cannabidiol en *Cannabis sativa L.*

H1: Existe diferencias significativas entre tratamientos empleados en la extracción del Cannabidiol en *Cannabis sativa L.*

Solventes

H0: No Existe diferencias significativas entre solventes empleados en la extracción del Cannabidiol en *Cannabis sativa L.*

H1: Existe diferencias significativas entre solventes empleados en la extracción del Cannabidiol en *Cannabis sativa L.*

Interacción Tratamientos y solventes

H0: No Existe diferencias significativas entre la interacción entre tratamientos y sus efectos en los solventes empleados en la extracción del Cannabidiol en *Cannabis sativa L.*

H1: Existe diferencias significativas entre la interacción entre tratamientos y sus efectos en los solventes empleados en la extracción del Cannabidiol en *Cannabis sativa L.*

3 Marco teórico referencial

3.1 Taxonomía

Cannabis pertenece a la familia Cannabaceae, es una especie que crece espontáneamente y/o se cultiva en casi todas las regiones ecuatoriales sub-árticas del mundo. El cannabis ha sido caracterizado de diversas formas, algunos científicos están a favor de agrupar todos los taxones de *Cannabis* en una sola especie *Cannabis sativa L.* con dos subespecies, cada una dividida en dos variedades. Otros están a favor de dividir el *Cannabis* en tres especies: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* y *Cannabis rudelaris*, cada especie circunscribiendo sus propias variedades. En los tres sistemas de nomenclatura, *Cannabis sativa L.* es el taxón más variado y geográficamente diverso y circunscribe la mayoría de las variedades de fibras, semillas y drogas, en la tabla 1 se describe la clasificación taxonómica de *Cannabis sativa L.* (Ranalli, 2021).

Clase	Equisetopsida C
Subclase	Magnoliideae
Superorden	Rosanae
Orden	Rosales
Familia	Cannabaceae
Genero	<i>Cannabis sativa L.</i>
Nombre común	Cañamo, marihuana

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Cannabis sativa L.*

Fuente: (Linneo, 2022)

3.2 Descripción botánica

Las plantas de *Cannabis sativa L.* (Ilustración 1. a-e) son plantas anuales erectas, en su mayoría dioicas, rara vez monoicas, que crecen hasta 1–6m de altura. Los tallos son verdes, huecos, cilíndricos y con surcos longitudinales. La extensión de la ramificación es variable, las ramas secundarias varían de opuestas a alternas. La disposición de las hojas varía de decusadas en las ramas inferiores a alternas en las terminales. Los pecíolos miden hasta 7cm de largo, son cilíndricos con un surco

mediano en la parte superior y están cubiertos de tricomas glandulares y no glandulares (Ilustración 1. d-e) Las flores masculinas son de color verde pálido solitarias o en racimos. Las flores femeninas son de color verde oscuro muy juntas en el ápice de las inflorescencias en espigas cortas (Ilustración 1. a-c). Cada flor consta de un ovario con un estilo que termina en un par de estigmas plumosos largos y delgados en el ápice. El fruto es un aquenio, ovoide, elipsoide, de unos 4–6 mm de largo y 3–4 mm de diámetro, liso, algo comprimido, de color gris parduzco y moteado, que contiene una sola semilla con una cáscara dura (Ilustración 1. f) (Chandra, Lata, & Mahmoud, 2017)



Ilustración 1 Morfología de *Cannabis sativa* L.

Fuente: (Chandra, Lata, & Mahmoud, 2017)

3.3 Cannabinoides

Cannabis en su estructura química es muy compleja debido a la gran cantidad de constituyentes los cuales se pueden constituir en mono y sesquiterpenos, azúcares, hidrocarburos, esteroides, flavonoides, compuestos nitrogenados y aminoácidos entre otros. Los más conocidos y en mayor proporción dentro de cannabis son los fitocannabinoides que representan un grupo de compuestos terpenofenólicos C21 o C22 (para las formas carboxiladas). (ElSohly & Slade, 2005).

Se han reportado más de 90 cannabinoides diferentes en la literatura, aunque algunos de estos son productos de descomposición y generalmente se clasifican en 10 subclases. Los compuestos más abundantes y predominantes que se encuentran en el cannabis son el ácido cannabidiólico (CBDA), ácido tetrahidrocannabinólico (THCA), ácido cannabinólico (CBNA), ácido cannabigerólico (CBGA), ácido cannabicroómico (CBCA) y el ácido cannabinodiólico (CBNDA) (Elsohly & Slade, 2005).

Los ácidos fitocannabinoides no se descarboxilan enzimáticamente dentro de la planta, en gran medida, al calentarse después de la cosecha se produce la descarboxilación. Los fitocannabinoides se acumulan en la cavidad secretora de los tricomas glandulares, que se producen en gran medida en las flores femeninas y en la mayoría de las partes aéreas de las plantas. En términos más generales, la concentración de estos compuestos depende del tipo de tejido, la edad, la variedad, las condiciones de crecimiento, el tiempo de cosecha y las condiciones de almacenamiento (Andre et al., 2016).

3.3.1 Cannabidiol (CBD)

El cannabidiol, o CBD (Ilustración 2) es un fitocannabinoides que representa hasta el 40% del extracto de la planta de cannabis, que se une a una amplia variedad de objetivos fisiológicos del sistema endocannabinoides dentro del cuerpo. El CBD ha demostrado ser prometedor como objetivo terapéutico y farmacéutico. Ha demostrado ser prometedor como analgésico, anticonvulsivo, relajante muscular, ansiolítico, antipsicótico y ha demostrado actividad neuroprotectora, antiinflamatoria y antioxidante, entre otros usos actualmente investigados (DrugBank, 2022)

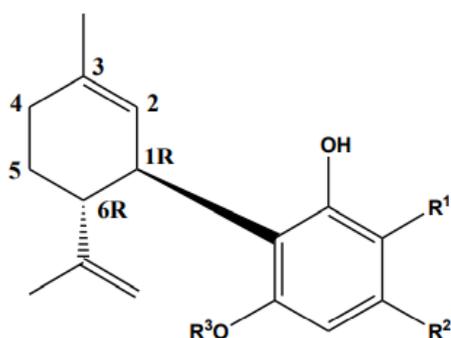


Ilustración 2 Tipos de Cannabinoides CBD

Fuente: (Patrim & Bhattacharjee, 2020)

3.3.2 Tetrahidrocannabinol (THC)

Tetrahidrocannabinol (THC) (Ilustración 3) es el cannabinoide psicoactivo primario extraído de la planta de cannabis. Históricamente se usó recreativamente debido a sus efectos psicoactivos, pero recientemente ha habido un interés significativo en explorar su utilidad médica. (Terence & Gupta, 2021). Estudios recientes indican propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, analgésicas, relajantes musculares, neuroantioxidantes y antiespasmódicas. Sin embargo, el THC también se ha asociado con una serie de efectos secundarios, incluyendo ansiedad, déficits colinérgicos e inmunosupresión (Andre et al., 2016).

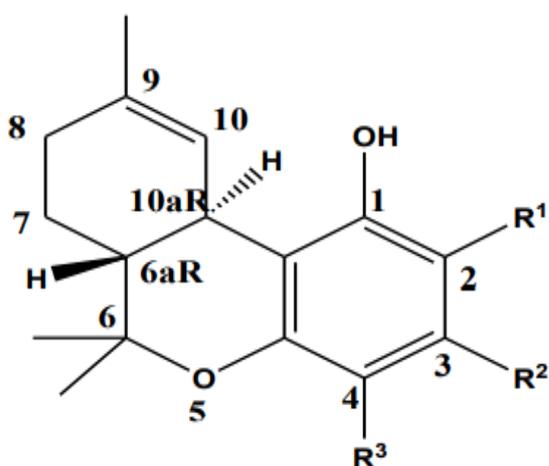


Ilustración 3 Tipos de Cannabinoides THC

Fuente: (Andre et al., 2016)

3.3.3 Cannabinol (CBN)

El cannabinol (Ilustración 4.) es un cannabinoide que del tetrahidrocannabinol (THC), con potenciales actividades inmunosupresoras y antiinflamatorias. Se forma como un producto de oxidación del THC y se encuentra típicamente en materiales de *Cannabis sativa L* envejecidos. (Biblioteca Nacional de Medicina, 2022)

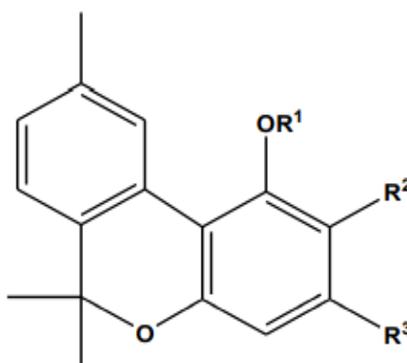


Ilustración 4 Tipos de Cannabinoides CBN

Fuente: (Biblioteca Nacional de Medicina, 2022)

3.3.4 Cannabigerol (CBG)

El cannabigerol es un miembro de la clase de resorcinoles, es un producto natural que se encuentra en las especies *Cannabis sativa* y *Helichrysum umbraculigerum*. (Pubchem, 2022).

El cannabigerol fue el primer compuesto aislado de la resina de la marihuana como sustancia química pura. Aunque los compuestos de tipo CBG son inactivos en comparación con el Δ^9 -THC, muestran una actividad antibacteriana considerable contra las bacterias gram positivas. Actualmente se conocen siete compuestos tipo CBG. El compuesto aislado más recientemente, el ácido cannabinerólico, es el isómero trans del ácido cannabigerólico. Todos los demás compuestos de tipo CBG tienen geometría cis. (Patrim & Bhattacharjee, 2020).

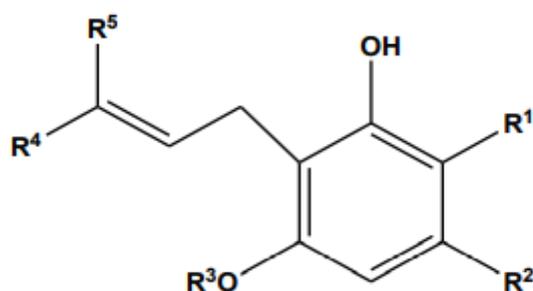


Ilustración 5 Tipos de Cannabinoides CBG

Fuente: (Patrim & Bhattacharjee, 2020)

3.4 Beneficios

El uso terapéutico del cannabis sativa se ha observado en textos antiguos de varios sistemas medicinales tradicionales. El uso multipropósito del *Cannabis sativa L* medicinal ha abordado principalmente a los atributos farmacológicos de los cannabinoides y sus derivados. Se observa que junto con la semilla y las otras partes de la planta de *Cannabis sativa L* también están enriquecidas con una variedad de metabolitos biológicamente activos y muchos investigadores han trabajado extensamente en las complejas vías biosintéticas de estos fitoquímicos, sus efectos sinérgicos, aislamiento, así como caracterización y aplicaciones medicinales. (Patrim & Bhattacharjee, 2020)

En diferentes estudios se ha demostrado que el *Cannabis sativa L* disminuye la presión intraocular en el glaucoma, además, contrarresta las náuseas y los vómitos que son provocados por quimioterapias en el tratamiento del cáncer (Ayenigbara, 2012).

Según Patrim y Bhattacharjee (2020) han demostrado que dependiendo de la concentración de los cannabinoides pueden ser beneficiosos o perjudiciales en la salud humana entre esos efectos tenemos:

- El THC en dosis bajas tienen efectos antipsicóticos y puede reducir la ansiedad; sin embargo, el THC en dosis altas puede causar alucinaciones en algunos pacientes, además, puede causar ansiedad, paranoia, boca seca, ojos secos, ojos enrojecidos, pupila lenta en respuesta a la luz y disminución

de la frecuencia de parpadeo; por tal razón es importante que el uso del cannabis sativa debe ser bajo prescripción médica para evitar los efectos adversos en dosificaciones inadecuadas.

- El CBD en dosis adecuadas pueden ayudar a las personas que sufren de insomnio ya que tiene un efecto relajante, sin embargo, en dosis altas pueden suprimir el apetito.

Según Shakya, Upadhaya, Nuepane, y Subedi (2021) mencionan que el CBD tiene propiedades anticonvulsivas, por tal razón puede ser utilizado en el tratamiento de epilepsia y convulsiones, además, juega un papel importante como neuroprotector ayudando en los padecimientos neurodegenerativos, de igual forma se realizaron estudios en roedores concluyendo que ayuda en los tratamientos de dolores crónicos.

3.5 Métodos de extracción

El fundamento de los procesos de “extracción” es la separación de componentes orgánicos de una mezcla sólida o líquida con la ayuda de un solvente. Existen dos tipos de extracción, la extracción líquida – líquida (discontinua) o la extracción sólido-líquido (continua), para poder obtener una mejor extracción sin la obtención de impurezas durante el proceso de cuantificación de los componentes. Es importante elegir correctamente el método de extracción, para lo cual es necesario elegir un proceso de extracción efectivo que permita la recuperación máxima del componente a extraer, para esto es necesario tener en cuenta la solubilidad del componente ya que un analito polar sólo pueden disolverse en solventes polares, y un analito no polar en solventes no polares (López-Moncholí, 2020)

Según las propiedades de la materia prima vegetal, la temperatura juega un factor importante ya que pueden contener compuestos termolábiles, es decir que se pueden degradar en presencia de altas temperaturas en un tiempo prolongado, por esta razón es necesario tener un control de la temperatura según los analitos a extraerse, para que no exista modificaciones en su estructura química. De igual forma el tiempo de extracción depende de los métodos a los cuales se les va

someter a la materia prima vegetal. Los métodos convencionales de extracción, como la maceración, requiere tiempos de extracción relativamente largos. En cambio, las técnicas no convencionales incluyen la extracción asistida por ultrasonidos, por microondas o la extracción mediante fluidos, estos métodos tienen la finalidad de reducir, de forma considerable, los tiempos de extracción (Villaverde, 2019).

Según lo mencionado anteriormente las condiciones iniciales para el proceso de extracción se deben elegir de manera adecuada ya que de esto depende una correcta separación de los componentes deseados de una matriz natural, además no solo depende de la solubilidad, tipo de solvente, entre otros, sino también del tratamiento previo del material vegetal, ya que con esto podemos aumentar la producción total de fitocannabinoides, entre los tratamientos previos a la extracción tenemos la descarboxilación (Ribeiro-Grijó et al., 2019)

Es necesario seleccionar el método de extracción de acuerdo a la matriz natural a la cual se va a caracterizar, para la obtención de cannabinoides es crítico la temperatura, la presión, el tiempo de extracción y la naturaleza del disolvente (Villaverde, 2020). En diferentes investigaciones se ha demostrado que la descarboxilación transforma los ácidos cannabinoides en sus respectivos cannabinoides neutros que son el CBD y Δ^9 -THC, como se visualiza en la siguiente ilustración (Ribeiro-Grijó et al., 2019).

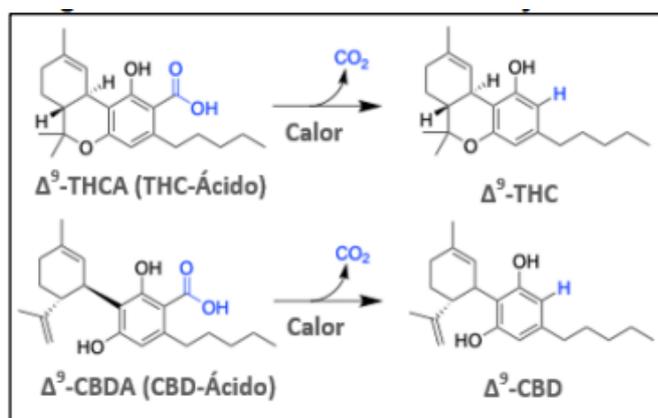


Ilustración 6 Proceso de descarboxilación de THCA y CBDA

Fuente: (Ribeiro-Grijó et al., 2019)

La descarboxilación a una temperatura de 120 ° C, se pudo comprobar que casi el 100% de las sustancias orgánicas se pueden convertir en poco tiempo en CBD. Entre las sustancias que se transforman son los terpenos, entre otros. Por tal razón hay que utilizar de forma responsable y controlada la suministración de calor ya que puede degradar los aceites esenciales de la planta o incluso los mismos cannabinoides (López-Moncholí, 2020).

Todos estos parámetros ya mencionados maximizan la recuperación total de CBD, la recuperación total de $\Delta 9$ -THC, la pureza del extracto y el rendimiento total del extracto (Fernández-Cuadros & Panche-Lozada, 2022).

Para la extracción de compuestos cannabinoides de *Cannabis sativa L* existen diferentes metodologías de extracción en las cuales se basan en el uso convencional como es la extracción con solventes, maceración dinámica, destilación, sonicación y técnicas de extracción modernas tales como la extracción asistida por ultrasonido, extracción supercrítica y la extracción con agua caliente a presión (Nuapia et al., 2020).

3.5.1 Extracción con solventes

Para la extracción de cannabidiol (CBD) se pueden usar diferentes técnicas, una de ellas es la extracción mediante la inmersión en solventes los mismos que pueden ser metanol, isopropanol, heptano, hexano, propano, butano, etanol, acetónitrilo, éter dietílico, ácido acético e incluso una combinación de estas (Castillo & Rico, 2020).

Una de las grandes desventajas de utilizar distintos solventes para el proceso de extracción son las trazas de estos en los compuestos extraídos, lo que genera una afectación a la calidad, seguridad y eficacia de los aceites o extractos, ya que estos solventes son tóxicos en su gran mayoría y al ser utilizarlos en el cuerpo humano pueden generar complicaciones en su salud sea a largo o mediano plazo; además que también podrían afectar al medio ambiente, en cambio las ventajas de este proceso son fáciles de ejecutar, no intervienen equipos sofisticados y el costo es muy bajo (Villaverde, 2020).

Uno de los compuestos más utilizados debido a su fácil manejo, bajo punto de ebullición (68,74 °C), bajo costo y fácil recuperación con pérdidas mínimas es el hexano, sin embargo, este compuesto químico tiene sus desventajas es perjudicial para el sistema nervioso, además puede generar problemas cardíacos y respiratorios en altas concentraciones, de igual forma puede generar necrosis si existe contacto prolongado con la piel, además es muy perjudicial para el medio ambiente (López-Moncholí, 2020).

Otro disolvente muy utilizado es el etanol al 70 % o al 96 %, el cual es considerado como un disolvente autorizado para utilización en el consumo humano, es una sustancia medianamente inflamable, su punto de ebullición es de 78,3 °C, además tiene una gran afinidad con la materia vegetal (Fernández-Cuadros & Panche-Lozada, 2022)

Entre los factores a tomar en consideración en la extracción con solvente es la temperatura, la cual puede variar desde -30°C a 80°C, además, se recomienda una agitación constante y las concentraciones entre el solvente (litros) y material (gramos) puede variar, desde 0.1:1 a 10:1 respectivamente, otro factor a considerar es el tiempo de permanencia del material en el solvente, este puede variar desde 1 minuto hasta 10 horas, dependiendo de la cantidad a extraer, sin embargo hay que tomar en cuenta que una mayor permanencia puede generar una extracción de compuestos no deseados por la polaridad del disolvente, al finalizar el tiempo establecido se requiere de un proceso de filtración para la separación extracto deseado y el material vegetal (Villaverde, 2020).

El método más utilizado para la extracción con solvente es conocido como la “Extracción Soxhlet” este método de separación consiste en ebullición del solvente el cual, cumple la función de extraer el soluto deseado del material vegetal, utilizando un ingreso constante de calor como se evidencia en la Ilustración 7 (Suntaxi, 2021).



Ilustración 7 Extracción Soxhlet

Fuente: (Núñez, 2008)

3.5.2 Extracción por maceración dinámica

La extracción por maceración dinámica es considerada una de las técnicas más sencillas y más utilizadas en la obtención de extractos de cannabis.

Para el proceso de maceración se requiere la utilización de solventes entre los más utilizados se encuentra el etanol o el alcohol absoluto ya que es uno de los disolventes que extrae compuestos polares de manera más eficiente, una de las ventajas de este método de extracción es la alta eficiencia con relación al bajo costo del proceso (Fernández et al., 2021).

Entre los parámetros a controlar es el tiempo de permanencia y su temperatura, aunque la temperatura utilizada comúnmente es la ambiental; uno de los mayores inconvenientes es la eliminación del solvente utilizado, por tal razón es necesario emplear disolventes no tóxicos ya que pueden generar problemas de salud (Fernández et al., 2021).

3.5.3 Extracción por ultrasonido

Es una técnica innovadora comparada con las técnicas habituales, el fundamento de esta metodología de extracción es utilizar la intensidad y la frecuencia para aislar los componentes deseados de la materia vegetal, la extracción se lo hace en menos tiempo, con menor cantidad de disolvente, con equipos más pequeños e

incrementando el rendimiento de la extracción; pero los ultrasonidos de alta intensidad pueden cambiar las características del analito extraído. La base de esta metodología es generar ondas sonoras en un ambiente de compresión y expansión dando como resultado la producción de burbujas las cuales al momento de encontrarse inestables producen altas temperaturas y presiones por implosión, este proceso destruye las paredes celulares vegetales facilitando la liberación del metabolito deseado, en la Ilustración 8 se muestra el fenómeno de cavitación, colapso y liberación generado por el ultrasonido (Villaverde, 2020).

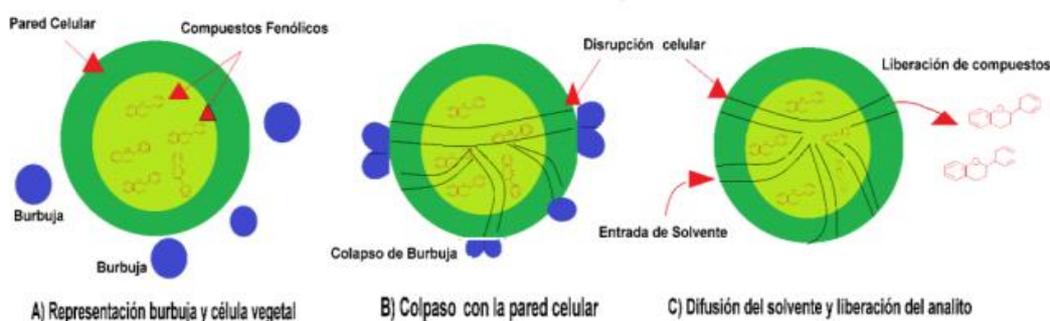


Ilustración 8 Fenómeno de cavitación, colapso y liberación de metabolito a partir de material vegetal.

Fuente: (Rafael, 2021)

3.6 Método de cuantificación

Para poder cuantificar los componentes ácidos y neutros de los cannabinoides existen algunos métodos de análisis, menos costoso y que puede determinar los dos tipos de componentes de los cannabinoides como es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Aunque esta metodología se utiliza para la cuantificación de principios activos tiene sus desventajas al no utilizar un método estandarizado, entre estas tenemos mala separación entre picos, picos asimétricos y sobrepuestos, estas desventajas pueden ser disminuidas y tener mejores resultados con condiciones cromatográficas correctas, hay que tomar en cuenta el fundamento de esta técnica en la cual interviene una fase líquida (fase móvil) y una fase sólida (fase estacionaria), además para lograr una correcta separación hay que tomar en cuenta la solubilidad de los componentes en las dos fases de la cromatografía (de Backer et al., 2009).

La cuantificación correcta de los componentes de los cannabinoides nos ayuda en la determinación de fenotipos y realizar control de calidad de los diversos productos que contienen dichos componentes estableciendo la cuantificación y la identificación (Elsohly et al., 2017).

4 Materiales y metodología

4.1 Muestreo

Cannabis sativa L. fue recolectada por medio de la empresa Kañamu593 S.A en el sector de Angumba, parroquia Tabacundo, cantón Pedro Moncayo en la provincia de Pichincha. Las coordenadas son las siguientes: X:810792,33, Y:10002996,7. (Ilustración 9) Se recolectó en los meses de junio y julio del 2021.

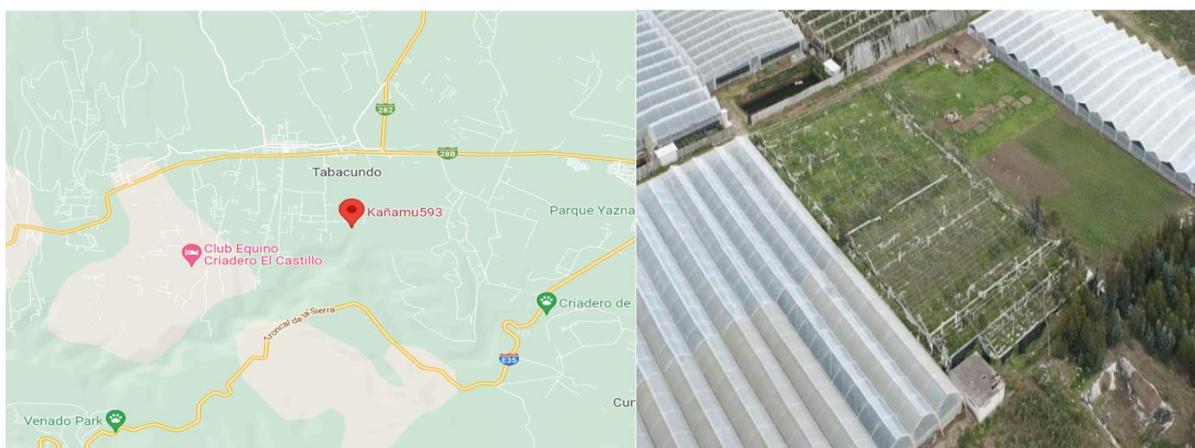


Ilustración 9 Ubicación Kañamu593 S.A

Fuente: (Google maps, 2021)

Según investigación bibliográfica la parte de la planta con mayor contenido de cannabinoides y de interés de la investigación son las flores de *Cannabis sativa L.* por su alto contenido de Cannabidiol (CBD). Por tal razón adquirió 40 gramos de muestra de flor tratada previamente por la empresa.

El material vegetal (flor tratada) se colocó en fundas ziploc y se introdujo en un frasco ámbar los cuales fueron llevados a los laboratorios de Posgrado de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Girón, Quito-Ecuador.

4.2 Caracterización del material vegetal

Para la descripción organoléptica, determinación de cenizas y humedad de la parte florida (cogollo) de *Cannabis sativa L.* se realizó los siguientes tratamientos:

- **Descarboxilación del material vegetal:** Para la eliminación de los grupos carboxilos tanto CBDA (ácido cannabidiólico) y THCA (ácido tetrahidrocannabinólico), se procedió a colocar el material vegetal previamente clasificado en una bandeja de aluminio (Ilustración 10.a), dichas bandejas se enviaron a una estufa marca Memmert, CM200 (Memmert, Alemania) para realizar un secado a 110°C (Ilustración 10. b) por un lapso de 30 minutos, de esta manera los grupos carboxilos se transforman en CBD y THG (Castillo & Rico, 2020) acorde al diagrama de flujo (Ilustración 11).

Es de suma importancia no excederse en la temperatura de descarboxilación ya que pueden afectar a la actividad de los componentes (Alba & Minchala, 2022).



Ilustración 10 Proceso de descarboxilación, molienda y tamizado del material vegetal (cogollo)

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

- **Molienda y tamizaje:** El material vegetal descarboxilado se molió con la ayuda de un mortero y pistilo como se muestra en la Ilustración 10.c, para finalizar se tamizó por malla #25 (Ilustración 10. d) y se almacenó la muestra (Ilustración 10. e) en funda ziploc y en frasco ámbar con tapa rosca de los cuales se utilizó 40 gramos.

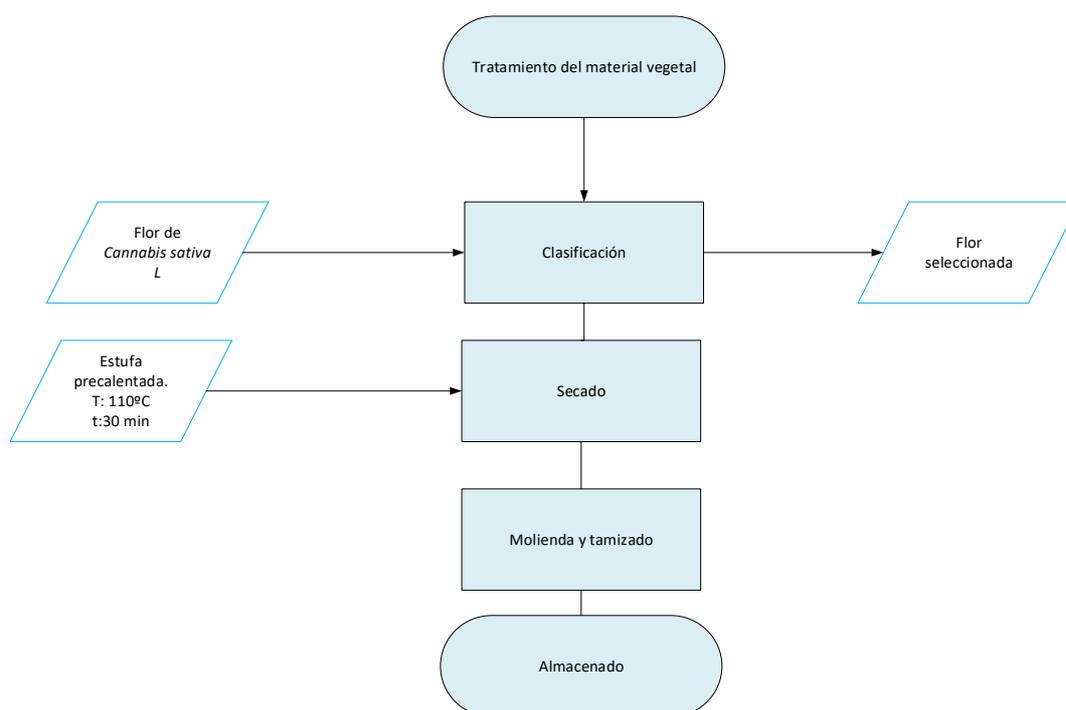


Ilustración 11 Proceso del tratamiento vegetal

Fuente: (Andrango & Velásquez, 2022)

- **Descripción organoléptica:** Se pesó en la Balanza analítica Mettler Toledo ME204/T00 (Mettler Toledo, Estados Unidos) 5 gramos de material vegetal tamizado, se colocó en un vidrio de reloj y se determinó a través de los sentidos tanto el color, olor y textura del material vegetal.
- **Determinación de humedad:** Para la cuantificación de este parámetro se tomó 1 gramo de muestra tamizada, se colocó en el plato de la balanza termogravimétrica marca Mettler Toledo HE73/03 (Mettler Toledo, Estados

unidos) se expuso a los rayos infrarrojos a una temperatura de 105°C aproximadamente por 15 minutos hasta conseguir temperatura constante.

- **Determinación de cenizas:** Para la cuantificación de este parámetro se consideró el material vegetal tamizado, se pesó 1 gramo de muestra en crisoles previamente tarados estos se colocaron en la mufla a 200 °C por 30 minutos, posteriormente se aumentó las condiciones de operación de la mufla a 700°C por 120 minutos; este parámetro determinó el residuo total de materia que queda después de la ignición o hasta obtener cenizas blancas. El cálculo de la ceniza empleó la ecuación 1 y se expresa en porcentaje (%).

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{\text{Peso de cenizas}}{\text{Peso de muestra seca}} * 100$$

Ecuación 1

4.3 Métodos de Extracción

Una vez definido y establecidos los pretratamientos, el material vegetal fue caracterizado para proceder a extraer los cannabinoides, los métodos de extracción seleccionados y los solventes utilizados fueron definidos por el costo, la facilidad de operación de los métodos y el alto rendimiento de extracción de los componentes.

- Maceración dinámica:** Las muestras de *Cannabis sativa L* se lo realizaron por triplicado y con los siguientes solventes: n-hexano Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), etanol al 70% Lira (Lira, Ecuador) y etanol absoluto Scharlau (Scharlau, Alemania); el proceso se realizó según la Ilustración 12, para esto se pesó 1 gramo de muestra tamizada en frascos ámbar por triplicado, se añadió 2 ml de solvente (n-Hexano, Etanol al 70% y Alcohol absoluto), se dejó empapar la muestra por 1 minuto y se añadió 6 ml de solvente, posteriormente esta mezcla se llevó a un agitador orbital Thermoscientific 4310 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) por un tiempo de 16 horas, finalmente, se filtró el extracto deseado y con la ayuda de una probeta se completó los 10 ml de solvente, se almacenó en viales ámbar de 10ml con tapa rosca a temperatura de 2°C a 8°C.

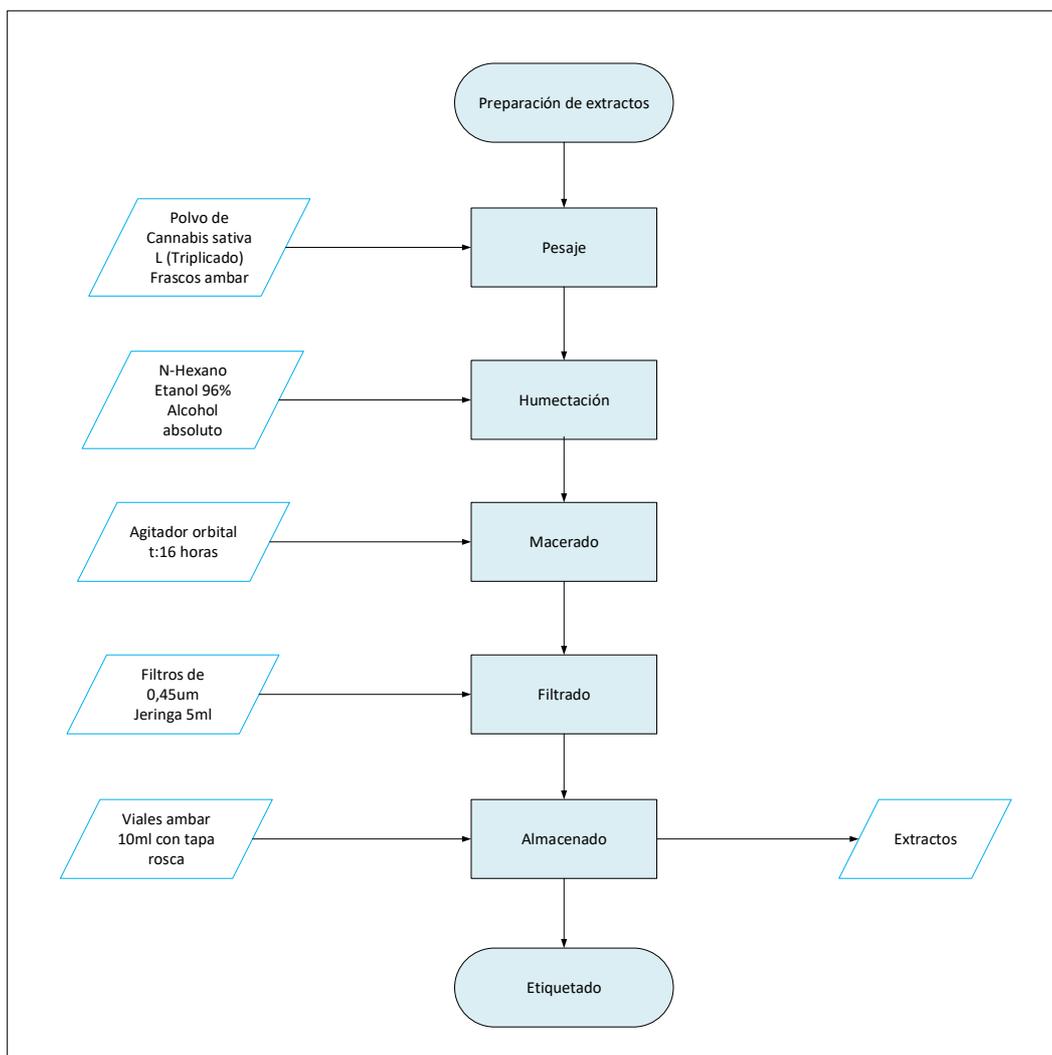


Ilustración 12 Proceso de Maceración Dinámica

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

- b. Maceración por ultrasonido:** Las muestras de *Cannabis sativa L* se lo realizaron por triplicado y con los siguientes solventes: n-hexano Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), Etanol al 70% Lira (Lira, Ecuador) y Etanol absoluto Scharlau (Scharlau, Alemania) el proceso se realizó según la Ilustración 13, para esto se pesó 1 gramo de muestra tamizada en frascos ámbar por triplicado, se añadió 2 ml de solvente (n-Hexano, Etanol al 70 % y Alcohol absoluto), se dejó empapar la muestra por 1 minuto y se añadió 6 ml de solvente, posteriormente esta mezcla se llevó al ultrasonido Fisher Scientific FS60D (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) por un lapso de 45 minutos, se filtró el extracto

deseado y con la ayuda de una probeta se completó los 10 ml de solvente, se almacenó en viales ámbar de 10ml con tapa rosca a temperatura de 2°C a 8°C.

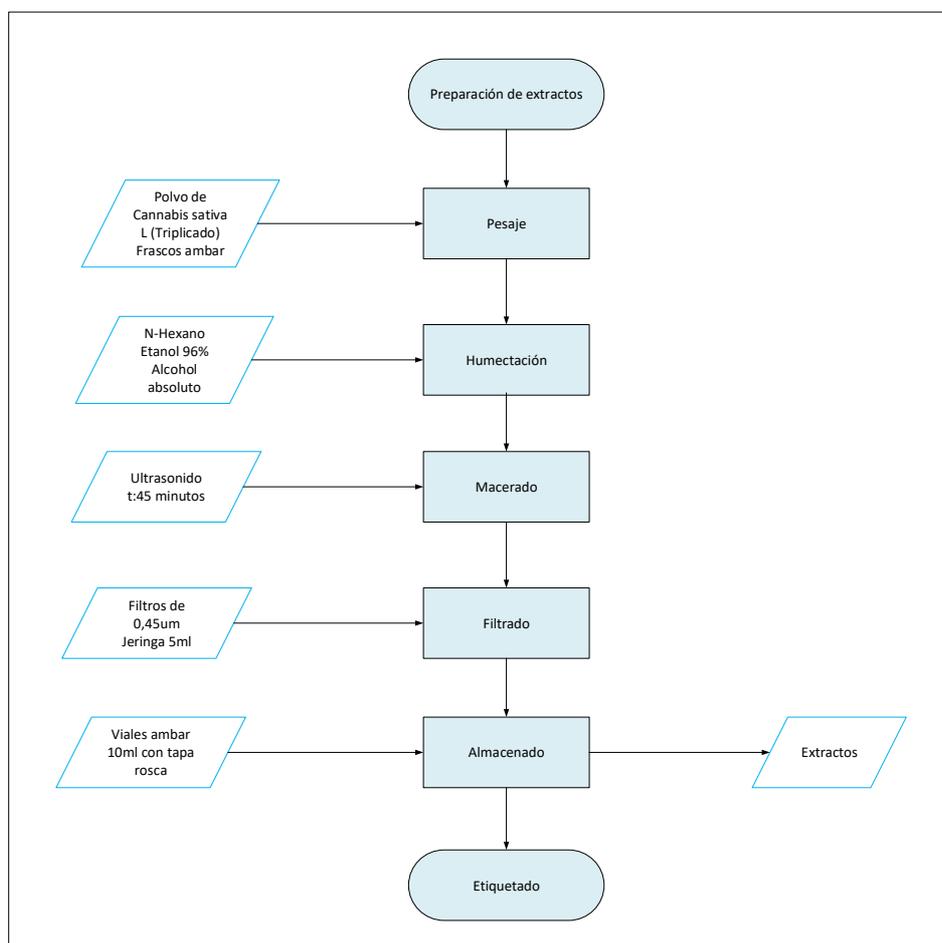


Ilustración 13 Maceración por ultrasonido

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

4.4 Cuantificación de CBD extraído

La cuantificación cromatográfica se lo realizó en los Laboratorios CENTROCESAL.Cía. Ltda., Situado en la ciudad de Quito en la Avenida América N31-232 y Avenida Mariana de Jesús.

Para el análisis de CBD se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia DIONEX, posee una bomba modelo LPG-3400SD, un auto muestreador modelo WPS_3000, componente de columna modelo TCC-3200SD y un detector modelo

DETECTOR DAD-3000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La metodología de referencia utilizada es de Backer et al (2009), con algunas modificaciones.

Se utilizó una columna Phenomenex Hyperclone (Phenomenex Inc, Estados Unidos) de una longitud de 150 mm por un diámetro de 4,6 mm, de 120Å con tamaño de poro de 5 µm; la fase móvil empleada es Acetonitrilo Merck (Merck, Alemania), Agua tipo 1 y Ácido Acético glacial Merck (Merck, Alemania) a una proporción de 79:21:0,1 respectivamente; además se estableció una longitud de onda de 220 nm, flujo de 1 ml/min, con un volumen de inyección de 20 µl, a una temperatura de columna de 35 °C, el tiempo de corrida fue de 30 minutos y el tiempo de retención de CBD es de 9,445 min ± 0,9445min.

Se realizó la curva de calibración con estándar mix de referencia Nsi lab solution (Nsi lab solution, Estados Unidos) para lo cual se utilizaron las siguientes concentraciones, como se muestra en la Tabla 2:

Concentraciones	Factor de dilución
0,0025 mg/ml	$(1/10) * (0,5/10) / 1000$
0,0050 mg/ml	$(1/10) * (1/10) / 1000$
0,0126 mg/ml	$(1/10) * (2,5/10) / 1000$
0,0251 mg/ml	$(1/10) * (5/10) / 1000$

Tabla 2 Concentración de CBD con su respectivo factor de disolución

Fuente: (Andrango & Velásquez, 2022)

Para la preparación del estándar se colocó 1,0 ml del material de referencia (CBDA, CBG, CBD, CBN, D9-THC, Y THCA) en un balón aforado de 10,0 ml, se adicionó 5,0 ml de disolvente (Metanol Merck (Merck, Alemania) y Agua tipo 1 en una proporción de 80: 20 respectivamente) y se sonicó en el ultrasonido Brain bee, DUC-3110 (BRAIN BEE, Italia) por 5 min; se enfrió, se aforó con el disolvente; Dependiendo de la concentración de la curva de calibración se realizaron alícuotas adicionales como se muestra en la Tabla 2, finalmente se pasó a través de un filtro con tamaño de poro de 0,45µm y se inyectó en viales para HPLC; este proceso se

detalla en la ilustración 14. De cada concentración de la curva de calibración se preparó por duplicado.

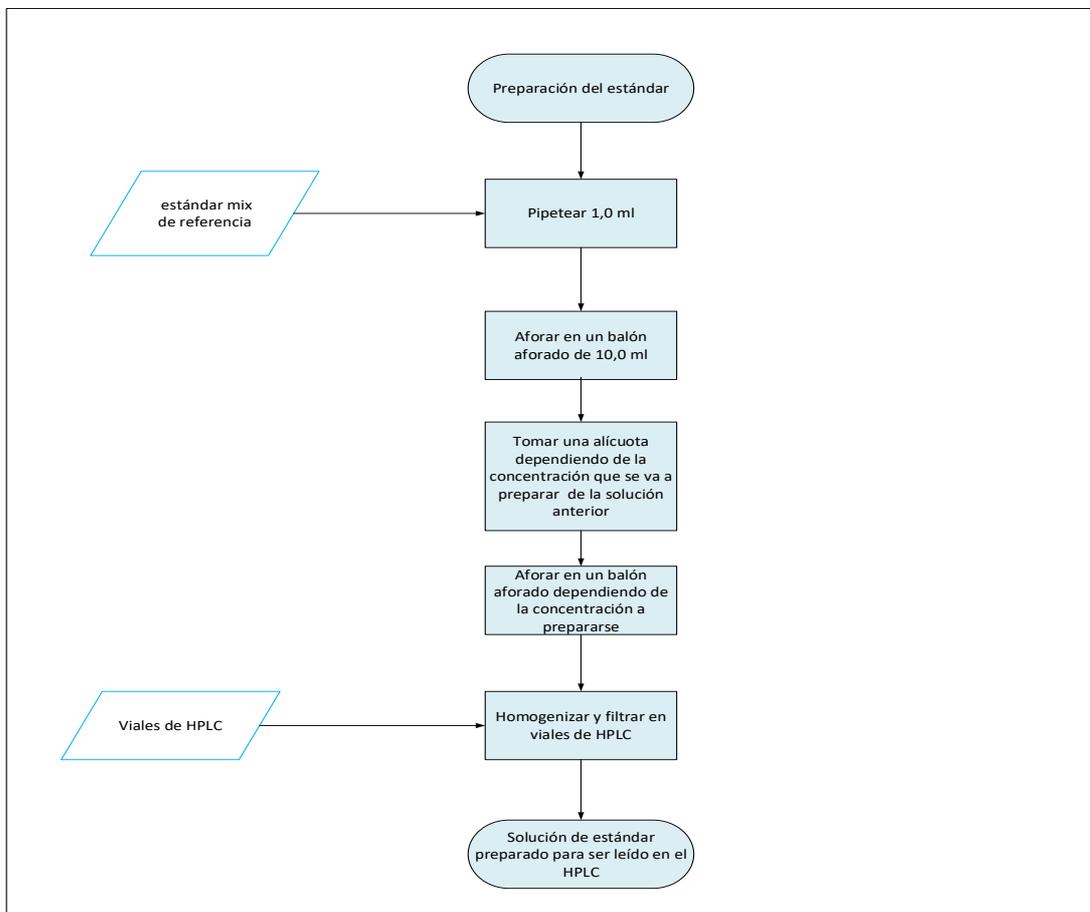


Ilustración 14 Preparación del Estándar

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

Para el cálculo de la concentración del estándar se aplicó la siguiente ecuación 2:

$$C_{St} = \frac{W_{st}}{10} \times \frac{a}{A} \times \frac{100 - \%H}{100} \times \frac{P_{st}}{100}$$

Ecuación 2

Dónde:

W_{st} → *Peso del estándar (mg).*

P_{st} → *Pureza del estándar (%).*

$\%H$ → *Porcentaje de humedad del estándar.*

C_{st} → *Concentración del estándar (mg/ml).*

a → *Alícuota (depende de la concentración a preparar).*

A → *Aforo (depende de la concentración a preparar).*

Para la preparación de la muestra se pesó en la balanza micro analítica Radwag AS 82/220.x2 (Radwag, Polonia) 1000 mg o un 1,0 ml del extracto de cannabis en un balón aforado de 50,0 ml, se adicionó 30,0 ml de disolvente y se sonicó por 5 minutos, se dejó enfriar y se aforó con disolvente (Metanol y Agua tipo 1 en una proporción de 80: 20 respectivamente). De la solución anterior se tomó una alícuota de 2,0 ml en un balón aforado de 25,0 ml y se aforó con disolvente, finalmente se pasó a través de un filtro con tamaño de poro de 0,45 μ m y se inyectó en viales para HPLC; este proceso se detalla en la ilustración 15. De cada muestra se preparó por duplicado.

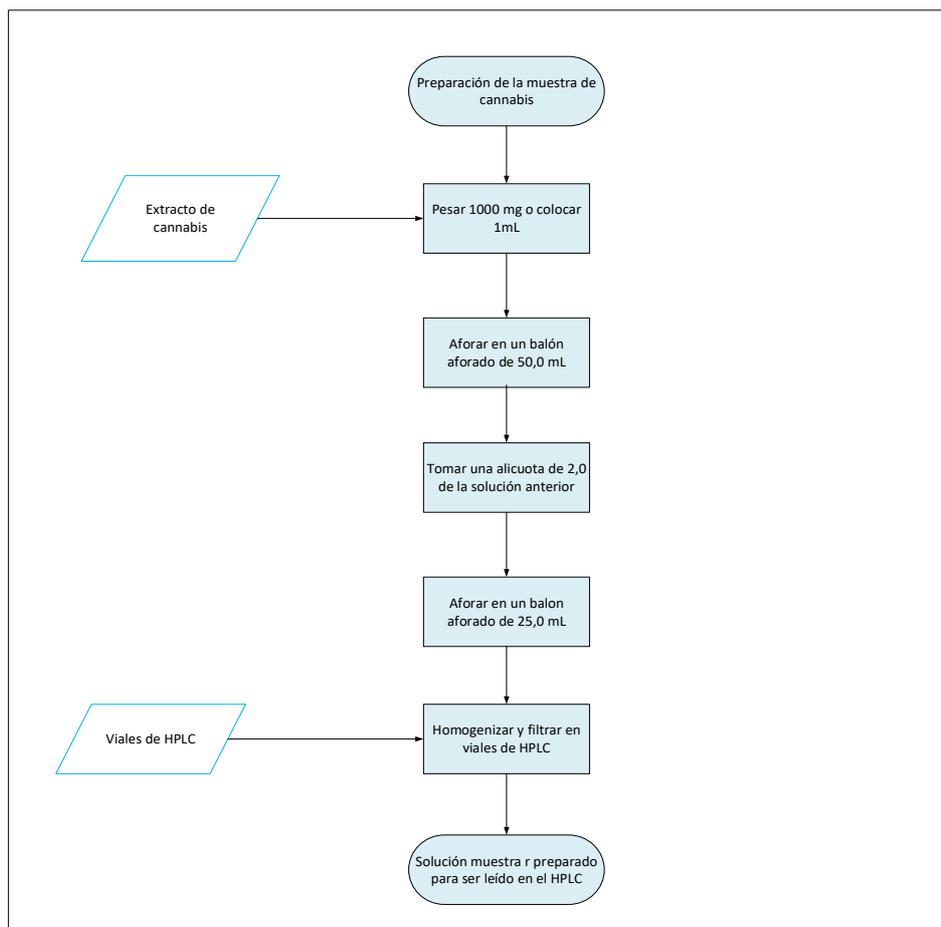


Ilustración 15 Preparación de la muestra

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

Tomar en consideración que, una vez acondicionado el sistema cromatográfico, se inyectó primero la curva de calibración y se calculó la desviación estándar con la ecuación 3 y el coeficiente de variación con la ecuación 4, entre inyecciones de la misma concentración el coeficiente de variación no debe ser mayor a 2,0%, Además, cada 10 (diez) inyecciones de ensayo se debe inyectar un estándar de control, de concentración de 0,0126 mg/ml, el coeficiente de variación entre todos los estándares debe ser menor o igual al 2,0%.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Ecuación 3

Donde:

$S \rightarrow$ Desviación estandar

$X_i \rightarrow$ Número iésimo

$\bar{X} \rightarrow$ Promedio

$n \rightarrow$ Número de datos

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

Ecuación 4

Donde:

$CV \rightarrow$ Coeficiente de variación

$\bar{X} \rightarrow$ Promedio

$S \rightarrow$ Desviación estandar

Para el cálculo de la concentración de la muestra se aplicó la siguiente ecuación 5:

$$C_{Mt} = \frac{W_{Mt}}{50} \times \frac{2}{25}$$

Ecuación 5

Donde:

$W_{Mt} \rightarrow$ Peso de la muestra (mg).

$C_{Mt} =$ Concentración de la muestra (mg/ml).

Además, se calculó la concentración de CBD presente en la muestra, para lo cual se aplicó la ecuación 6.

$$mg\ CBD = \frac{A_{Mt} \times C_{StS}}{A_{St} \times C_{Mt}}$$

Ecuación 6

Dónde:

A_{Mt} → Área de la muestra.

A_{St} → Área del estándar.

C_{StS} → Concentración del estándar (mg/ml).

C_{Mt} = Cóncentración de la muestra (mg/ml).

4.5 Análisis Estadístico

La evaluación estadística se realizó con el programa prisma 8, para analizar los datos y determinar si existen diferencias entre métodos de extracción y entre solventes utilizados, las pruebas estadísticas utilizadas son:

Análisis de ANOVA de dos factores con varias muestras: Las variables utilizadas para el análisis de ANOVA fueron: las variables independientes métodos de extracción (maceración dinámica y ultrasonido) y solventes utilizados (n-Hexano, Alcohol absoluto y Etanol al 70 %), y la variable dependiente porcentaje de Cannabidiol obtenido, con tres repeticiones para cada solvente utilizado de cada metodología de extracción, se consideró el nivel de significancia de 0,05.

Para el análisis e interpretación de datos se realizó el cumplimiento de la distribución normal por medio de Shapiro-Wilks $p > 0,05$ y homogeneidad de varianza (Prueba t no pareada), además, se procedió a realizar la prueba de Tukey en la cual se comparó las diferencias entre cada método de extracción y solventes utilizados.

5 Resultados y discusión

Los resultados de caracterización del material vegetal y la cuantificación del Cannabidiol tanto para la extracción por maceración dinámica como para la extracción por ultrasonido con los tres diferentes solventes se presentan a continuación.

5.1 Caracterización del material vegetal

Para la caracterización del material vegetal se tomó en consideración las características organolépticas, la determinación de humedad y cenizas tal como se muestra en la tabla 3.

PARÁMETRO		UNIDADES	RESULTADO
ORGANOLÉPTICO	Aspecto	N/A	Polvo fino
	Color	N/A	Café verdoso
	Textura	N/A	Blando
	Olor	N/A	Característico
FÍSICOS	Cenizas	%	1,88 ± 0,05
	Humedad	%	12,19 ± 0,32

Tabla 3 Caracterización del material vegetal

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

Los resultados obtenidos son valores característicos propios del material vegetal. Según Conor (2023) la humedad obtenida en sus análisis fue de 5,44% muy por debajo del valor obtenido en este estudio que es de 12,19 %, por lo cual es de suma importancia el secado y la descarboxilación del material vegetal, previo a la extracción para obtener mejores resultados en la cuantificación del cannabidiol como lo menciona Ribeiro-Grijo et al. (2019), el proceso de descarboxilación utilizado por Ribeiro fue de 140°C a 30 minutos y como resultado obtuvo un incremento del 1 % en el contenido de CBD en comparación con la extracción sin descarboxilación; la metodología usada en este estudio varía en el valor de la temperatura ya que se lo realizó a 110 °C.

5.2 Cuantificación de CBD extraído en los diferentes métodos de extracción

La cuantificación de Cannabidiol (CBD) fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución, se utilizó un estándar mix de referencia y esta cuantificación se realizó tanto a las muestras obtenidas en el método de extracción por maceración dinámica y en el método de extracción por ultrasonido como para todos los solventes utilizados; para lo cual se realizó una curva de calibración previo al análisis de las muestras, los resultados obtenidos se exponen a continuación.

a. Curva de calibración del Cannabidiol

En la tabla 4 se muestran las áreas obtenidas en cada concentración preparada y tiempo de retención, adicional se calculó el coeficiente de variación de cada concentración.

Concentración (µg/ml)	Área (mAU*min)	Promedio (mAU*min)	Desviación estándar	Coficiente de variación (%)	Tiempo de retención
0,0025	3,252	3,256	0,006	0,174	9,430
	3,260				9,433
0,0050	7,750	7,769	0,026	0,337	9,433
	7,787				9,437
0,0126	15,286	15,306	0,028	0,180	9,437
	15,325				9,437
0,0251	31,460	31,561	0,142	0,450	9,437
	31,661				9,400
Promedio del tiempo de retención					9,431
Desviación Estándar					0,013
Coficiente de variación (%)					0,14

Tabla 4 Datos obtenidos para la curva de calibración

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

Según la USP 43, capítulo <621> cromatografía líquida (2022), estipula que el coeficiente de variación debe ser menor o igual al 2,0 %, por lo tanto, en cada concentración de la curva de calibración el porcentaje de coeficiente de variación

es menor al estipulado siendo el más alto el 0,450% de la concentración de 0,0251 mg/ml.

El promedio del tiempo de retención de los estándares es de $9,431 \pm 0,013$ y el promedio del tiempo de retención de las muestras obtenidas por Maceración dinámica fue de $9,448 \pm 0,002$ y el promedio del tiempo de retención de las muestras obtenidas por Maceración por ultrasonido fue de $9,458 \pm 0,018$, de acuerdo a las Tablas No 4, 5, 6 se puede evidenciar que el porcentaje del coeficiente de variación es menor al 2% cumpliendo con el criterio de aceptación establecido en la USP, por esta razón tanto el tiempo de retención de las muestras es igual al tiempo de retención del estándar relacionado al metabolito Cannabidiol.

Además, el coeficiente de correlación nos indica que, en el rango de concentraciones analizadas, el método se comporta de manera lineal, es decir se apega a la ecuación de la recta $y = ax + b$, siendo que el valor es 0.9963 muy cercano a 1 cumpliendo con lo estipulado. En la ilustración 16 se muestra la curva de calibración con su respectiva ecuación de la recta y el valor del coeficiente de correlación.

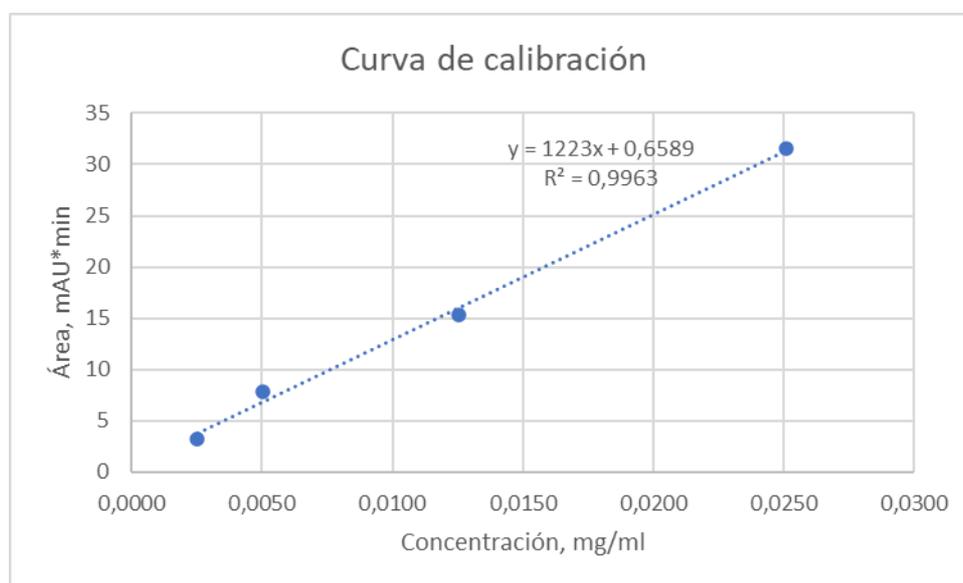


Ilustración 16 Curva de calibración del Cannabidiol

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

b. Concentración de Cannabidiol por Maceración dinámica

La concentración de Cannabidiol, fueron determinados por cromatografía líquida de alta resolución, empleando estándar mix de referencia, para lo cual se obtuvieron los siguientes resultados:

- Con el método de extracción de Cannabidiol por maceración dinámica el mejor resultado fue obtenido con el solvente n-Hexano ($7,76\% \pm 0,18\%$), seguido por el Alcohol Absoluto ($6,97\% \pm 0,48\%$) y finalmente, el solvente Etanol al 70% ($6,63\% \pm 0,50\%$), como se muestra en la tabla 5.

	Etanol al 70%			Alcohol absoluto			n- Hexano		
	Área (mAU*min)	Tiempo de retención	% de Cannabiol,CBD	Área (mAU*min)	Tiempo de retención	% de Cannabiol,CBD	Área (mAU*min)	Tiempo de retención	% de Cannabiol,CBD
Maceración dinámica	9,334	9,440	5,98	11,535	9,443	7,32	12,425	9,453	7,87
	9,347	9,440	5,99	11,529	9,447	7,32	12,443	9,453	7,88
	10,940	9,443	6,95	9,907	9,447	6,34	12,417	9,453	7,88
	10,948	9,443	6,96	9,920	9,447	6,35	12,418	9,453	7,88
	10,897	9,447	6,95	11,561	9,450	7,25	11,953	9,453	7,53
	10,902	9,443	6,95	11,558	9,450	7,24	11,940	9,453	7,52
Promedio	10,395	9,443	6,63	11,002	9,447	6,97	12,266	9,453	7,76
Desviación estándar	0,817	0,003	0,50	0,843	0,003	0,49	0,248	0,000	0,18
Promedio del tiempo de retención de Maceración Dinámica							9,448		
Desviación estándar del promedio de retención de Maceración Dinámica							0,002		
Coefficiente de variación (%)							0,02		

Tabla 5 Rendimiento de extracción de Cannabidiol por medio de maceración dinámica

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

En la ilustración 17 se muestra las diferencias con cada solvente utilizado en la maceración dinámica siendo estas entre Etanol al 70% vs Alcohol Absoluto 0,04%, Alcohol Absoluto vs n-Hexano 0,79%, Etanol al 70 % vs n-Hexano 1,13%.

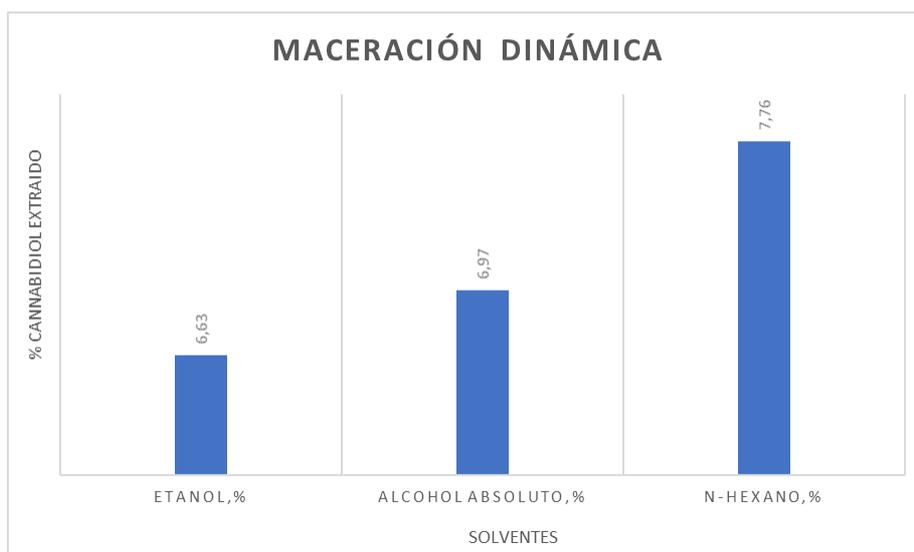


Ilustración 17 Variación de porcentaje entre solventes

Fuente: (Andrango & Velásquez, 2022)

Según Moreno-Sanz et al., en el 2020 evidenciaron que los rendimientos de extracción de cannabinoide con etanol fueron ligeramente mayores que con n-hexano en diez variedades de cannabis, sin embargo, en el presente estudio se concentró únicamente en el compuesto CBD demostrándose que el proceso de recuperación del compuesto con n-hexano es sutilmente superior al etanol absoluto.

El uso del n-Hexano como solvente para los procesos de extracción es muy bueno debido a su fácil manejo, bajo punto de ebullición, densidad aceptable y a la afinidad de la molécula a ser extraído sin embargo según (ATSDR, 2016) es una sustancia nociva para la salud que causa daños al sistema nervioso y en concentraciones elevadas tienen efecto narcotizante, parálisis, disfunciones cardíacas y respiratorias por lo tanto los procesos de purificación y eliminación del solvente deben estar acordes a parámetros determinados por entidades de alta vigilancia como FDA, EMA u farmacopeas oficiales como punto de determinación de solventes residuales.

c. Concentración de Cannabidiol por Maceración por ultrasonido

La concentración de Cannabidiol, fueron determinados por cromatografía líquida empleando estándar mix de referencia, para lo cual se obtuvieron los siguientes resultados:

- El porcentaje de Cannabidiol mayor con el método de extracción de maceración por ultrasonido fue con el solvente n-Hexano ($7,27 \pm 0,23$), seguido del Alcohol Absoluto ($6,84 \pm 0,24$), finalmente, el porcentaje más bajo fue con el solvente Etanol al 70% ($6,73 \pm 0,15\%$), como se muestra en la tabla 6.

	Etanol al 70%			Alcohol absoluto			n- Hexano		
	Área (mAU*min)	Tiempo de retención	% de Cannabiol,CBD	Área (mAU*min)	Tiempo de retención	% de Cannabiol,CBD	Área (mAU*min)	Tiempo de retención	% de Cannabiol,CBD
Maceración por ultrasonido	11,184	9,457	6,75	11,208	9,457	7,13	11,394	9,45	7,26
	11,12	9,457	6,71	11,187	9,453	7,12	11,377	9,45	7,25
	10,264	9,457	6,56	10,677	9,453	6,81	11,857	9,45	7,54
	10,268	9,457	6,56	10,696	9,45	6,82	11,859	9,45	7,54
	10,824	9,457	6,89	10,787	9,453	6,59	11,008	9,45	7,04
	10,82	9,457	6,9	10,81	9,457	6,6	10,973	9,53	7,01
Promedio	10,747	9,457	6,73	10,894	9,454	6,84	11,411	9,463	7,27
Desviación estándar	0,401	0,000	0,15	0,241	0,003	0,24	0,389	0,033	0,23
Promedio del tiempo de retención de Maceración por Ultrasonido							9,458		
Desviación estándar del promedio de retención de Maceración por Ultrasonido							0,018		
Coefficiente de variación (%)							0,19		

Tabla 6 Porcentaje de Cannabidiol por medio de maceración por ultrasonido

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

En la Ilustración 18 se muestra las diferencias con cada solvente utilizado en la maceración dinámica siendo estas entre Etanol al 70% vs Alcohol Absoluto 0,11%, Alcohol Absoluto vs n-Hexano 0,43%, Etanol al 70% vs n-Hexano 0,54%

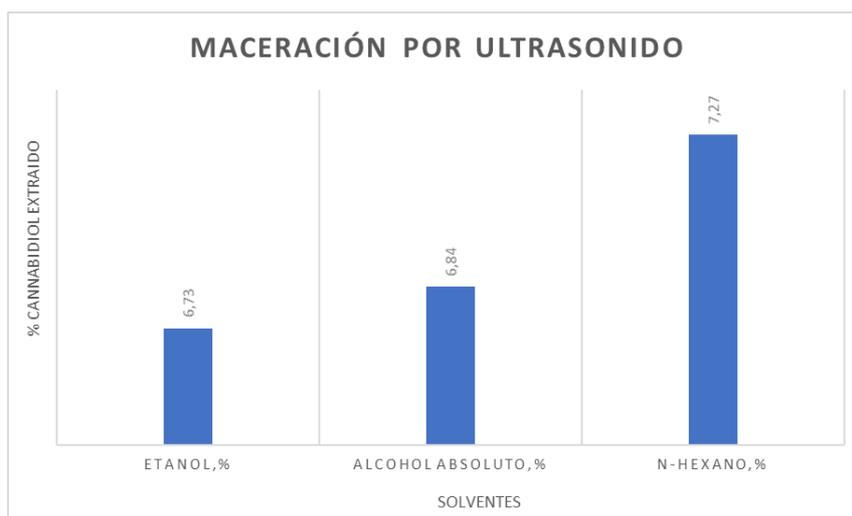


Ilustración 18 Variación de porcentaje entre solventes por ultrasonido

Fuente: (Andrango & Velásquez, 2022)

En la lustración 19 se muestra los porcentajes de CBD obtenidos en los métodos de extracción comparados con el porcentaje de CBD declarados en el certificado de análisis del proveedor en el cual se evidencia que los solventes utilizados por medio de maceración dinámica y ultrasonido cumplen con la función de extraer el Cannabidiol.

La concentración de metabolitos en el Cannabis depende de muchos factores como la variedad de la planta, tiempo de cosecha, condiciones ambientales, condiciones de almacenamiento, nutrientes por lo tanto el uso adecuado de solventes y los métodos de extracción son cruciales para la obtención de rendimientos óptimos sin embargo se requiere conocer el uso adecuado de solventes para poder disolver los tricomas de Cannabis tomando en consideración la propiedades fisicoquímicas, seguridad, accesibilidad y disponibilidad. La obtención de los diferentes porcentajes de Cannabidiol en los diferentes solventes es debido a la polaridad del solvente por lo tanto para la molécula de acuerdo a su afinidad de mayor a menor concentración fue del n-hexano, seguido del Alcohol absoluto y finalmente del Etanol sin embargo para el estudio realizado con fines investigativos y de apoyo a las microempresas el Etanol puede ser un solvente que cumpla las características fisicoquímicas, de seguridad y disponibilidad del mercado a precios accesibles y que no sean peligrosos

al medio ambiente ni al consumidor cuando este se encuentre en forma de medicamento, alimento, cosmético.

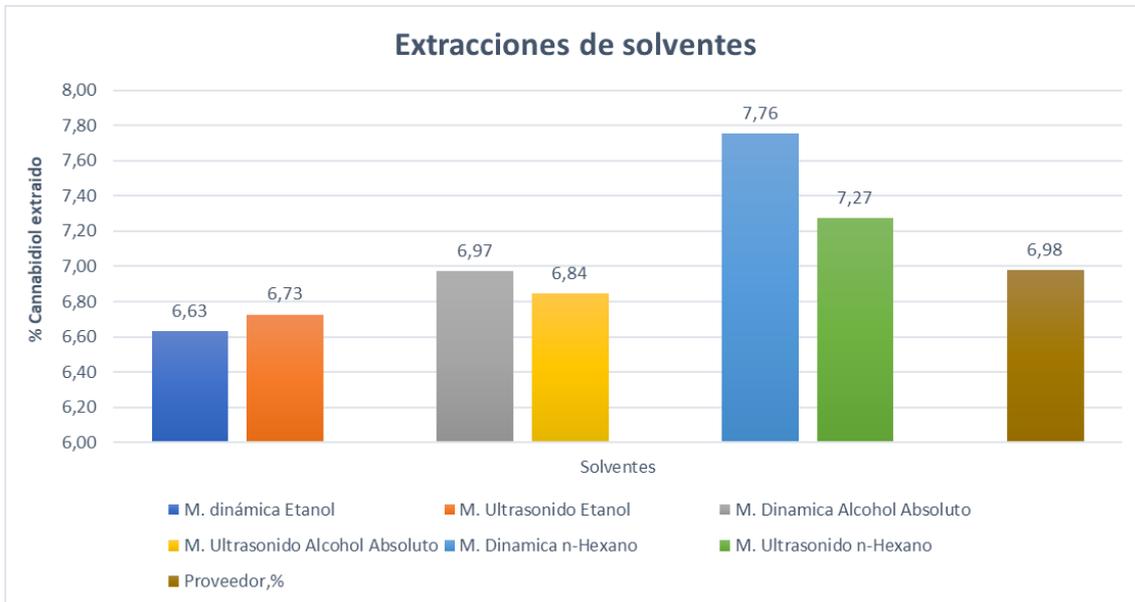


Ilustración 19 Comparación entre métodos de extracción y tipos de solventes

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

5.3 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con varias muestras por grupo para determinar la existencia de diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% el cual nos permitió estudiar conjuntamente los efectos del tipo de solvente, tipo de extracción y su respectiva interacción. Para comprobar la distribución normal del ANOVA se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilks, con el siguiente criterio de aceptación $p > 0,05$ y homogeneidad de varianza, además, se procedió a realizar la prueba de Tukey en la cual se comparó las diferencias entre cada método de extracción y solventes utilizados.

Los resultados presentados en las siguientes tablas se obtienen de la aplicación de Prisma 8.

En la tabla 7 se presenta los resultados obtenidos del análisis de ANOVA determinando el valor de P tanto para las interacciones, solventes y métodos de extracción.

ANOVA	Suma de cuadrados,SS	Grados de libertad,DF	Promedio de los cuadrados, MS	F (DFn,DFd)	Valor P
Interacción	0,523	2	0,261	F(2, 30)= 2,41	P=0,11
Solventes	4,500	2	2,250	F(1, 30)= 20,70	P<0,001
Método de extracción	0,264	1	0,264	F(2, 30)= 2,43	P=0,13
Residual	3,260	30	0,109		

Fuente de variación	% de Variación total	Valor P	Resumen Valor P	Significancia?
Interacción	6,12	0,11	Ns	No
Solventes	52,70	<0,001	***	Si
Método de extracción	3,09	0,13	Ns	No

Tabla 7. Resultados del análisis de varianza ANOVA de dos vías de los porcentajes de Cannabidiol extraídos

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

El análisis estadístico ANOVA de dos vías proporcionó como resultado la diferencia significativa en solventes debido a $P < 0,001$ por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa, mientras que para los métodos de extracción y las interacciones entre solventes y métodos de extracción no existe diferencia significativa, por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Según Moreno-Sanz et al., en el 2020 menciona que esta diferencia en solventes se debe a la polaridad ya que el Cannabis no solo contiene Cannabinoides sino también flavonoides siendo estos mas afines al etanol ya que son compuestos polares en cambio que los Cannabinoides son apolares como el n-Hexano concordando con esta investigación.

Para determinar si el análisis de varianza presenta una distribución normal y es homogénea se realizaron las siguientes pruebas:

Prueba de Shapiro-Wilk, como detalla en la tabla 8.

Prueba de Shapiro-Wilk	M. Ultrasonido	M. Dinámica
W	0,9017	0,9498
Valor P	0,3909	0,5684
¿Pasó la prueba de normalidad (alfa=0,05)?	Si	Si
Resumen de Valor P	No significativo	No significativo

Tabla 8 Test de Normalidad de Shapiro-Wilk

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

Como resultado se obtuvo una distribución normal en maceración por ultrasonido $P=0,3909$ y maceración dinámica $P=0,5684$ siendo estos valores mayores a $0,05$ aceptando la hipótesis nula de la normalidad

Prueba de Homogeneidad de Varianza, como detalla en la tabla 9.

Prueba t no pareada	
Valor P	0,6706
Resumen de Valor P	No significativo
¿Significativamente diferente ($P < 0.05$)?	No
¿Valor de P de una o dos colas?	2 Colas
t, df	t=0,4582, df=4

Tabla 9 Prueba t no pareada

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

Como resultado se obtuvo una distribución homogénea de la varianza $p=0,6706$ siendo estos valores mayores a $0,05$ aceptando la hipótesis nula de la homogeneidad

Debido al cumplimiento de la distribución normal y homogeneidad de varianza se realizó la prueba paramétrica de comparaciones múltiples de Tukey acorde a la tabla 10, en la cual nos indica las diferencias significativas entre solventes y métodos de extracción siendo criterio de aceptación $p < 0,05$.

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Dif Media	95,00% CI de dif.	Significativa ?	Resumen	Valor P ajustado
M. Ultrasonido					
Etanol 70% vs. Alcohol Absoluto	-0,1167	-0,5855 a 0,3522	No	No significativo	0,8139
Etanol 70% vs. n-Hexano	-0,545	-1,014 a -0,07615	Yes	*	0,02
Alcohol Absoluto vs. n-Hexano	-0,4283	-0,8972 a 0,04051	No	No significativo	0,0786
M. Dinámica					
Etanol 70% vs. Alcohol Absoluto	-0,34	-0,8088 a 0,1288	No	No significativo	0,1908
Etanol 70% vs. n-Hexano	-1,13	-1,599 a -0,6612	Yes	****	<0,0001
Etanol Absoluto vs. n-Hexano	-0,79	-1,259 a -0,3212	Yes	***	0,0007

Tabla 10 Pruebas de comparación múltiples

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

Se puede corroborar que los solventes empleados son estadísticamente diferentes independientemente del método de extracción, se puede comparar que la diferencia significativa es entre el solvente n-hexano vs Etanol 70% y Alcohol absoluto, mientras que entre Etanol 70% y Alcohol absoluto no existe diferencia.

En la tabla 11 se presenta los costos de operación en la cual se evidencia que al comparar el Alcohol absoluto con el n-Hexano la diferencia es de 0,18 dólares/gramo de material vegetal en maceración dinámica en relación a Alcohol absoluto y 0,01 dólares/gramo de material vegetal en maceración por ultrasonido en relación a n-Hexano.

	Maceración dinámica			Maceración por ultrasonido		
	Etanol 70%	Alcohol Absoluto	n-Hexano	Etanol 70%	Alcohol Absoluto	n-Hexano
Costo solvente, 10ml,\$	0,02	0,04	0,35	0,02	0,04	0,35
Costo Cannabidiol/ 1 g Material vegetal,\$	5,24	4,99	4,49	5,16	5,08	4,78
Costo total, \$	5,26	5,03	4,84	5,18	5,12	5,13

Tabla 11 Análisis de costos por solvente por gramo de material vegetal

Fuente: (Andrango & Velásquez,2022)

Sin embargo para el estudio realizado con fines investigativos y de apoyo a las microempresas el Alcohol absoluto puede ser un solvente que cumpla las características fisicoquímicas, de seguridad y disponibilidad del mercado que no sean peligrosos al medio ambiente ni al consumidor cuando este se encuentre en procesado como producto terminado.

6 Conclusiones

Mediante la identificación del material vegetal se estableció los siguientes parámetros organolépticos aspecto, color, textura y olor; además de la caracterización de los parámetros físicos cenizas y humedad de 1,88% y 12,19% respectivamente.

Los análisis realizados para la cuantificación de metabolitos extraídos a partir de la *Cannabis sativa L.*, mediante HPLC dio como resultado que la utilización de la fase móvil Acetonitrilo, Agua tipo 1 y Ácido Acético (79:21:0.1), y como diluyente Metanol y agua tipo 1(80:20), permitiendo hallar uno de los metabolitos principales de *Cannabis sativa L* como es Cannabidiol.

La cuantificación de Cannabidiol en los extractos realizados por maceración dinámica y ultrasonido utilizando solventes Etanol 70%, Alcohol absoluto, n-Hexano estableció que las muestras de mayor concentración de metabolito extraído pertenecen a las soluciones obtenidas por maceración Dinámica utilizando el solvente n-Hexano con un porcentaje del 7,76%.

De acuerdo a los resultados obtenidos por los métodos de extracción y con el fin de obtener procesos que puedan ser replicados a microempresas se puede concluir que el mejor solvente a utilizar en la extracción de Cannabidiol es en Alcohol absoluto debido a que no presenta diferencia significativas con el n-Hexano en relación al porcentaje de extracción en la maceración por ultrasonido, además se evaluó el tiempo de operación siendo el mejor método a utilizar el método de extracción por ultrasonido.

7 Recomendaciones

Realizar una investigación utilizando diferentes periodos vegetativos de *Cannabis sativa L.* para determinar la mejor estación de recolección de la muestra para la obtención de Cannabidiol. De esta forma se podría mejorar los rendimientos de Cannabidiol.

Desarrollar estudios de solventes residuales mediante Cromatografía de gases para la identificación de impurezas al momento de extracción con solventes orgánicos debido a que los metabolitos presentes en *Cannabis sativa L.* tienen afinidad a solventes apolares. De esta forma se podría conocer los demás componentes presentes en la planta.

Realizar otras variantes al método de extracción como calor al momento de la aplicación del ultra sonido, ajustes de pH, taponamiento de la solución, entre otros a diferentes tiempos, para poder evidenciar si se encuentra alguna variación favorable al momento de obtener el compuesto aislado.

Validar el método analítico para la cuantificación de Cannabidiol para confirmar que el procedimiento analítico utilizado sea adecuado para el uso.

8 Referencias

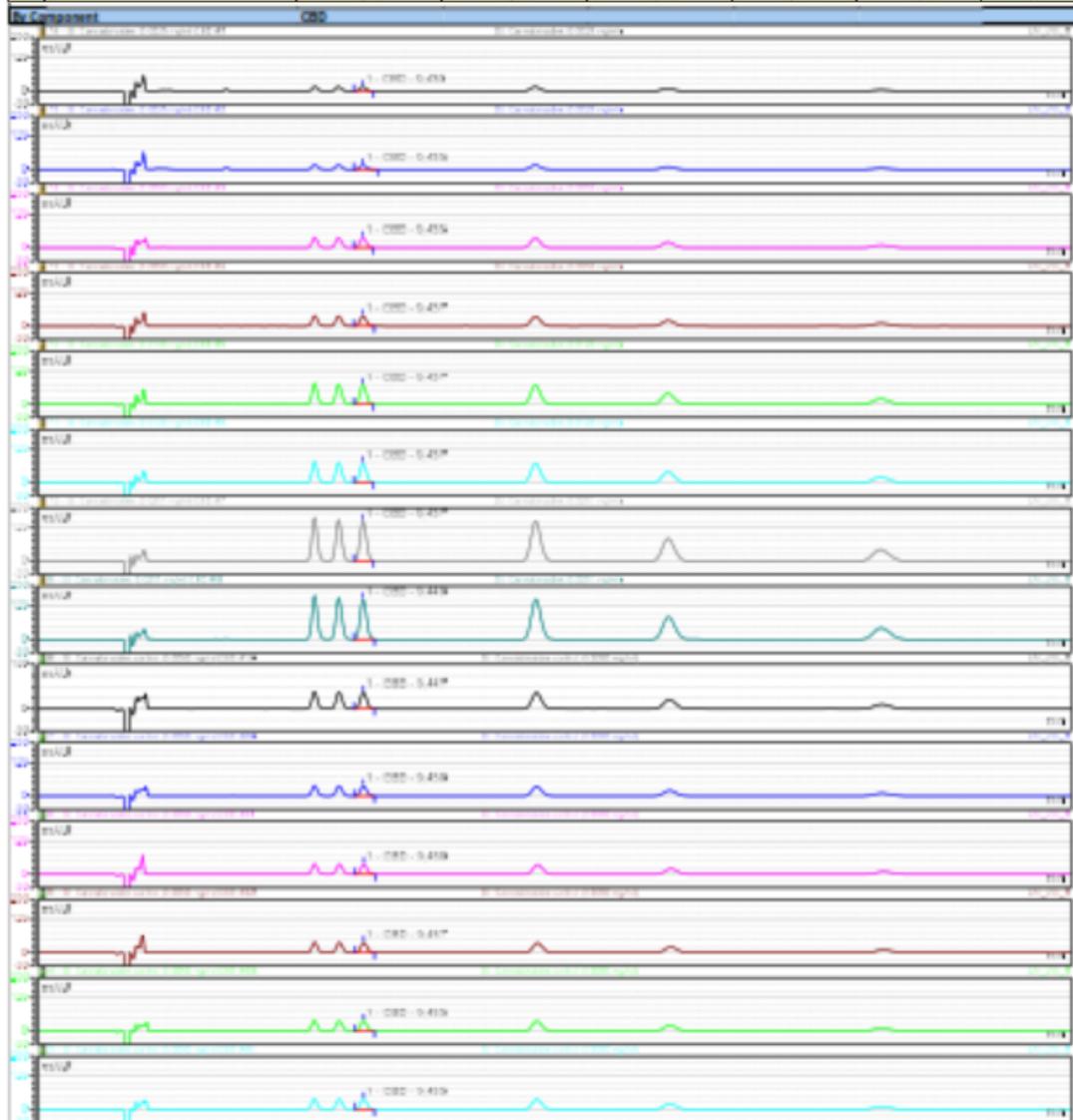
- Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria. (2021). Resolución arcsa-de-002-2021-mafg, normativa técnica sanitaria para la regulación y control de productos terminados de uso y consumo humano que contengan cannabis no psicoactivo o cáñamo, o derivados de cannabis no psicoactivo o cáñamo.
- Asamblea Nacional de la República del Ecuador. (2019). Ley orgánica reformatoria al código orgánico integral penal. www.registroficial.gob.ec
- Andre, C., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*, 1-18.
- Astudillo, L. (2015). Dspace. Obtenido de Caracterización química cuantitativa de metabolitos secundarios en plantas medicinales: <http://ow.ly/BCXq301RcpR>
- Ayenigbara, G. (2012). Medical Utility of Cannabis Sativa. *IOSR Journal of Pharmacy*, 460-463.
- Alba, N. M. N., & Minchala, E. L. A. (2022). UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE CUENCA. Universidad Politécnica Salesiana.
- Backer, B., Debrus, B., Lebrun, P., Theunis, L., Dubois, N., Decock, L., Verstraete, A., Hubert, P., & Charlier, C. (2009). Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(32), 4115–4124. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.11.004>
- Biblioteca Nacional de Medicina. (11 de 05 de 2022). Biblioteca Nacional de Medicina. Obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cannabinol#section=EPA-DSSTox-Classification>
- Busardo, F., Pérez, A., Pacifici, R., Mannocchi, G., Gottardi, M., & Papaseit, E. (2021). Disposition of Phytocannabinoids, Their Acidic Precursors and Their Metabolites in Biological Matrices of Healthy Individuals Treated with Vaporized Medical Cannabis. *MDPI*, 1-14.
- Chandra, S., Lata, H., & Mahmoud, A. (2017). Cannabis sativa L.- Botany and Biotechnology. Suiza: Springer.

- DrugBank. (01 de Marzo de 2022). DrugBank. Obtenido de <https://go.drugbank.com/drugs/DB09061>
- ElSohly, M., & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. Elsevier, 539-548.
- Google maps. (08 de 2021). Google. Obtenido de <https://www.google.com/maps/place/Ka%C3%B1amu593/@0.0284628,-78.2450352,12z/data=!4m14!1m8!3m7!1s0x0:0x14167f4d55fa3845!2sKa%C3%B1amu593!8m2!3d0.0286324!4d-78.2067614!14m1!1BCglgAQ!3m4!1s0x0:0x14167f4d55fa3845!8m2!3d0.0286324!4d-78.2067614>
- Kathryn, N., Bisson, J., Singh, G., Graham, J., Chen, S.-N., Friesen, B., & Dahlin, J. (2020). The Essential Medicinal Chemistry of Cannabidiol (CBD). *Journal of Medicinal Chemistry*, 12137-12155.
- Linneo, C. v. (10 de 05 de 2022). Tropicos. Obtenido de <https://www.tropicos.org/name/21302042>
- Moreno-Sanz, G., Vera, C. F., Sánchez-Carnerero, C., Roura, X. N., & de Medina Baena, V. S. (2020). Biological Activity of Cannabis sativa L. extracts critically depends on solvent polarity and decarboxylation. *Separations*, 7(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/separations7040056>
- Patrim, M., & Bhattacharjee, M. (2020). Cannabis Scientific and Societal Relevance. *ResearchGate*, 1-124.
- Pubchem. (11 de 05 de 2022). Biblioteca Nacional de Medicina. Obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cannabigerol>
- Ranalli, P. (2021). *Advances in Hemp Research*. Nueva York: Food Products Press.
- Shakya, D., Upadhaya, S., Nuepane, H., & Subedi, R. (2021). Considerations for the Use of Medical Cannabis: An Overview of Benefits and Harms. *Biomedical Journal Of Scientific & Technical Research*, 28746-28753.
- Terence, N., & Gupta, V. (20 de 11 de 2021). National Library of Medicine, NHI. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563174/>

Anexo 2 Cromatogramas de estándares de Cannabidiol, CBD

Sequence Details			
Name:	CBD	Created On:	2022-04-23 12:23
Directory:	Instrument Data\HPLC\AÑO 2022\INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO\CBD	Created By:	PC
Data Vault:	ChromeleonLocal	Updated On:	2022/03/09 20:33
No. of Injections:	52	Updated By:	VF
St. S tacrolimus:	2025/10/01	Pureza:	100,00%
Fecha caducidad:		Agua:	N/A

By Component								
CBD								
No.	Injection Name	Ret.Time	Area	Height	Amount mgCBD/g	peak.amount	Weight	
		min	mAU*min	mAU	material vegetal	UV_VIS_1		
		UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1		
		CBD	CBD	CBD	CBD	CBD		
1	St. Cannabinoides (0.0025 mg/ml)	9.430	3.252	15.299	0.0021	0.21	1.00	
2	St. Cannabinoides (0.0025 mg/ml)	9.433	3.282	15.365	0.0021	0.21	1.00	
3	St. Cannabinoides (0.0050 mg/ml)	9.433	7.750	36.533	0.0050	0.50	1.00	
4	St. Cannabinoides (0.0050 mg/ml)	9.437	7.787	36.674	0.0050	0.50	1.00	
5	St. Cannabinoides (0.0126 mg/ml)	9.437	15.286	72.157	0.0098	0.98	1.00	
6	St. Cannabinoides (0.0126 mg/ml)	9.437	15.325	72.384	0.0098	0.98	1.00	
7	St. Cannabinoides (0.0251 mg/ml)	9.437	31.460	148.542	0.0200	2.00	1.00	
8	St. Cannabinoides (0.0251 mg/ml)	9.440	31.661	149.260	0.0202	2.02	1.00	
19	St. Cannabinoides control (0.0050 mg/ml)	9.447	7.868	37.177	0.0051	0.51	1.00	
20	St. Cannabinoides control (0.0050 mg/ml)	9.450	7.882	37.192	0.0051	0.51	1.00	
31	St. Cannabinoides control (0.0050 mg/ml)	9.460	7.984	37.615	0.0051	0.51	1.00	
32	St. Cannabinoides control (0.0050 mg/ml)	9.457	7.983	37.725	0.0051	0.51	1.00	
43	St. Cannabinoides control (0.0050 mg/ml)	9.453	8.085	38.269	0.0052	0.52	1.00	
44	St. Cannabinoides control (0.0050 mg/ml)	9.453	8.094	38.331	0.0052	0.52	1.00	
51	St. Cannabinoides control (0.0050 mg/ml)	9.457	8.077	38.335	0.0052	0.52	1.00	
52	St. Cannabinoides control (0.0050 mg/ml)	9.460	8.111	38.365	0.0052	0.52	1.00	
Average		9.445	11.243	53.076	0.007	0.72	1.00	
SD		0.011	8.539	40.286	0.005	0.54	0.00	
CV		0.112	75.948	75.901	75.350	75.35	0.00	



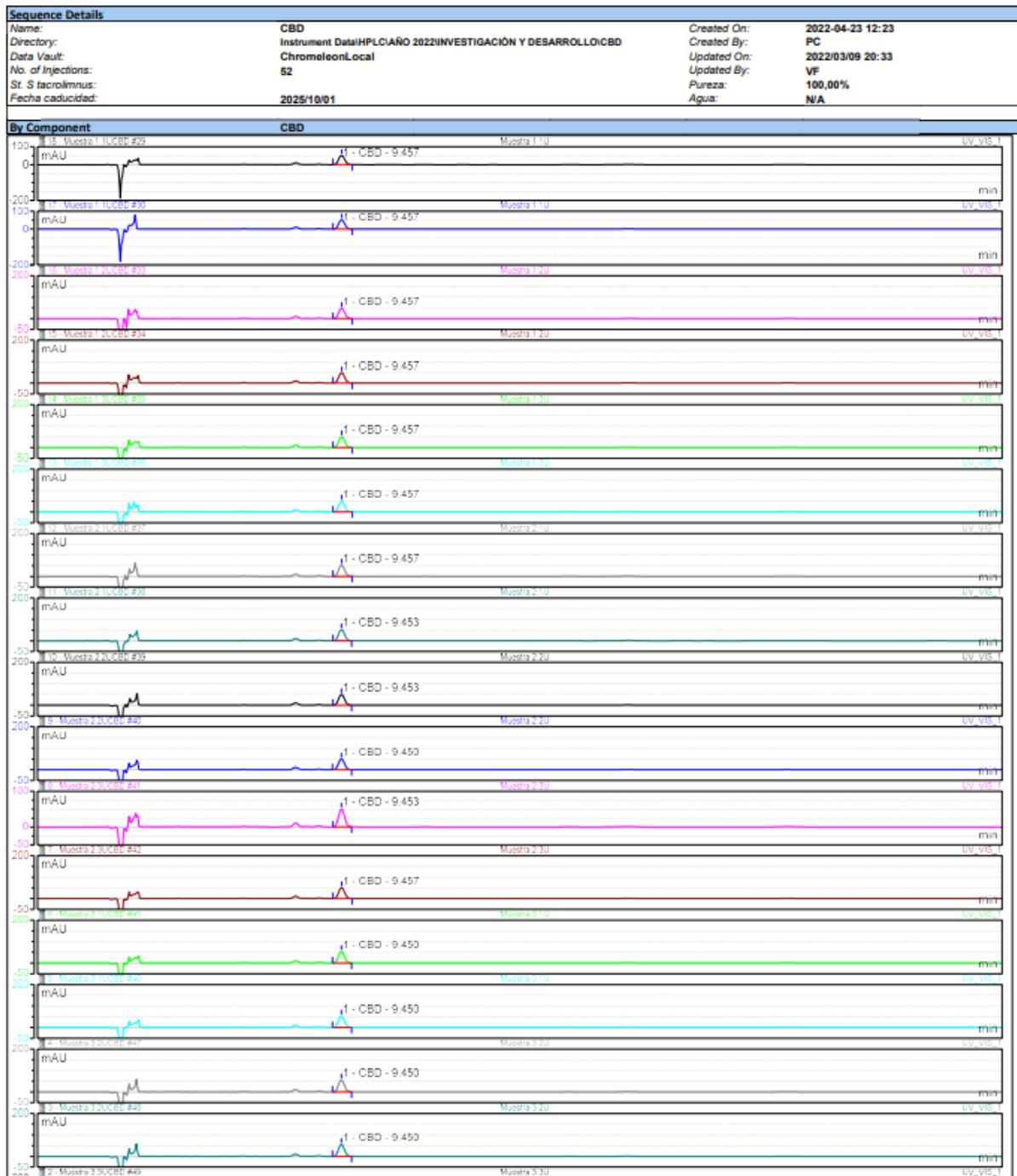
Anexo 3 Muestras de tratamientos de Cannabidiol, CBD

Sequence Details							
Name:	CBD			Created On:	2022-04-23 12:23		
Directory:	Instrument Data\HPLC\AÑO 2022\INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO\CBD			Created By:	PC		
Data Vault:	ChromleonLocal			Updated On:	2022/03/09 20:33		
No. of Injections:	52			Updated By:	VF		
St. S trolimus:				Pureza:	100,00%		
Fecha caducidad:	2025/10/01			Agua:	N/A		
By Component							
CBD							
No.	Injection Name	Ret.Time min	Area mAU*min	Height mAU	Amount mgCBD/g material vegetal	peak.amount	Weight
		UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	
		CBD	CBD	CBD	CBD	CBD	
9	Muestra 1.1M	9,440	9,344	43,790	0,0598	5,98	1001,30
10	Muestra 1.1M	9,440	9,347	43,795	0,0599	5,99	1001,30
11	Muestra 1.2M	9,443	10,940	51,272	0,0695	6,95	1007,20
12	Muestra 1.2M	9,443	10,948	51,311	0,0696	6,96	1007,20
13	Muestra 1.3M	9,447	10,897	51,102	0,0695	6,95	1003,80
14	Muestra 1.3M	9,443	10,902	51,103	0,0695	6,95	1003,80
15	Muestra 2.1M	9,443	11,535	54,069	0,0732	7,32	1008,30
16	Muestra 2.1M	9,447	11,529	54,039	0,0732	7,32	1008,30
17	Muestra 2.2M	9,447	9,907	46,480	0,0634	6,34	1000,80
18	Muestra 2.2M	9,447	9,920	46,472	0,0635	6,35	1000,80
21	Muestra 2.3M	9,450	11,561	54,158	0,0725	7,25	1021,10
22	Muestra 2.3M	9,450	11,558	54,146	0,0724	7,24	1021,10
23	Muestra 3.1M	9,453	12,425	58,166	0,0787	7,87	1010,40
24	Muestra 3.1M	9,453	12,443	58,256	0,0788	7,88	1010,40
25	Muestra 3.2M	9,453	12,417	58,154	0,0788	7,88	1008,60
26	Muestra 3.2M	9,453	12,418	58,122	0,0788	7,88	1008,60
27	Muestra 3.3M	9,453	11,953	55,972	0,0753	7,53	1016,30
28	Muestra 3.3M	9,453	11,940	55,846	0,0752	7,52	1016,30
29	Muestra 1.1U	9,457	11,184	52,268	0,0675	6,75	1060,70
30	Muestra 1.1U	9,457	11,120	51,984	0,0671	6,71	1060,70
33	Muestra 1.2U	9,457	10,264	47,905	0,0656	6,56	1002,90
34	Muestra 1.2U	9,457	10,268	48,110	0,0656	6,56	1002,90
35	Muestra 1.3U	9,457	10,824	50,655	0,0689	6,89	1005,30
36	Muestra 1.3U	9,457	10,825	50,639	0,0690	6,90	1005,30
37	Muestra 2.1U	9,457	11,208	52,500	0,0713	7,13	1006,00
38	Muestra 2.1U	9,453	11,187	52,522	0,0712	7,12	1006,00
39	Muestra 2.2U	9,453	10,677	50,220	0,0681	6,81	1004,80
40	Muestra 2.2U	9,450	10,696	50,284	0,0682	6,82	1004,80
41	Muestra 2.3U	9,453	10,787	50,766	0,0659	6,59	1048,30
42	Muestra 2.3U	9,457	10,810	50,750	0,0660	6,60	1048,30
45	Muestra 3.1U	9,450	11,394	53,518	0,0726	7,26	1004,60
46	Muestra 3.1U	9,450	11,377	53,544	0,0725	7,25	1004,60
47	Muestra 3.2U	9,450	11,857	55,749	0,0754	7,54	1006,80
48	Muestra 3.2U	9,450	11,859	55,800	0,0754	7,54	1006,80
49	Muestra 3.3U	9,450	11,008	51,797	0,0704	7,04	1001,70
50	Muestra 3.3U	9,453	10,973	51,693	0,0701	7,01	1001,70
Average		9,451	11,120	52,138	0,070	7,03	1012,16
SD		0,005	0,789	3,692	0,005	0,49	16,13
CV		0,053	7,094	7,082	7,005	7,01	1,59

Anexo 4 Cromatogramas de muestras de CBD por Maceración dinámica



Anexo 5 Cromatogramas de muestras de CBD por Maceración por ultrasonido



Anexo 6 Certificado de análisis del estándar mix de referencia



Certificate of Analysis

6 Component Potency Mix

Catalog Number:	C-924	Expiration:	11/30/2023
Lot Number:	211111	Solvent:	Acetonitrile
Manufacture Date:	11/10/2021	Hazards:	Irritant, Flammable

Analyte	CAS	Analyte Purity	Certified Concentration (ug/mL)
Cannabidiolic Acid (CBDA)	1244-58-2	97.7%	500.2 ± 4.66
Cannabigerol (CBG)	25654-31-1	100%	500.5 ± 4.66
Cannabidiol (CBD)	13956-29-1	100%	502.0 ± 4.67
Cannabinol (CBN)	521-35-7	99.2%	500.0 ± 4.65
Δ ⁹ -Tetrahydrocannabinol (D9-THC)	1972-08-3	100%	479.5 ± 4.46
Tetrahydrocannabinolic Acid (THCA)	23978-85-0	96.7%	493.5 ± 4.59

This certified reference material (CRM) was manufactured and certified by NSI Lab Solutions according to quality procedures meeting our accreditation requirements of ISO 17034:2016 and ISO/IEC 17025:2017. Our certificates and scopes of accreditation may be viewed at www.anab.org.

Packaging, Storage, Instructions For Use

This CRM is packaged in a flame-sealed ampule and must be stored at -10°C to -20°C. To use this CRM, allow it to reach room temperature. Mix it gently by inversion. Inspect for precipitate. If present, sonicate for a few minutes to redissolve. Open the ampule and withdraw an aliquot appropriate for your application.

Traceability Information

Analyte Source Materials: The highest purity analyte source materials are used in the manufacture of this CRM. The actual purity is referenced above.

Method: This CRM was verified Volumetrically/Gravimetrically and Analytically.



ISO 9001:2015 UL Registered Firm - Certificate # 10002343 QM15

Page 1 of 2



Catalog Number: C-924
Lot Number: 211111

Balance: All analytical balances are calibrated on a semiannual basis by an ISO 17025 accredited calibration laboratory and are traceable to NIST. Traceable Calibration Certificate available upon request.

All balances are checked daily by an in-house standard operating procedure. The weights used for this daily verification are calibrated annually by an ISO 17025 accredited calibration laboratory and are certified traceable to NIST. Certificate of Calibration and Traceability available upon request.

Thermometer: All thermometers are NIST traceable through thermometers that are calibrated annually by an ISO 17025 accredited calibration laboratory.

Glassware: All glassware used in the manufacture of our standards is Class A. An in-house standard operating procedure is used to verify all glassware prior to it being placed into service. Volumetric pipetors are calibrated every four months by an ISO 17025 accredited calibration laboratory.

Intended Uses

- Calibration of analytical instruments
- Validation of analytical methods
- Preparation of working level reference materials, i.e. "check standards"
- Detection limit studies

Homogeneity

This CRM was thoroughly mixed in production and is guaranteed homogenous.

Ken Grzybowski

Ken Grzybowski, Organics Department Manager

Mark Hammersla

Mark Hammersla, President



ISO 9001:2015 UL Registered Firm - Certificate # 10002343 QM15

Page 2 of 2

Anexo 7 Certificado de análisis del Hexano

Certificate of Analysis
ThermoFisher
 SCIENTIFIC

Page 1 of 1

Certificate of Analysis

1 Reagent Lane
 Fair Lawn, NJ 07410
 201.796.7100 tel
 201.796.1329 fax

Thermo Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System
 Standard ISO9001:2015 by SAI Global Certificate Number CERT - 0120632

This is to certify that units of the lot number below were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Thermo Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Products are for research use or further manufacturing. Not for direct administration to humans or animals. It is the responsibility of the final formulator and end user to determine suitability based upon the intended use of the end product. Products are tested to meet the analytical requirements of the noted grade. The following information is the actual analytical results obtained.

Catalog Number	H302	Quality Test / Release Date	07/13/2020
Lot Number	202413		
Description	HEXANES, HPLC GRADE, A.C.S.		
Country of Origin	United States	Suggested Retest Date	Jul/2025
Chemical Origin	Organic - non animal		
BSE/TSE Comment	No animal products are used in the manufacture of this product, nor do any animal products come into contact with it. As a result, there should be no BSE or TSE present.		

N/A			
Result Name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	CLEAR, COLORLESS LIQUID
ASSAY	%	>= 98.5	99.9
COLOR	APHA	<= 10	5
DENSITY AT 25 DEGREES C	GM/ML	Inclusive Between 0.653 - 0.673	0.670
EVAPORATION RESIDUE	ppm	<= 3	<0.3
FLUORESCENCE BACKGROUND	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
OPTICAL ABS AT 195 NM	ABSORBANCE UNITS	<= 1.00	0.68
OPTICAL ABS AT 210 NM	ABSORBANCE UNITS	<= 0.25	0.17
OPTICAL ABS AT 220 NM	ABSORBANCE UNITS	<= 0.08	0.06
OPTICAL ABS AT 254 NM	ABSORBANCE UNITS	<= 0.014	0.003
SULFUR COMPOUNDS	%	<= 0.005	<0.005
THIOPHENE	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
WATER (H2O)	%	<= 0.02	<0.002
WATER-SOLUBLE TITRABLE ACID	MEQ/G	<= 0.0003	0.00006

Julian Burton

Julian Burton - Quality Control Manager - Bridgewater

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as an extension of this catalog number listed above.
 If there are any questions with this certificate, please call at (800) 227-6701.
 *Based on suggested storage condition.

Anexo 8 Certificado de análisis del etanol absoluto



Scharlab S.L.

Gato Pérez, 33. Pol. Ind. Mas d'en Cisa

08181 Sentmenat

+34937456400

helpdesk@scharlab.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product	Ethanol absolute, reagent grade, ACS, ISO	Batch	19602610
ET0005		Quality release date	05/03/2019
		Expiry date	02/2024
Analysis	Batch value	Specifications	
Assay (G.C.) (v/v)	99,99 %	≥ 99,9	
Identity (IR-Spectrum)	passes test	passes test	
Density (20°/4°)	0,7894 g/mL	0,789 - 0,790	
Appearance	clear and colourless	clear	
Colour (Hazen)	1	≤ 10	
Acidity	0,00013 meq/g	≤ 0,0002	
Solubility in water	passes test	passes test	
Acidity or alkalinity	< 0,0003 %	≤ 0,0003	
Chlorides (Cl)	< 0,00003 %	≤ 0,00003	
Nitrates (NO3)	< 0,00003 %	≤ 0,00003	
Phosphates (as PO4)	< 0,00003 %	≤ 0,00003	
Sulfates (SO4)	< 0,00003 %	≤ 0,00003	
Aluminium (Al)	< 0,00005 %	≤ 0,00005	
Antimony (Sb)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Arsenic (As)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Barium (Ba)	< 0,00001 %	≤ 0,00001	
Beryllium (Be)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Bismuth (Bi)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Boron (B)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Cadmium (Cd)	< 0,000005 %	≤ 0,000005	
Calcium (Ca)	< 0,00005 %	≤ 0,00005	
Chromium (Cr)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Cobalt (Co)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Copper (Cu)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Gallium (Ga)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Gold (Au)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Indium (In)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Iron (Fe)	< 0,00001 %	≤ 0,00001	
Lead (Pb)	< 0,00001 %	≤ 0,00001	
Lithium (Li)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Magnesium (Mg)	< 0,00001 %	≤ 0,00001	
Manganese (Mn)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Molybdenum (Mo)	< 0,000005 %	≤ 0,000005	
Nickel (Ni)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Platinum (Pt)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Silver (Ag)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Thallium (Tl)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Tin (Sn)	< 0,00001 %	≤ 0,00001	
Titanium (Ti)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Vanadium (V)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Zinc (Zn)	< 0,00001 %	≤ 0,00001	

Results marked with # are out of specifications.
This certificate does not exempt the user from checking the results upon receipt of the goods.
Any copy of our CoA may be obtained from our website at www.scharlab.com

M. Canet
Laboratory Manager





Scharlab S.L.

Gato Pérez. 33. Pol. Ind. Mas d'en Cisa

08181 Sentmenat

+34937456400

helpdesk@scharlab.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product	Ethanol absolute, reagent grade, ACS, ISO	Batch	19602610
ET0005		Quality release date	05/03/2019
		Expiry date	02/2024
Analysis	Batch value	Specifications	
Zirconium (Zr)	< 0,000002 %	≤ 0,000002	
Formaldehyde	< 0,0005 %	≤ 0,0005	
Furfural	passes test	passes test	
Fusel oil	passes test	passes test	
Acetaldehyde and acetal (G.C.)	< 0,0010 %	≤ 0,001	
Acetone (G.C.)	< 0,0005 %	≤ 0,001	
Isoamyl alcohol (G.C.)	0,0006 %	≤ 0,05	
Benzene (G.C.)	< 0,0001 %	≤ 0,0002	
Methanol (G.C.)	0,0001 %	≤ 0,01	
Methylethylketone (G.C.)	< 0,001 %	≤ 0,02	
2-Propanol (G.C.)	0,0003 %	≤ 0,003	
Higher alcohols (G.C.)	< 0,005 %	≤ 0,01	
Aldehydes (as CH3CHO)	< 0,001 %	≤ 0,001	
Carbonyl compounds (as CO)	< 0,003 %	≤ 0,003	
Substances darkened by H2SO4	passes test	passes test	
UV Spectroscopy	passes test	passes test	
Substances reducing KMnO4	passes test	passes test	
Residue on evaporation	0,0003 %	≤ 0,0005	
Water (v/v) (K.F.)	0,0209 %	≤ 0,1	

Results marked with # are out of specifications.
 This certificate does not exempt the user from checking the results upon receipt of the goods.
 Any copy of our CoA may be obtained from our website at www.scharlab.com

M. Canet
 Laboratory Manager



Anexo 9 Certificado de análisis del etanol al 70 %

 CALIDAD QUE CURA	PROCESO DE CONTROL DE CALIDAD	Código: RCC.015-1
	CERTIFICADO DE ANÁLISIS PRODUCTO TERMINADO	Edición: 01 Página 1 de 1

Producto: ALCOHOL 70° GL		Fecha de Elaboración: 12/12/2022	
No Análisis: PR6B		Fecha de Vencimiento: 12/12/2024	
Fecha de análisis: 12/12/2022		Lote: AL2212160	
Presentación: 500 ml; 20 L			
PARÁMETROS	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	MÉTODO O NORMA DE REFERENCIA
Propiedades organolépticas	Solución homogénea, incolora, olor característico a alcohol, libre de material extraño.	Cumple	Método General
Densidad a 20°C	(0.7110-0.8990) g/ml	0.8834 g/ml	USP 43-NF30
pH	6.01-7.00	6.48	USP 43-NF30
Grado alcohólico a 20°C	No < 70.00° GL	70.94° GL	Método General
Volumen de llenado	100.0 ml (100.0 – 105.0) ml	N/A	Método Interno
	250.0 ml (250.0 – 262.0) ml	N/A	
	500.0 ml (500.0 – 525.0) ml	500.2 ml	
	1000.0 ml (1000.0 – 1050.0) ml	N/A	
	3785.0 ml (3785.0 – 3974.0) ml	N/A	
	20 l (20.0 – 21.0) l	20.1L	

Observaciones: Hoja de Análisis N°000368. Bitácora de Proceso de Control de Calidad para Producto Terminado.

Disposición:

Aprobado Cuarentena Rechazado

Realizado por: <i>Georgette Zamora</i>	Firma: <i>[Firma]</i>	Fecha: 12/12/2022
Cargo: Analista de Control de Calidad		
Aprobado por: <i>Dulce María Huáiz</i>	Firma: <i>[Firma]</i>	Fecha: 21/12/2022
Cargo: Jefe de Control de Calidad		

Anexo 10 Certificado de análisis del etanol al 70 %



Certificate of Analysis

1.06007.2500 Methanol gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv®
 Reag. Ph Eur
 Batch I1210907

Batch Values		
Purity (GC)	≥ 99.9	%
Identity (IR)	conforms	-
Evaporation residue	≤ 2.0	mg/l
Water	≤ 0.02	%
Color	≤ 10	Hazen
Density (d 20 °C/20 °C)	0.793	
Boiling point	64 - 65	°C
Acidity	≤ 0.0002	meq/g
Alkalinity	≤ 0.0002	meq/g
Gradient grade (at 235 nm)	≤ 2.0	mAU
Gradient grade (at 254 nm)	≤ 1.0	mAU
Fluorescence (as quinine at 254 nm)	≤ 1.0	ppb
Fluorescence (as quinine at 365 nm)	≤ 0.5	ppb
Transmission (at 210 nm)	≥ 20	%
Transmission (at 220 nm)	≥ 60	%
Transmission (at 230 nm)	≥ 75	%
Transmission (at 235 nm)	≥ 83	%
Transmission (at 250 nm)	≥ 95	%
Transmission (from 260 nm)	≥ 98	%
Absorbance (at 225 nm)	0.143	

Filtered by 0.2 µm filter.
 Suitable for UPLC / UHPLC / Ultra HPLC - instruments.

Conforms to Methanol R1 and R2 according to Reag. Ph Eur;
 conforms to the requirements of ACS for liquid chromatography suitability.

Date of release (DD.MM.YYYY) 27.04.2022
 Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 28.02.2025

Jeannette David
 Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Anexo 11 Certificado de análisis de Acetonitrilo

elpe



Certificate of Analysis

1.00030.4000 Acetonitrile gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv®
 Reag. Ph Eur
 Batch I1204930

	Batch Values	
Purity (GC)	≥ 99.9	%
Identity (IR)	conforms	
Evaporation residue	≤ 2.0	mg/l
Water	≤ 0.02	%
Color	≤ 10	Hazen
Density (d 20 °C/20 °C)	0.78	
Refractive index (n 20/D)	1.344	
Boiling range (80-82°C)	≥ 95	% (v/v)
Acidity	≤ 0.0002	meq/g
Alkalinity	≤ 0.0002	meq/g
Gradient grade (at 210 nm)	0.1	mAU
Gradient grade (at 254 nm)	0.1	mAU
Fluorescence (as quinine at 254 nm)	0.1	ppb
Fluorescence (as quinine at 365 nm)	0.1	ppb
Transmission (at 193 nm)	75	%
Transmission (at 195 nm)	89	%
Transmission (from 230 nm)	≥ 98	%

Filtered by 0.2 µm filter.
 Suitable for UPLC / UHPLC / Ultra HPLC - instruments.
 Conforms to Acetonitrile for chromatography and Acetonitrile R1 according to Reag.Ph Eur;
 conforms to the requirements of ACS for liquid chromatography suitability.

Date of release (DD.MM.YYYY) 04.03.2022
 Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.03.2025

Jeannette David
 Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0
 EMD Millipore Corporation - a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
 400 Summit Drive, Burlington, MA 01803, USA, Phone +1 (781) 533-6000
 SALSA Version 1119387/29000922410/ Date 04.03.2022

Page 1 of 1

Anexo 12 Certificado de análisis de Ácido Acético glacial



Certificate of Analysis

1.00063.2500 Acetic acid (glacial) 100% anhydrous for analysis EMSURE® ACS,ISO,
Reag. Ph Eur
Batch K53877563

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (alkalimetric)	≥ 99.8	%	99.8	%
Identify	passes test		passes test	
Color	≤ 10	Hazen	< 5	Hazen
Acetaldehyde	≤ 2	ppm	< 2	ppm
Acetic anhydride	≤ 100	ppm	45	ppm
Titratable base	≤ 0.0004	meq/g	< 0.0004	meq/g
Solidification temperature	≥ 16.3	°C	16.5	°C
Chloride (Cl)	≤ 0.4	ppm	< 0.2	ppm
Phosphate (PO ₄)	≤ 0.4	ppm	< 0.1	ppm
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.5	ppm	< 0.5	ppm
Sulfate (SO ₄)	≤ 0.4	ppm	< 0.4	ppm
Ag (Silver)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Al (Aluminium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
As (Arsenic)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Au (Gold)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
B (Boron)	≤ 0.100	ppm	< 0.010	ppm
Ba (Barium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Be (Beryllium)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Bi (Bismuth)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Ca (Calcium)	≤ 0.100	ppm	< 0.020	ppm
Cd (Cadmium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Co (Cobalt)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Cr (Chromium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Cu (Copper)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Fe (Iron)	≤ 0.050	ppm	< 0.040	ppm
Ga (Gallium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Ge (Germanium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Hg (Mercury)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
In (Indium)	≤ 0.050	ppm	< 0.050	ppm
K (Potassium)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Li (Lithium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Mg (Magnesium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Mn (Manganese)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Mo (Molybdenum)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Na (Sodium)	≤ 0.200	ppm	< 0.010	ppm
Ni (Nickel)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Pb (Lead)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Pt (Platinum)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Sn (Tin)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Sr (Strontium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Ti (Titanium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0
EMD Millipore Corporation - a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
400 Summit Drive, Burlington, MA 01803, USA, Phone +1 (781) 533-6000

Page 1 of 2

