



# POSGRADOS

Maestría en  
**PRODUCTOS  
FARMACÉUTICOS NATURALES**  
RPC-SO-09-No.174-2020

Opción de Titulación:  
Tesis

Tema:

Optimización de la extracción de flavonoides de hojas de Cannabis sativa mediante maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.

Autor(es)

Carlos Alberto Guanochanga Guzmán

Director:

Paco Fernando Noriega Rivera

QUITO – Ecuador  
2022

***Autor(es):***

Carlos Alberto Guanochanga Guzmán  
Químico Farmacéutico  
Candidato a Magíster en Productos Farmacéuticos Naturales por  
la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.  
krlosalberto2009@hotmail.com

***Dirigido por:***

Tatiana de los Ángeles Mosquera Tayupanta  
Magíster en Ciencias y Tecnologías Cosméticas  
Universidad Politécnica Salesiana-Sede Quito  
tmosquera@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 e investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los autores.

DERECHOS RESERVADOS

2022 © Universidad Politécnica Salesiana.

QUITO– ECUADOR – SUDAMÉRICA

***CARLOS ALBERTO GUANOCHANGA GUZMÁN***

***Optimización de la extracción de flavonoides de hojas de Cannabis sativa mediante maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.***

## ***DEDICATORIA***

Para mi padre Fausto y mi madre Maria que me enseñaron que todas las metas y objetivos de vida se pueden lograr con esfuerzo y perseverancia.

## **AGRADECIMIENTO**

Especial agradeciendo a la Dra. Tatiana Mosquera docente de la Universidad Politécnica Salesiana por su ayuda, apoyo y asesoramiento durante toda la investigación y al Dr. Paco Noriega por la oportunidad brindada para trabajar en el proyecto de investigación.

A la Ing. Erika Paredes colaboradora del Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana por toda la ayuda prestada durante la fase experimental de la investigación.

A toda mi familia que es mi motivación para seguir superándome y alcanzar todas mis metas.

# Tabla de Contenido

Resumen .....	12
Abstract .....	13
1 Introducción.....	14
2 Determinación del Problema.....	17
2.1 Planteamiento del Problema.....	17
2.1.1 Preguntas de investigación.....	17
2.2 Objetivos.....	18
2.2.1 Objetivo General.....	18
2.2.2 Objetivos Específicos.....	18
2.3 Justificación.....	18
3 Marco teórico referencial.....	20
3.1 Historia de <i>Cannabis sativa</i> .....	20
3.2 Descripción botánica <i>Cannabis sativa</i> . ....	20
3.3 Composición Fitoquímica.....	22
3.3.1 Cannabinoides .....	22
3.3.2 Terpenos.....	23
3.3.3 Flavonoides .....	24
3.4 Métodos de extracción.....	26
3.4.1 Maceración dinámica.....	27
3.4.2 Extracción asistida por ultrasonido.....	27
3.4.3 Extracción por fluidos supercríticos.....	28
3.5 Métodos de cuantificación.....	29
3.5.1 Método de Cloruro de Aluminio. ....	29
3.5.2 Método de Folin Cioucalteu.....	30
4 Metodología de investigación. ....	31
4.1 Diseño de la Investigación.....	31
4.1.1 Enfoque .....	31
4.1.2 Nivel de investigación. ....	31
4.1.3 Tipo de investigación. ....	32
4.2 Hipótesis .....	32
4.2.1 Hipótesis de trabajo. ....	32
4.2.2 Hipótesis nula. ....	32

4.3	Diseño experimental.....	32
4.4	Sistema de variables. ....	32
4.4.1	Variables y niveles.....	33
4.4.2	Tratamiento de las variables.....	33
5	Materiales y metodología.....	34
5.1	Materiales .....	34
5.1.1	Materia prima. ....	34
5.2	Equipos .....	34
5.3	Reactivos .....	35
5.4	Insumos.....	35
5.5	Metodología.....	36
5.5.1	Preparación de extractos por maceración dinámica.....	36
5.5.2	Preparación de extractos por extracción asistida por ultrasonido.....	36
5.5.3	Determinación del peso específico de los extractos.....	36
5.5.4	Preparación de las soluciones estándar.....	37
5.5.5	Cuantificación de fenoles totales.....	37
5.5.6	Cuantificación de flavonoides totales.....	37
6	Resultados y discusión.....	39
6.1	Curva de calibración de Ácido Gálico.....	39
6.2	Curva de calibración de Quercetina. ....	40
6.3	Cuantificación de fenoles totales por método de maceración dinámica. ....	41
6.3.1	Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por maceración dinámica.....	42
6.3.2	Prueba de múltiples rangos por método Tukey. ....	43
6.4	Cuantificación de fenoles totales por método de extracción asistida por ultrasonido.....	44
6.4.1	Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por extracción asistida por ultrasonido. ....	45
6.4.2	Prueba de múltiples rangos por método Tukey. ....	46
6.5	Comparación entre métodos de extracción y concentración de solvente para fenoles totales. ....	47
6.5.1	Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.....	47
6.5.2	Prueba de múltiples rangos por método Tukey. ....	48
6.6	Cuantificación de flavonoides totales por método de maceración dinámica. ....	50

6.6.1	Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por maceración dinámica.....	50
6.6.2	Prueba de múltiples rangos por método Tukey. ....	51
6.7	Cuantificación de flavonoides totales por extracción asistida por ultrasonido.....	53
6.7.1	Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por extracción asistida por ultrasonido. ....	54
6.7.2	Pruebas de Múltiple Rangos por método Tukey. ....	54
6.8	Comparación entre métodos de extracción y concentración de solvente para flavonoides totales.....	56
6.8.1	Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.....	56
6.8.2	Pruebas de Múltiple Rangos por método Tukey. ....	57
7	Conclusiones .....	60
	Referencias .....	61

## Índice de Tablas

Tabla 1	Sistema de variables .....	33
Tabla 2	Variabes y Niveles .....	33
Tabla 3	Tratamiento de Variables.....	33
Tabla 4	Absorbancias de los estándares de Acido Gálico.....	39
Tabla 5	Absorbancias de los estándares de Quercetina.....	40
Tabla 6	Absorbancias de extractos hidroalcohólicos por maceración dinámica.....	41
Tabla 7	Fenoles totales de extractos hidroalcohólicos por maceración dinámica .....	41
Tabla 8	ANOVA de fenoles totales por maceración dinámica.....	42
Tabla 9	Resumen estadístico de fenoles totales por maceración dinámica .....	42
Tabla 10	Comparación de grupos homogéneos de fenoles totales por maceración dinámica .....	43
Tabla 11	Comparación múltiple entre medias de fenoles totales por maceración dinámica .....	43
Tabla 12	Absorbancias de extractos hidroalcohólicos por extracción asistida por ultrasonido. ....	44
Tabla 13	Fenoles totales de extractos hidroalcohólicos por extracción asistida por ultrasonido.....	45
Tabla 14	ANOVA de fenoles totales por extracción asistida por ultrasonido .....	45

Tabla 15 Resumen estadístico de fenoles totales por maceración dinámica.....	45
Tabla 16 Comparación de grupos homogéneos de fenoles totales por extracción asistida por ultrasonido .....	46
Tabla 17 Comparación múltiple entre medias de fenoles totales por extracción asistida por ultrasonido .....	46
Tabla 18 ANOVA de fenoles totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido .....	47
Tabla 19 Comparación de grupos homogéneos de fenoles totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.....	48
Tabla 20 Comparación múltiple entre medias de fenoles totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.....	48
Tabla 21 Absorbancias de extractos hidroalcohólicos por maceración dinámica. ....	50
Tabla 22 Flavonoides totales de extractos hidroalcohólicos por maceración dinámica .....	50
Tabla 23 ANOVA de flavonoides totales por maceración dinámica.....	51
Tabla 24 Resumen estadístico de flavonoides totales por maceración dinámica	51
Tabla 25 Comparación de grupos homogéneos de flavonoides totales por maceración dinámica .....	51
Tabla 26 Comparación múltiple entre medias de flavonoide totales por maceración dinámica .....	51
Tabla 27 Absorbancias de extractos hidroalcohólicos por extracción asistida por ultrasonido .....	53
Tabla 28 Flavonoides totales de extractos hidroalcohólicos por extracción asistida por ultrasonido .....	53
Tabla 29 ANOVA de flavonoides totales por extracción asistida por ultrasonido .....	54
Tabla 30 Resumen estadístico de flavonoides totales por maceración dinámica .....	54
Tabla 31 Comparación de grupos homogéneos de flavonoides totales por extracción asistida por ultrasonido.....	54
Tabla 32 Comparación múltiple entre medias de flavonoide totales por extracción asistida por ultrasonido.....	55

Tabla 33 ANOVA de flavonoides totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido .....	56
Tabla 34 Comparación de grupos homogéneos de flavonoides totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido. ....	57
Tabla 35 Comparación múltiple entre medias de flavonoides totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido .....	57

## Índice de Figuras

Figura 1 Partes de <i>Cannabis sativa</i> .....	19
Figura 2 Estructuras de Cannabinoides .....	21
Figura 3 Estructuras de terpenos .....	22
Figura 4 Estructuras de flavonoides .....	23
Figura 5 Vías de biosíntesis de metabolitos secundarios de <i>Cannabis sativa</i> .....	24
Figura 6 Fenómeno de cavitación acústica en la extracción por ultrasonido .....	26
Figura 7 Reacción de formación del complejo Aluminio-Flavonoide .....	28
Figura 8 Reacción del ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu .....	29
Figura 9 Curva de calibración de Ácido Gálico .....	37
Figura 10 Curva de calibración de Quercetina .....	38
Figura 11 Intervalos de fenoles totales obtenidos a concentración de solvente 50%,70% y 80% por maceración dinámica .....	42
Figura 12 Intervalos de fenoles totales obtenidos a concentración de solvente 50%,70% y 80% por extracción asistida por ultrasonido .....	45
Figura 13 Intervalos de flavonoides totales obtenidos a concentración de solvente 50%,70% y 80% por maceración dinámica.....	50
Figura 14 Intervalos de flavonoides totales obtenidos a concentración de solvente 50%,70% y 80% por extracción asistida por ultrasonido .....	54
Figura 15 Comparación entre las medias de fenoles totales obtenidos por el método de maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido a concentración de solvente 50%,70% y 80% .....	48

---

Figura 16 Comparación entre las medias de flavonoides totales obtenidos por el método de maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido a concentración de solvente 50%,70% y 80% ..... 58

# Optimización de la extracción de flavonoides de hojas de Cannabis sativa mediante maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.

Autor(es):

Carlos Alberto Guanochanga Guzmán

## Resumen

---

En la presente investigación se optimizó la extracción de flavonoides en hojas de *Cannabis sativa* mediante maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido empleando como solvente de extracción una mezcla de etanol-agua a concentraciones de 50%, 70% y 80%, para lo cual se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos por triplicado de cada uno de los tratamientos y se valoraron los flavonoides totales utilizando como marcador fitoquímico la quercetina mediante el método del Cloruro de Aluminio ( $AlCl_3$ ) por espectrofotometría UV y los resultados se expresaron en miligramos de quercetina por cada 100 g de droga seca, complementariamente se cuantificaron fenoles totales de cada uno de los extractos por el método de Folin Ciocalteu expresados en miligramos de Ácido Gálico por cada 100 g de droga seca. Los resultados obtenidos demostraron que el método de extracción asistida por ultrasonido tuvo un rendimiento de flavonoides totales de 38,2% mayor respecto a maceración dinámica haciendo uso del solvente de extracción 50% y para el caso fenoles totales la concentración de solvente 80%, lo que permite establecerlo como el proceso extractivo más eficiente.

**Palabras clave:**

Flavonoides, maceración, ultrasonido, extracto, solvente, rendimiento

## Abstract

---

In the present research, the extraction of flavonoids from *Cannabis Sativa* leaves was optimized by dynamic maceration and ultrasound-assisted extraction using as extraction solvent an ethanol-water mixture at concentrations of 50%, 70% and 80%. For this purpose, hydro-alcoholic extracts were obtained in triplicate from each of the treatments and total flavonoids were evaluated using Quercetin as a phytochemical marker by the Aluminum Chloride ( $AlCl_3$ ) method by UV spectrophotometry and the results were expressed in milligrams of Quercetin per 100 g of dry drug. Additionally, total phenols of each of the extracts were quantified by the Folin Ciocalteu method expressed in milligrams of Gallic Acid per 100 g of dry drug. The results obtained showed that the ultrasound-assisted extraction method had a total flavonoid yield of 38,2% higher than dynamic maceration using 50% extraction solvent and 80% solvent concentration in the case of total phenols, which allows establishing it as the most efficient extraction process.

**Keywords:**

Flavonoids, maceration, ultrasound, extract, solvent, yield.

# 1 Introducción

Las investigaciones sobre la composición fitoquímica de la especie vegetal *Cannabis sativa* y los beneficios fitoterapéuticos que pueden brindar los metabolitos secundarios presentes han permitido a los investigadores generar especies modificadas genéticamente con el fin de aumentar la producción de dichos metabolitos y a su vez encontrar métodos extractivos que permitan obtener rendimientos altos controlando y modificando variables. Actualmente la especie vegetal *Cannabis sativa* ha generado un alto interés dentro de los investigadores por los beneficios de los metabolitos secundarios encontrados en las inflorescencias conocidos como cannabidiol (CBD) y tetrahidrocannabinol (TCH) y sus posibles aplicaciones terapéuticas, por tal motivo hoy en día los estudios han generado una gran cantidad de información relacionada a la optimización de los métodos y variables de extracción lo que ha permitido la obtención de estos cannabinoides a escalas mayores.

Sin embargo existe un amplio campo de estudio sobre otras partes de esta especie vegetal como son las hojas y los metabolitos secundarios presentes en ellas conocidos como cannflavinas un grupo de compuestos pertenecientes a los flavonoides los cuales se tiene información robusta de investigaciones que demuestran tener un amplio campo de actividades terapéuticas (antiinflamatorio, antibacteriano, antineoplásico, entre otros) para ser aplicados como alternativa para el tratamiento de enfermedades (Rea, 2019).

En el presente estudio se evaluó la influencia de la concentración de solvente de extracción y el método de extracción sobre la cantidad total de cannflavinas (flavonoides) y fenoles totales presentes en las hojas de *Cannabis sativa*. Los extractos fueron obtenidos con una mezcla etanol-agua a concentraciones de 50,70 y 80 %V/V utilizando maceración dinámica por 24 horas a 125 rpm y extracción asistida por ultrasonido a frecuencia de 42KHz y potencia de 100 W, temperatura (25°C) por 15 minutos, los metabolitos fueron cuantificados

aplicando el método de Folin Ciocalteu para fenoles totales y el método colorimétrico con cloruro de aluminio para flavonoides totales con el fin de determinar el tratamiento que presente mejores resultados.

Actualmente el estudio sobre *Cannabis sativa* ha trascendido dentro de la comunidad científica, permitiendo obtener información muy concreta y confiable sobre los efectos terapéuticos que poseen los metabolitos secundarios como terpenos, cannabinoides, cannflavinas (flavonoides), alcaloides identificados en hojas, tallos, raíces, inflorescencias, semillas. Adicionalmente se ha logrado identificar las principales rutas de biosíntesis, a su vez los estudios indican que la concentración de ciertos metabolitos está asociada directamente con la genética de la especie (chemovar), condiciones ambientales, geográficas en las cuales se cultiva (Bautista, 2021).

Sin embargo los estudios hoy en día apuntan de manera muy amplia e intensa sobre dos fitocannabinoides: el compuesto psicoactivo conocido como el tetrahidrocannabinol (TCH) y el cannabidiol (CBD) compuesto no psicoactivo pero ampliamente conocido por el uso medicinal, al punto de tener muy bien definido sus estructuras, vías de biosíntesis y actividades biológicas. Por otra parte se ha llegado a demostrar que los otros metabolitos secundarios (bioactivos) presentes en *Cannabis sativa* ejercen un efecto sinérgico sobre los fitocannabinoides mejorando la bioactividad, conocido como el efecto séquito (Bautista, 2021).

Este precedente motiva a los investigadores al estudio sobre compuestos no fitocannabinoides, como terpenos y flavonoides, los cuales pueden ser valiosos para desarrollar terapias medicinales con *Cannabis sativa*, tal es el caso de las cannflavinas un grupo único de metabolitos secundarios presentes en esta especie y caracterizadas por ser flavonas preniladas (C5) y geralinadas (C10), llegándose a identificar a Cannflavina A , B y C, los cuales han demostrado un potente efecto antiinflamatorio en varios modelos de células animales (Rea, 2019).

Vinculados a todas las bondades, beneficios y el potencial uso y aplicación que pueden tener los metabolitos secundarios de *Cannabis sativa* se encuentran los métodos de extracción de bioactivos, que son un pilar de gran importancia, pues sin estas técnicas y métodos no existiera forma de separar el metabolito de su matriz vegetal para su posterior identificación, aislamiento y purificación. Actualmente se continúa utilizando técnicas muy conocidas como la extracción por solventes, maceración, percolación, hidrodestilación, soxhlet, con fin de poder aumentar los rendimientos de extracción se han implementado nuevas técnicas como la extracción asistida por ultrasonido y extracción por fluidos supercríticos (CO<sub>2</sub>) (Isidore, 2021). Las investigaciones han permitido controlar variables que afectan directamente el rendimiento y el tipo de metabolito secundario a extraer con el fin de optimizar los métodos extractivos, tal es el caso de la extracción asistida por ultrasonido que hoy en día se ha convertido en la técnica de primera elección para la extracción de cannabinoides como el tetrahidrocannabinol (TCH) y el cannabino (CBD) de las inflorescencias de *Cannabis sativa* (Agarwal, 2018). Adicionalmente la técnica de maceración dinámica ha mostrado buenos rendimientos en la extracción de cannabinoides (Monton, 2019).

## 2 Determinación del Problema

Los estudios de metabolitos secundarios en *Cannabis sativa* se ha enfocado exclusivamente a los cannabinoides presentes en las inflorescencias de esta especie, sin embargo otras partes como tallos, raíz, hojas, semillas no se han estudiado de manera exhaustiva para identificar posibles metabolitos secundarios con potencial aplicación en el ámbito terapéutico, limitando la información tanto fitoquímica como de aplicaciones de otras partes de la especie, uno de los problemas para aumentar las investigaciones en la especie es el acceso restringido por parte de las instancias reguladoras, obtención de permisos de adquisición de las semillas, licencias cultivo de la especie y comercialización.

Los flavonoides han demostrado tener un amplio campo de aplicación terapéutica en gran diversidad de especies vegetales y *Cannabis sativa* no es la excepción y se ha identificado la presencia de flavonoides en hojas, dentro del proceso de extracción existen diferentes variables que pueden generar un menor o mayor rendimiento del bioactivo por ende el problema es que no existe una estandarización para controlar estas variables que influyen directamente en la optimización de los proceso extractivos de cannflavinas (flavonoides) utilizando mezcla de solventes y métodos de extracción que permitan obtener mejores rendimientos y que tenga proyección hacia un escalado industrial.

### 2.1 Planteamiento del problema

¿Es posible la optimización de extracción de flavonoides en hojas de *Cannabis sativa* evaluando tanto la influencia del método de extracción como las diferentes concentraciones del solvente?

#### 2.1.1 Preguntas de investigación

- ¿Cómo influye la concentración de solvente en la cantidad de flavonoides en los extractos hidroalcohólicos obtenidos por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido?
- ¿Existe diferencia en la concentración de flavonoides y fenoles totales al utilizar diferentes tratamientos de extracción?
- ¿Podría la variación de las concentraciones de solvente en el proceso extractivo influir directamente en la concentración de flavonoides totales?

## 2.2 Objetivos

### 2.2.1 Objetivo General

Definir un proceso de extracción de mayor rendimiento de flavonoides de las hojas de *Cannabis sativa*, estandarizando método y concentración de solventes.

### 2.2.2 Objetivos específicos

- Elaborar extractos de hojas de *Cannabis sativa* mediante maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido variando la concentración del solvente.
- Determinar la concentración de flavonoides y fenoles totales de los extractos obtenidos en cada tratamiento.
- Establecer la concentración de solvente y el método extractivo que obtenga el mejor rendimiento de extracción de flavonoides.

## 2.3 Justificación

La extracción de metabolitos secundarios de aplicación e importancia terapéutica de una especie vegetal es muy importante dentro de los estudios de investigación, hoy en día los estudios científicos se han proyectado en mejorar y optimizar las condiciones de trabajo de dichos métodos controlando variables como tiempo de extracción, concentración y tipo de solvente, temperatura, agitación, frecuencia, etc, a fin de obtener mejores rendimientos de extracción de los bioactivos, para el caso en particular de *Cannabis sativa* estas metodologías se han perfeccionado enfocándose en los Cannabinoides (TCH, CBD) presentes en las inflorescencias, los cuales se encuentran en mayor proporción en esta parte específica de la planta,

por otra parte la aplicación y optimización de los métodos extractivos para flavonoides ha sido poco atendido y estudiado, teniendo en consideración que este tipo de bioactivos poseen una gran actividad terapéutica de acuerdo con estudios previos (Jin,2020). Además los pocos estudios realizados sugiere que la optimización tendrá mejores rendimientos mientras se controlen de manera exhaustiva las variables que influyen directamente sobre los métodos extractivos (Isidore, 2021).

Es por tal motivo que la presente investigación se encaminará en la aplicación de dos métodos extractivos la maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido variando la concentración del solvente (etanol), conforme a los resultados obtenidos una vez culminado el estudio será un precedente para futuras investigaciones destinadas al aislamiento y aplicación en el campo fitoterapéutico con proyección industrial, logrando un completo aprovechamiento de estos bioactivos y obteniendo extractos con métodos estandarizados. De igual forma, la factibilidad de la presente investigación no implica dificultades para el investigador en acceso a equipos, adquisición de materiales, material vegetal, reactivos, estándares y solventes, los métodos analíticos para el análisis y cuantificación del bioactivo se fundamenta en el uso de estándares y elaboración de curvas de calibración las cuales son técnicas reproducibles.

## 3 Marco teórico referencial

### 3.1 Historia de *Cannabis sativa*.

La especie vegetal *Cannabis sativa*, es originaria de Asia y su uso para producir fibras y confeccionar diversos productos textiles, data del año 4000 a.C., mientras que el registro de uso en la medicina tradicional china data del año 2700 a.C constituyéndose como una de las principales especies de gran relevancia en el ámbito medicinal. De acuerdo al conocimiento tradicional y ancestral, se le atribuyen propiedades terapéuticas tales como analgésicas, relajantes musculares, antidepresivas, hipnóticas, inmunosupresoras, antiinflamatorias, ansiolíticas, broncodilatadoras. Es una de las plantas más antiguas que producen efectos psicotrópicos y en los textos de la medicina Ayurvédica, se describen por primera vez tres preparaciones de *Cannabis sativa*: el "bhang", preparado con las hojas secas; el "ganja", preparado con flores femeninas secas; y, el "charas", que es la resina que se encuentra en las hojas (Ángeles, 2014).

El uso y cultivo de esta especie vegetal data de 5000 a 6000 años lo que hace difícil establecer un punto de origen definido convirtiéndola en una de las plantas más antiguas utilizadas como fuente de recurso para alimento, medicina y fibra textil cuyos indicios han sido encontrados en Egipto y oeste de Asia, posteriormente fue introducida en Europa entre los años 1000 y 2000 d.C, en Sudamérica en el año de 1545 y Norte América en el año de 1606 (EISohly, 2017).

### 3.2 Descripción botánica *Cannabis sativa*.

Planta herbácea anual, generalmente dioica (las flores femeninas y las masculinas se encuentran en plantas distintas), con pelos y glándulas, en estado adulto alcanza una altura 3 a 4 m de alto, dispone de hojas con un par de hojillas membranáceas y enteras llamadas estípulas y se encuentran sobre el tallo en el punto donde nace cada hoja. Las hojas inferiores opuestas y las superiores alternas, sobre pecíolos de hasta 7 cm de largo, cada hoja se compone de 3 a 9

(raramente 11) hojillas (llamadas folíolos) que nacen de un mismo punto. Los folíolos son angostos, de ápice agudo, con dientes puntiagudos en el margen, con pelos recostados sobre la cara superior, la cara inferior de un color más claro, con pelillos suaves y algunas glándulas resinosas, las inflorescencias masculinas son ramificadas, laxas y con muchas flores y las femeninas densas pero con pocas flores (entre 5 a 8), las flores no tienen cáliz ni corola diferenciados, presentan un perianto cuyos segmentos se llaman tépalos, las flores masculinas son pediceladas, perianto de 5 tépalos libres, 5 estambres opuestos a los tépalos, un poco más cortos que los tépalos y caedizos; las flores femeninas son sésiles, perianto entero (no se divide en tépalos), membranáceo y pegado al ovario, persistente en el fruto, ovario con un solo óvulo y 2 estigmas, el fruto es un aquenio, con una sola semilla, ovoide, algo comprimido, blanco o verdoso teñido de púrpura, encerrado en el perianto (Vibrans, 2009).



**Figura 1** Partes de *Cannabis sativa* L. 1, flor masculina, 2, saco de polen; 3, saco de polen; 4, grano de polen; 5, flor femenina con bráctea; 6, flor femenina, bráctea eliminada; 7, grupo de semillas femeninas, sección longitudinal; 8, semilla con bráctea; 9, semilla sin bráctea; 10, sección transversal de semillas; 11, sección longitudinal de semillas; 12, semilla sin cáscara (Köhler, 1887).

### 3.3 Composición Fitoquímica.

Una gran cantidad de compuestos fitoquímicos que comprenden diferentes estructuras químicas son producidos en esta especie vegetal como resultado del metabolismo secundario y de los cuales se ha logrado identificar en distintas partes de la planta como inflorescencias, hojas, tallos, raíz, semillas, sin embargo las concentraciones detectadas dependen de condiciones externas de cultivo que influyen significativamente la presencia de estos metabolitos, los estudios han identificado grupos con mayor predominio entre ellos están los cannabinoides, terpenos, compuestos fenólicos y en menor cantidad lignanos y alcaloides.

#### 3.3.1 Cannabinoides

Este grupo de metabolitos secundarios conocidos también como fitocannabinoides es ampliamente estudiado y representativo de *Cannabis sativa* por los efectos terapéuticos y psicóticos, corresponde a compuestos terpeno fenólicos (Ver figura 2) conformados por formas carboxiladas de 21 a 22 carbonos (C21-C22), las investigaciones han logrado identificar y aislar 120 cannabinoides hasta la fecha entre los cuales destaca el CBD (cannabidiol) y el TCH (tetrahidrocannabinol) este último con un porcentaje de contenido detectado mayoritariamente en las inflorescencias con un porcentaje que va entre el 10 al 12% de activo y decrece de forma significativa en hojas (1-2%), tallos (0.1-0.3%), raíz (<0.03%) y semillas en las cuales se ha visto la ausencia de este compuesto (Jin,2020). Otros cannabinoides encontrados en menor contenido han demostrado tener efectos terapéuticos entre los cuales se tiene el cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), cannabinodiol (CBND), cannabielsoin (CBE), cannabiciclol (CBL), cannabinol (CBN), cannabitriol (CBT) (ElSohly, 2017) y misceláneos cuyas estructuras no se asemejan entre las antes mencionadas presentado anillos de furano, funciones carbonilo o sustituciones tetrahidroxilo (Brenneisen, 2002). Por otra parte las investigaciones han logrado dilucidar de forma muy clara y precisa las vías de biosíntesis de estos compuestos de alto impacto terapéutico, la primera vía es la del policétido y la segunda vía de desoxixilulosa fosfato/metil eritritol fosfato (DOXP/MEP) Ver Figura 4. (Flores-Sanchez, 2008).

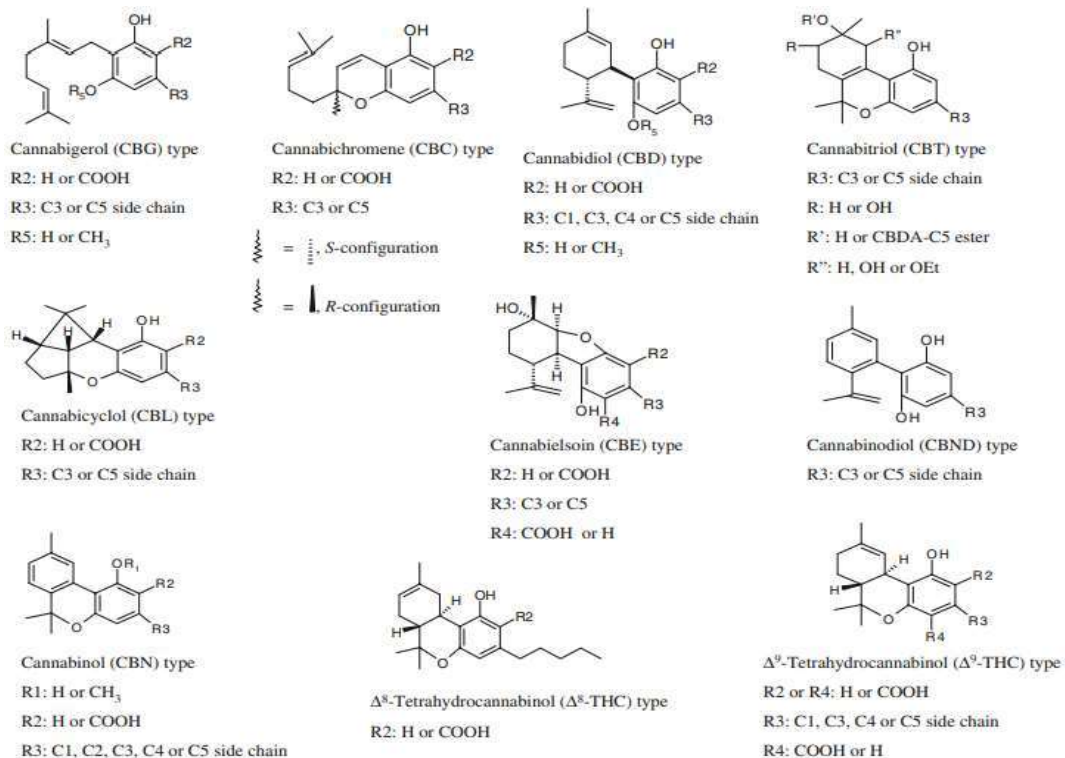
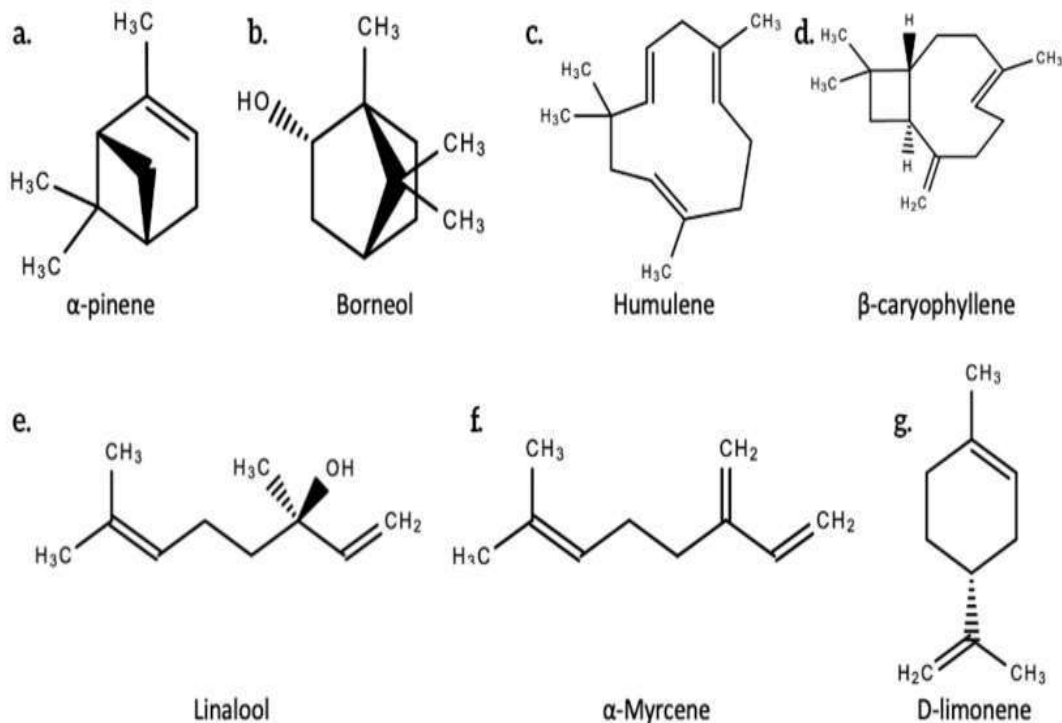


Figura 2 Estructuras de cannabinoides (Flores-Sanchez, 2008).

### 3.3.2 Terpenos

Los terpenos constituyen otro de los principales y más predominante grupo de metabolitos secundarios presentes en *Cannabis sativa* caracterizados por ser los responsables de dar el olor y sabor actuando como un mecanismo de defensa de esta especie vegetal, son compuestos hidrocarburos acíclicos, monocíclico y policíclicos constituidos varias unidades de isopreno formando compuestos conocidos como monoterpenos los cuales están compuestos por 10 carbonos, sesquiterpenos conformados por 15 carbonos y triterpenos formados por un esqueleto de 30 carbonos (Lowe, 2021), dentro de estos se tiene compuestos como el limoneno, safranal, geraniol, cariofileno, farnesol (Ver Figura 3.). Los estudios han permitido identificar 2 principales vías de biosíntesis de estos metabolitos, la primera vía es la del mevalonato (MVA) y la segunda vía es la del desoxixilulosa fosfato/metil eritritol fosfato (DOXP/MEP) Ver Figura 4. (Christelle, 2016), por otra parte la distribución y presencia de estos metabolitos secundarios considerablemente debido a factores externos que influyen en el desarrollo (condiciones climáticas) lo que ha permitido evidenciar que en el tallo y raíz no hay presencia de estos compuestos, en las hojas se ha encontrado mono y

sesquiterpenos en un porcentaje de 0.125 % a 0.278 % y en las inflorescencias es la principal región con mayor concentración de estos metabolitos en porcentaje de 16,48%-45,25% (Jin,2020).

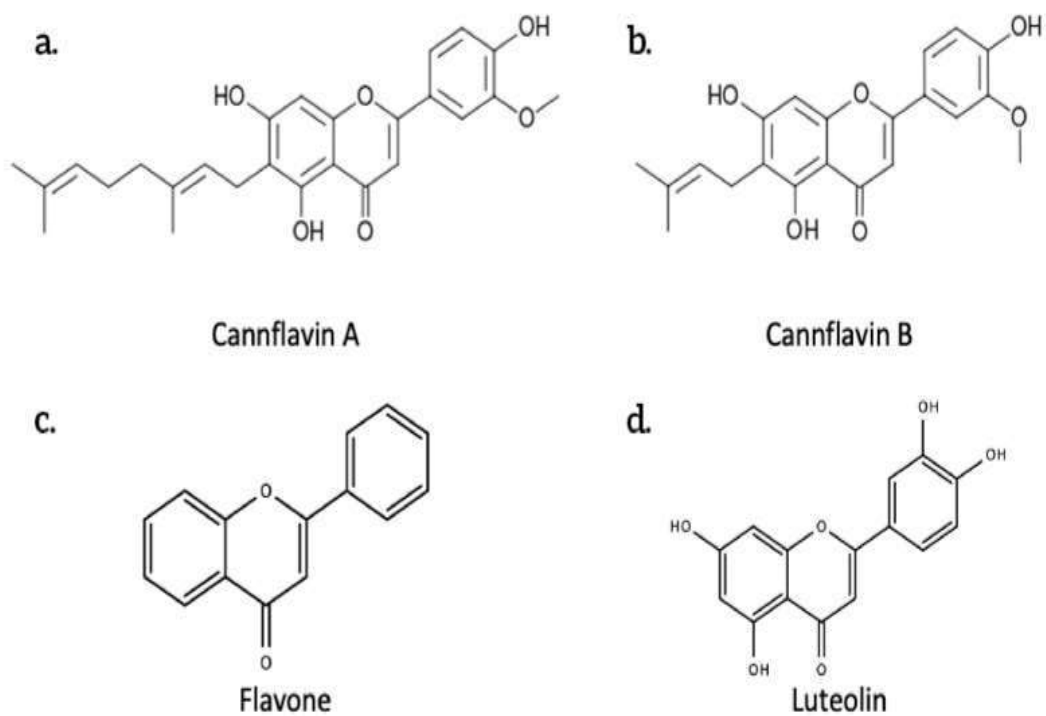


**Figura 3** Estructuras de terpenos (a) pineno, (b) borneol, (c) humuleno, (d) cariofileno, (e) linalol, (f) mirceno, (g) limoneno (Lowe, 2021).

### 3.3.3 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de metabolitos con gran relevancia y poco estudiado hasta la actualidad, familia de compuestos polifenólicos presentes no solo en *Cannabis sativa* sino en gran variedad de especies vegetales con potencial terapéutico, cuya estructura base corresponde a un esqueleto de 15 carbonos el cual consiste de 2 anillos fenil (A y B) y un anillo heterocíclico permitiendo obtener diferentes clases de flavonoides como flavan-3-ol, flavonoles, flavanonas, flavonas e isoflavonas (Bautista, 2021) y (Lowe, 2021). En esta especie vegetal los estudios han permitido identificar flavonoides perteneciente a la clase de las flavonas y flavonoles entre los que destacan apigenina, luteolina, keampferol, quercetina, además de cannfavina A y cannaflavina B un grupo de flavonas metiladas isoprenoides presentes únicamente en esta especie vegetal (Christelle, 2016). La vía de biosíntesis de estos metabolitos secundarios aún no está completamente clara,

pero apunta a la vía del ácido shikimiko (Flores-Sanchez, 2008) y otros autores mencionan la vía del fenilpropanoide Ver Figura 4. (Christelle, 2016). La distribución de los flavonoides en esta especie vegetal se ve afectada por factores externos (condiciones climáticas) generando variabilidad de en las diferentes partes, tal es el caso que no se ha detectado la presencia de flavonoides en la raíz y tallo, en las inflorescencias un porcentaje de 0.07-0.14 % y en las hojas un alto contenido que oscila entre 0.34-0.44 % (Jin, 2020).



**Figura 4** Estructuras de flavonoides (a) Cannflavina A, (b) Cannflavina B, (c) Flavona, (d) Luteolina (Lowe, 2021).

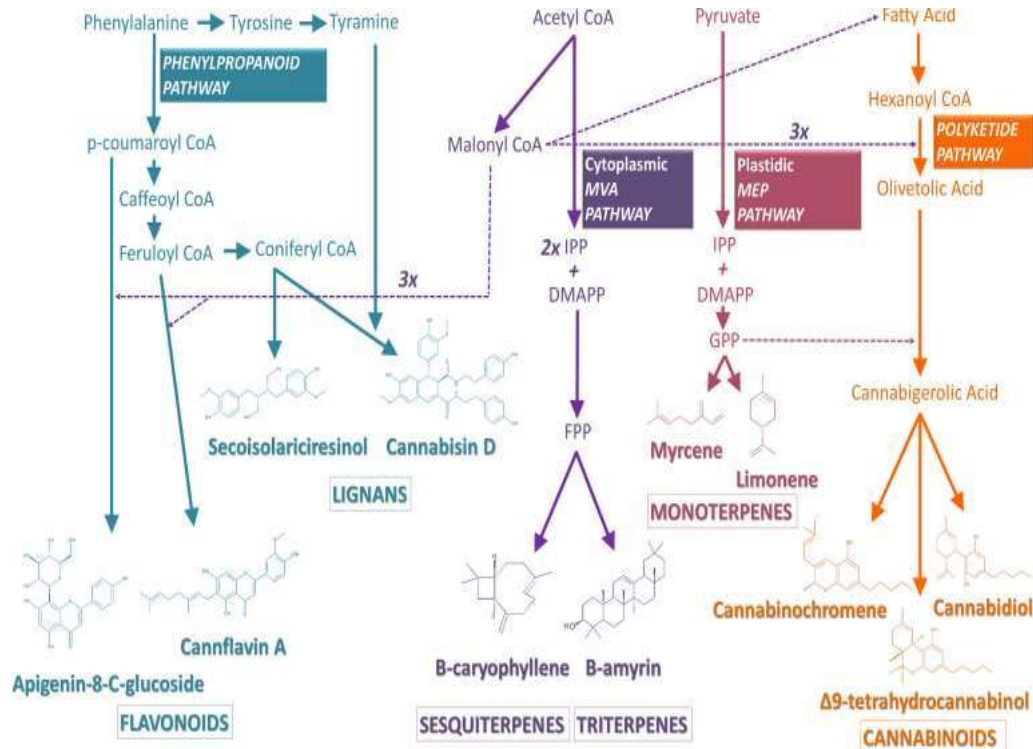


Figura 5 Vías de biosíntesis de metabolitos secundarios de *Cannabis sativa* (Christelle, 2016).

### 3.4 Métodos de extracción.

La separación de los metabolitos secundarios desde la matriz vegetal es el primer paso para lograr identificar y aislar estos compuestos por lo cual los métodos de extracción son de gran importancia, sin embargo cada uno tiene ventajas y desventajas las cuales afectan la composición final de los extractos lo que implica el control exhaustivo de las condiciones de trabajo de cada método que influyen directamente sobre la eficiencia de extracción. Los métodos ampliamente utilizados y que han demostrado tener óptimos rendimientos en la extracción de metabolitos secundarios de *Cannabis sativa* son maceración dinámica, extracción con solventes orgánicos, extracción soxhlet, extracción asistida por ultrasonido y extracción por fluidos supercríticos (Rozanc, 2021), la elección del método a ejecutar se enfoca principalmente en el tipo de metabolito de interés. Es de gran importancia dentro de cada uno de los métodos de extracción tomar en consideración las variables o factores que interfieren directamente en el proceso de extracción independientemente de la escala de producción o tipo de extracto final como es el estado de división de la droga, agitación, temperatura, pH, naturaleza del solvente (polar o apolar) y el tiempo de extracción (Sharapin, 2000).

### 3.4.1 Maceración dinámica.

La maceración dinámica es una técnica muy utilizada debido a su idoneidad para diferentes escalas, simplicidad y bajo costo de recursos comparado con otros métodos extractivos, el proceso de extracción ocurre por difusión haciendo uso de solventes orgánicos que son utilizados tomando en cuenta la polaridad del solvente para extraer los compuesto de interés (Resende, 2021), la droga vegetal y el solvente están en contacto directo durante un tiempo específico (tiempo de maceración) dando como resultado un equilibrio de concentración droga solvente, en este método la agitación tiene un papel importante en la eficiencia del proceso puesto que permite que nuevas cantidades de solvente pobre en sustancias extraíbles entren en contacto con el sólido permitiendo alcanzar un nuevo punto de equilibrio de saturación del solvente (Sharapin, 2000).

### 3.4.2 Extracción asistida por ultrasonido.

Conocido como UAE (Ultrasonic Assisted Extraction) por sus siglas en inglés la extracción asistida por ultrasonido usa la energía acústica y solventes para extraer los compuestos de interés de varias matrices vegetales (Ubeed, 2021) mediante ondas de ultrasonido de alta potencia y baja frecuencia con un rango de frecuencia (> 20 kHz) superior al rango de frecuencia audible del oído humano (20 Hz a 20 kHz). Estas ondas conforman una serie de ciclos de compresión y rarefacción que pueden propagarse a través de un medio sólido, líquido o gaseoso, induciendo el desplazamiento y remoción de moléculas de sus posiciones originales de tal forma que el aumento de la transferencia de masa es producto de la cavitación acústica (Ver Figura 6.) inducida por el líquido (solvente de extracción) mediante el cual viajan las ondas ultrasónicas creando ciclos alternos de alta y baja presión (Hielscher, 2022). Como en todo método las variables o factores que influyen en la extracción en este método son la frecuencia, potencia, ciclo de trabajo, temperatura, tiempo de extracción, tipo de solvente y la relación líquido-sólido (Resende, 2021).

## Ultrasonic Cavitation

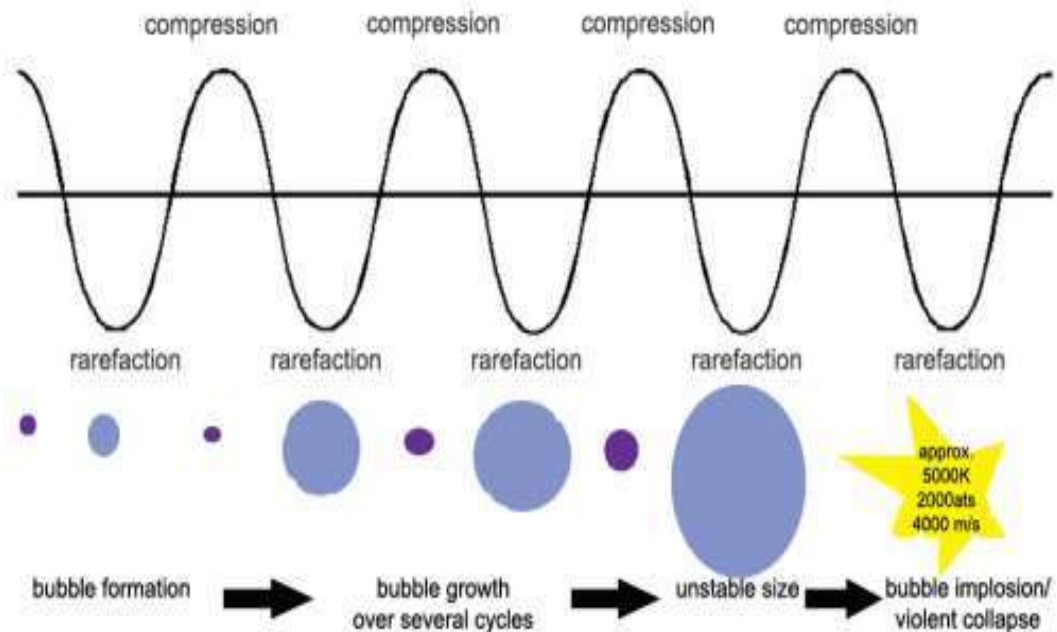


Figura 6 Fenómeno de cavitación acústica en la extracción por ultrasonido (Hielscher, 2022).

### 3.4.3 Extracción por fluidos supercríticos.

El método de extracción por fluidos supercríticos (SFE) es una técnica que implica el uso de disolventes presurizados o también llamado solvente supercrítico entre los utilizados con mayor frecuencia está el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) el cual posee una baja eficiencia para disolver compuestos polares, para resolver este inconveniente y lograr la solubilidad de las sustancias polares el método requiere la adición de cosolventes o modificadores los cuales deben ser miscibles con el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) evitando de esta manera el uso de solventes orgánicos (Ramirez, 2019), el dióxido de carbono no es inflamable, es relativamente inerte, abundante y económico y puede mantenerse en estado líquido incluso cuando su temperatura aumenta hasta un punto límite llamado punto crítico. Esta técnica se basa en el principio de solubilizar los compuestos deseados en el estado líquido del solvente y luego convertir el solvente líquido en un estado gaseoso, separando así los componentes (PharmaGrown,2022), es importante destacar la posibilidad de modular las condiciones de extracción para obtener fracciones de extractos específicos, es decir, cambiando las condiciones de presión y temperatura del

proceso puede obtener diferentes metabolitos secundarios. La extracción por fluidos supercríticos posee de variables o factores de extracción que afectan directamente a la eficiencia del método y que deben ser controlados como la temperatura, la presión, el pre tratamiento de la muestra vegetal y la naturaleza del solvente (Resende, 2021).

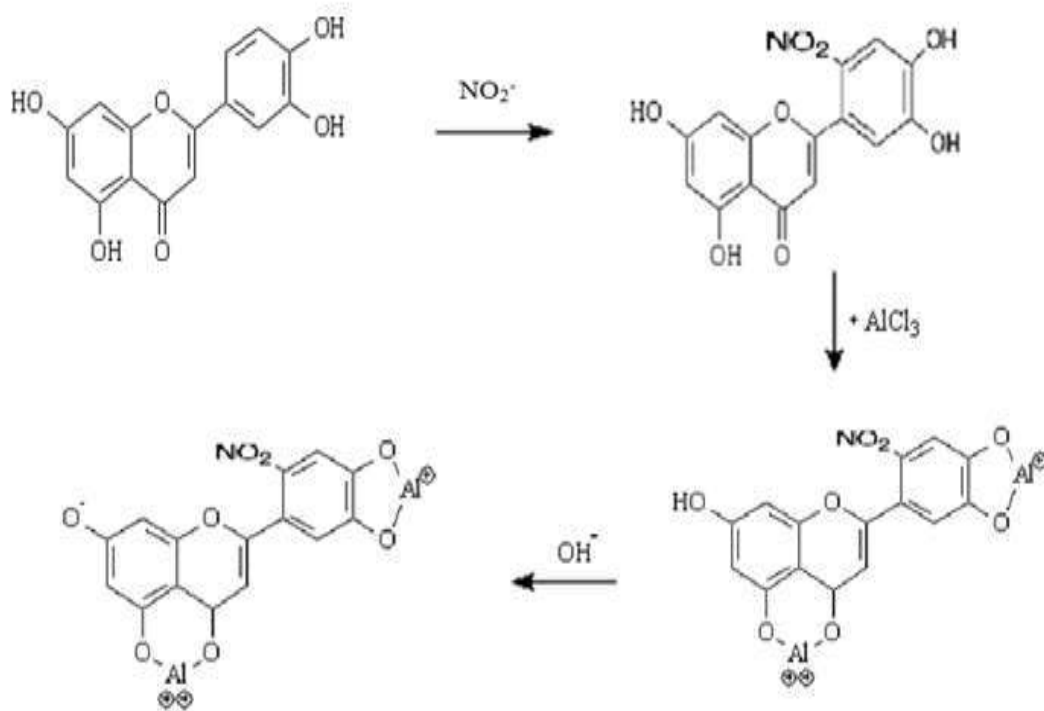
### 3.5 Métodos de cuantificación.

Culminado la extracción de los metabolitos secundarios desde la matriz vegetal haciendo uso de cualquiera de los métodos de extracción, el siguiente paso corresponde a la cuantificación de los metabolitos presentes en los extractos finales empleando técnicas analíticas cuantitativas tomando en consideración el metabolito de interés como técnicas espectrofotométricas, cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

#### 3.5.1 Método de Cloruro de Aluminio.

La presencia de grupos “oxo” e “hidroxilo” dentro de las estructuras de los flavonoides pueden coordinar y quelar varios iones metálicos, sin embargo la reacción entre los flavonoides y los iones metálicos no siempre se limitan a la formación de enlaces de coordinación simples dependiendo del ion metálico pueden generarse reacciones redox entre los iones metálicos y el ligando (flavonoide) ya que la mayoría de los flavonoides tienen una buena capacidad de reducción (Kasprzak, 2012).

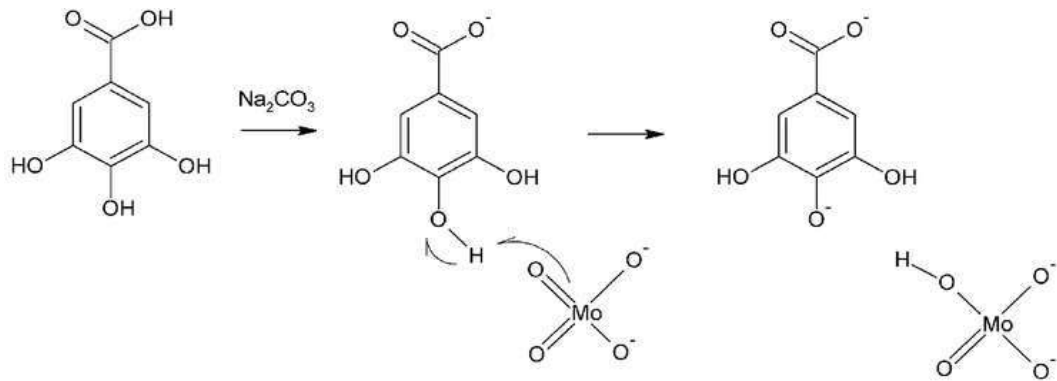
El ensayo espectrofotométrico basado en la formación de complejos de aluminio es uno de los procedimientos ampliamente aplicados para la determinación del contenido total de flavonoides en extractos vegetales. El método se basa fundamentalmente en la nitración de cualquier anillo aromático que tenga un grupo catecol con sus tres o cuatro posiciones sin sustituir o no bloqueado estéricamente. Después de la adición de cloruro de aluminio, se forma una solución amarilla de complejo, que luego se convierte inmediatamente en rojo después de la adición de hidróxido de sodio (Ver Figura 7), esta reacción colorimétrica genera una señal en el espectro a 410 nm (Pecal, 2014).



**Figura 7** Reacción de formación del complejo colorimétrico Aluminio-Flavonoide (Horváth, 2014).

### 3.5.2 Método de Folin Cioucalteu.

Método espectrofotométrico relativamente simple y ampliamente utilizado en la actualidad para la cuantificación de compuestos fenólicos totales presentes en extractos vegetales que se lleva a cabo mediante una reacción química que involucra la aplicación de reactivos que contiene tungsteno (ácido fosfotungstínico  $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y molibdeno (ácido fosfomolibdico  $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) (Cortez, 2018), los productos de esta reducción basada en transferencia de electrones en presencia de compuestos fenólicos y sustancias reductoras no fenólicas a pH básico forman cromógenos de color azul con absorción de luz en el espectro a 760 nm proporcional a la concentración de compuestos fenólicos (Lamuela, 2017).



**Figura 8** Reacción del ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Muñoz, 2017).

## 4 Metodología de investigación.

### 4.1 Diseño de la Investigación.

El presente estudio está diseñado tomando en consideración hacia donde está enfocada la investigación, que resultados son los esperados, como se pretende alcanzar tales resultados y las variables a ser manipuladas y controladas por el investigador.

#### 4.1.1 Enfoque

La investigación se sustenta bajo el fundamento del paradigma cuantitativo, cuyo enfoque se centra en lo medible (medible), motivo por el cual está sujeto a generación de conocimiento a través de la experimentación con la finalidad de conocer el comportamiento de una variable / respuesta.

#### 4.1.2 Nivel de investigación.

La investigación pretende establecer la influencia de una variable sobre otra, para lo cual se hará uso de un nivel de investigación explicativo, tomando en consideración que es un nivel multifactorial que permite asociar variables dependientes e independientes que se relacionan directamente a una causa/efecto.

### 4.1.3 Tipo de investigación.

Se empleó para este estudio la investigación de tipo documental puesto que es necesario realizar una minuciosa recopilación de información asociada a estudios previos en fuentes bibliográficas primarias a fin de mantener una base sólida para el sustento de la investigación. Adicionalmente, se aplicó la investigación de tipo experimental por el motivo que el investigador manipuló y controló las variables a fin de demostrar una hipótesis y obtener resultados congruentes.

## 4.2 Hipótesis

### 4.2.1 Hipótesis de trabajo.

La concentración de solvente y el método extractivo influyen sobre la concentración de flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Cannabis sativa*.

### 4.2.2 Hipótesis nula.

La concentración de solvente y el método extractivo no influyen sobre la concentración de flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Cannabis sativa*.

## 4.3 Diseño experimental.

En la investigación se aplicará un diseño AxB completo, en el cual los factores de estudios serán la concentración del solvente y el método de extracción, a su vez la variable respuesta será la concentración de flavonoides y fenoles totales expresada en mg de quercetina y mg de ácido gálico / 100 g de droga seca.

## 4.4 Sistema de variables.

**Tabla 1** Sistema de variables.

<b>Variable Independiente</b>	<b>Variable dependiente</b>
Concentración de solvente de extracción	Concentración de flavonoides y fenoles totales
Tipo de método de extracción	

Elaborado por: Guanochanga C.

#### 4.4.1 Variables y niveles.

**Tabla 2** Variables y Niveles.

<b>Variables</b>		<b>Nivel</b>	
Concentración de solvente (etanol)	C	1	50 °GL
		2	70°GL
		3	80°GL
Método de extracción	M	1	Maceración dinámica (MD)
		2	Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Elaborado por: Guanochanga C.

#### 4.4.2 Tratamiento de las variables.

**Tabla 3** Tratamiento de Variables

		<b>Concentración de solvente</b>		
		<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
<b>Método de extracción</b>	<b>MD</b>	C1MD	C2MD	C3MD
	<b>EAU</b>	C1EAU	C2EAU	C3EAU

Elaborado por: Guanochanga C.

## 5 Materiales y metodología

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Materia prima.

Las hojas de la especie vegetal *Cannabis sativa*, fueron recolectadas durante la etapa de floración en el cultivo de la empresa KAÑAMU593 S.A, ubicado en Tabacundo (latitud: 0.028849, longitud: -78.20677), posterior se procedió a realizar la clasificación del material vegetal con el fin de eliminar material extraño. Las hojas fueron separadas de los tallos y secados a temperatura ambiente entre 18-20°C sin exposición directa al sol y humedad relativa entre 40-45% por 3 días. El material vegetal seco seguidamente fue almacenado en fundas de papel y sellado herméticamente para la etapa de molienda, en la cual las hojas secas fueron molidas en un procesador de alimentos con el fin alcanzar un tamaño de partícula moderadamente grueso de aproximadamente 710  $\mu\text{m}$ .

### 5.2 Equipos

- Espectrofotómetro UV-VIS SHIMADZU UV-MINI Modelo 1240
- Balanza analítica METTLER TOLEDO Modelo ML204
- Bomba de vacío GAST Modelo 3KYY6
- Agitador orbital THERMO SCIENTIFIC Modelo 4310
- Baño de ultrasonido FISHER SCIENTIFIC Modelo FS60
- Agitador mixer vortex
- Procesador de alimentos Oster
- Refrigerador (2-8 °C)
- Micropipeta 100-1000  $\mu\text{L}$
- Micropipeta 20-100  $\mu\text{L}$

### 5.3 Reactivos

- Alcohol potable 96%
- Etanol absoluto
- Agua destilada
- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio anhidro
- Nitrito de sodio
- Cloruro de aluminio hexahidratado
- Hidróxido de sodio 1 N
- Estándar Quercetina
- Estándar Ácido Gálico

### 5.4 Insumos

- Papel aluminio
- Papel absorbente
- Plástico stretch
- Papel filtro cualitativo
- Tubos de ensayo con tapa 10 mL
- Balón aforado ámbar 10 mL
- Celdas de cuarzo
- Vaso de precipitación 100 mL
- Piseta
- Embudo Buchner
- Matraz Kitasato 250 mL
- Espátula
- Frasco ámbar 120 mL
- Probeta graduada 100 mL
- Puntas para micropipeta 100-1000 uL
- Puntas para micropipeta 20-100 uL

## 5.5 Metodología

### 5.5.1 Preparación de extractos por maceración dinámica.

Para la obtención de los extractos hidroalcohólicos se pesaron por triplicado en la balanza analítica 5 g de hojas de *Cannabis sativa* molida y se colocó en un vaso de precipitación de 100 mL, seguido se procedió a mezclar con 50 mL de etanol al 50, 70 y 80 %v/v respectivamente manteniendo una relación droga-solvente (1:10) obteniendo en total 9 muestras las cuales fueron colocadas en el agitador orbital a 125 rpm durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de agitación los extractos fueron filtrados al vacío y el volumen obtenido se aforó a 50 mL para ser almacenados en frascos ámbar a temperatura de 8°C.

### 5.5.2 Preparación de extractos por extracción asistida por ultrasonido.

Para el proceso de maceración asistida por ultrasonido las muestras se prepararon siguiendo el mismo procedimiento que en el numeral anterior. Las 9 muestras se colocaron en el baño de ultrasonido a temperatura de 20°C, tiempo de 30 minutos, potencia de 100 W, frecuencia de 42KHz. Culminado el proceso los extractos se filtraron al vacío y el volumen obtenido se aforó a 50 mL, posteriormente se almacenaron en frascos ámbar a temperatura de 8°C.

### 5.5.3 Determinación del peso específico de los extractos.

La densidad de los extractos se realizó mediante el método del picnómetro, para lo cual se pesó el picnómetro vacío y limpio y seco, con agua destilada a 20°C y con el extracto a 20°C y se tomaron los pesos respectivos. Se restaron el peso del picnómetro vacío del peso de llenado. El peso específico se obtuvo al dividir el peso del extracto contenido en el picnómetro sobre el peso de agua, ambos se determinaron a 25°C (USP, 2016).

$$\text{Peso específico} = \frac{\text{peso picn. muestra} - \text{peso picn. vacío}}{\text{peso picn. agua} - \text{peso picn. vacío}}$$

#### 5.5.4 Preparación de las soluciones estándar.

Se pesaron 0.05 g de ácido gálico y se disolvió en 10 mL de etanol absoluto para obtener una solución madre de 5 mg/mL (solución estándar 1). De igual forma se procedió a pesar 0.05 g de quercetina y se disolvió en 10 mL de etanol absoluto para obtener una solución madre de 5 mg/mL (solución estándar 2).

#### 5.5.5 Cuantificación de fenoles totales.

La cuantificación de fenoles totales de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Cannabis sativa* se realizó por el método de Folin Cioucalteu acorde a la metodología utilizada por (Shirazi, 2014) y modificada para la presente investigación, para lo cual se preparó la curva de calibración a partir de diluciones en etanol absoluto de la solución estándar 1 a concentraciones de 5, 2.5, 1, 0.5 0.1 mg/mL. En un tubo de ensayo de 10 mL se colocó 100 uL de cada una de las soluciones estándar y se añadió 500 uL de agua destilada, seguido 100 uL del reactivo de Folin Ciocalteu, se agitó para homogenizar la mezcla y se dejó reposar por 6 minutos. Transcurrido el intervalo de reposo se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio 7%, finalmente se añadieron 500 uL de agua destilada y se agitó para homogenizar la mezcla. Las muestras se dejaron reposar por 90 minutos, tiempo después del cual se procedió a leer en el espectrómetro a 760 nm. El mismo procedimiento fue llevado a cabo para cada una de las muestras de los extractos hidroalcohólicos.

#### 5.5.6 Cuantificación de flavonoides totales.

La cuantificación de flavonoides totales de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Cannabis sativa* se realizó por el método de colorimétrico del cloruro de aluminio metodología utilizada por (Shirazi, 2014) y modificada para la presente investigación, se preparó la curva de calibración a partir de diluciones en etanol absoluto de la solución estándar 2 a concentraciones de 5,2.5, 1,0.5, 0.1 mg/mL. En un tubo de ensayo se colocó 100 uL de cada una de las soluciones estándar y se mezcló con 500 uL de etanol absoluto, 100 uL de la solución de nitrito de sodio

( $\text{NaNO}_2$ ) 5% fue añadido a la mezcla anterior y se dejó reposar por 6 minutos. Transcurrido este lapso, 150 uL de solución de cloruro de aluminio 10% fueron añadidos y se dejó reposar por 5 minutos. Finalmente se añadió 200 uL de solución de hidróxido de sodio 1N y 1ml de etanol absoluto. Las muestras se dejaron reposar por 30 minutos y se leyeron las absorbancias a 510 nm.

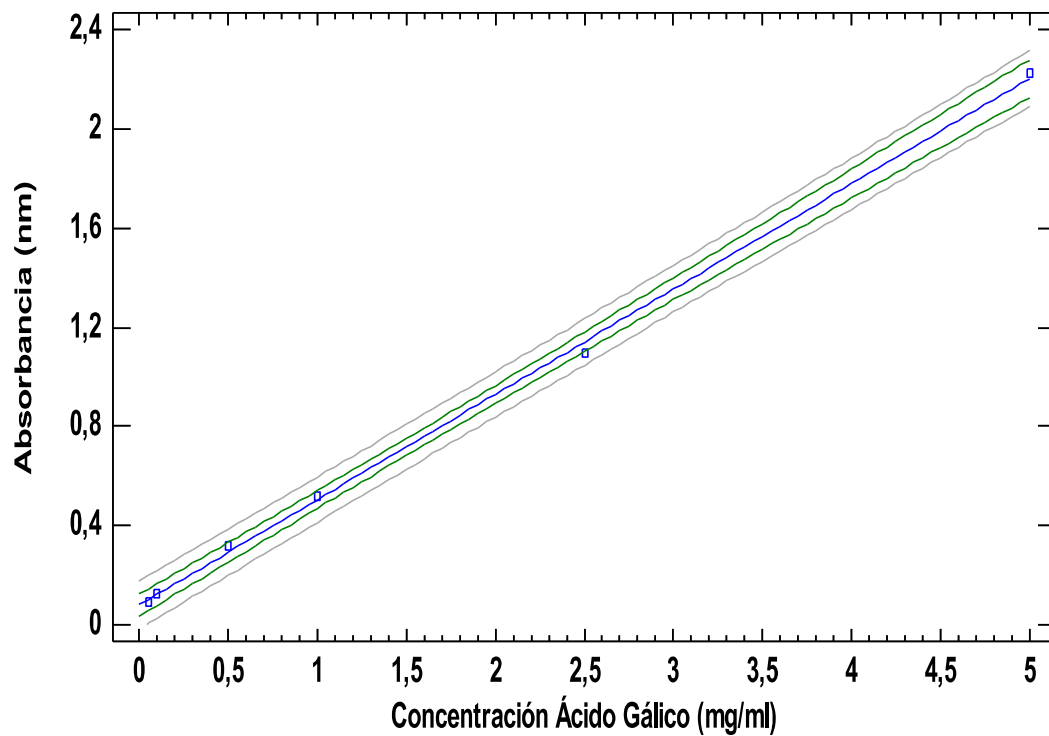
## 6 Resultados y discusión

### 6.1 Curva de calibración de Ácido Gálico.

**Tabla 4** Absorbancias de los estándares de Ácido Gálico.

Estándar	Concentración (mg/mL)	Absorbancia (nm)
1	5	2,226
2	2,5	1,091
3	1	0,516
4	0,5	0,311
5	0,1	0,124
6	0,05	0,089

Elaborado por: Guanochanga C.



**Figura 9** Curva de calibración de Ácido Gálico.

De acuerdo a los resultados de la Tabla 4, la comparación de modelos alternativos apuntan que los datos se ajustan a un modelo lineal (Ver Figura 9) con un coeficiente de correlación igual  $r^2 = 0.99890$  de tal manera que existe una relación

directa entre la concentración y la absorbancia, producto de la regresión lineal se plantea la siguiente expresión para la cuantificación de fenoles totales:

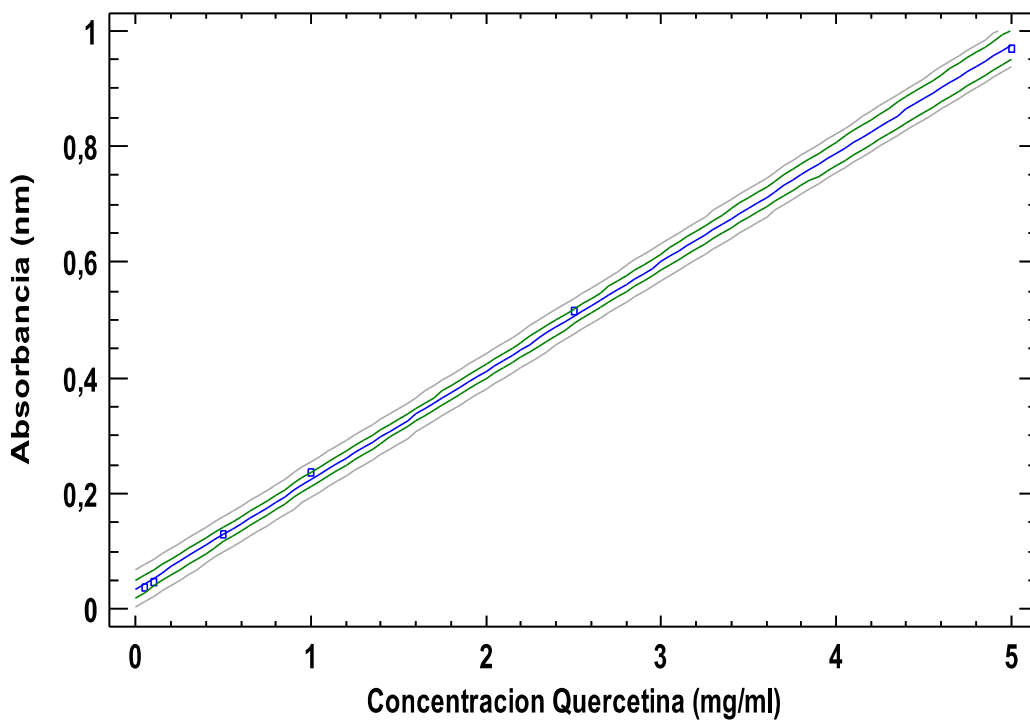
$$\text{Abs} = 0.0768949 + 0.425752 * \text{Conc.}$$

## 6.2 Curva de calibración de Quercetina.

**Tabla 5** Absorbancias de los estándares de Quercetina.

Estándar	Concentración (mg/mL)	Absorbancia (nm)
1	5	0,969
2	2,5	0,514
3	1	0,237
4	0,5	0,129
5	0,1	0,047
6	0,05	0,037

Elaborado por: Guanochanga C.



**Figura 10** Curva de calibración de Quercetina.

De acuerdo a los resultados de la Tabla 5, los modelos alternativos apuntan que los datos se ajustan a un modelo lineal (Ver Figura 10) con un coeficiente de correlación igual  $r^2 = 0.99937$  de tal manera que existe una relación directa entre

la concentración y la absorbancia, producto de la regresión lineal se plantea la siguiente expresión para la cuantificación de flavonoides totales:

$$\text{Abs} = 0.0353697 + 0.188064 * \text{Conc.}$$

### 6.3 Cuantificación de fenoles totales por método de maceración dinámica.

**Tabla 6** Absorbancias de extractos hidroalcohólicos por maceración dinámica.

<b>Absorbancia extractos 760 nm</b>		
<b>Mezcla Etanol-Agua 50%</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
0,643	0,655	0,664
<b>Mezcla Etanol-Agua 70%</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
0,661	0,69	0,671
<b>Mezcla Etanol-Agua 80 %</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
0,772	0,762	0,731

Elaborado por: Guanochanga C.

La Tabla 6 muestra las absorbancias obtenidas por triplicado de las muestras de los extractos hidroalcohólicos a diferente concentración de solvente, los fenoles totales se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7** Fenoles totales de extractos hidroalcohólicos por maceración dinámica.

<b>Fenoles Totales</b>		
<b>Mezcla Etanol-Agua 50 %</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
93,34	95,32	93,22
<b>Mezcla Etanol-Agua %</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
91,23	97,35	94,33
<b>Mezcla Etanol-Agua 80 %</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
107,10	105,56	100,78

Elaborado por: Guanochanga C.

La cuantificación de fenoles totales de los extractos obtenidos por maceración dinámica (Ver Figura 11) a diferentes concentraciones de solvente se expresa

como miligramos de ácido gálico por cada 100 g de droga seca bajo la siguiente expresión:

$$FT = \frac{[Conc.] * FD * V * 100}{W}$$

[Conc.]= resultado obtenido de la ecuación de regresión lineal expresado en mg de ácido gálico / mL de extracto

FD= factor de dilución de la muestra

V= alícuota de extracto utilizado en el ensayo (mL)

W= peso de droga seca inicial (g)

### 6.3.1 Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por maceración dinámica.

**Tabla 8** ANOVA de fenoles totales por maceración dinámica.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	214,35	2	107,17	14,88	0,0047
Intra grupos	43,23	6	7,20		
<b>Total (Corr.)</b>	257,58	8			

Elaborado por: Guanochanga C.

**Tabla 9** Resumen estadístico de fenoles totales por maceración dinámica.

Mezcla solvente	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
C1 (50%)	3	93,96	1,17	1,25%	93,22	95,32	2,10
C2 (70%)	3	94,30	3,06	3,24%	91,23	97,35	6,12
C3 (80%)	3	104,48	3,29	3,15%	100,78	107,1	6,32

Elaborado por: Guanochanga C.

El análisis de varianza muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los fenoles totales obtenidos por maceración dinámica a concentraciones de solvente de 50%,70% y 80% puesto que el valor-P es menor que 0,05 (Ver Tabla 8), los resultados de las medias obtenidos en el resumen estadístico indican que existe influencia de la concentración de solvente sobre la concentración de fenoles totales con la concentración 80% con mejor rendimiento respecto a los otros dos tratamientos (Ver Tabla 9).

### 6.3.2 Prueba de múltiples rangos por método Tukey.

**Tabla 10** Comparación de grupos homogéneos de fenoles totales por maceración dinámica.

Mezcla solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C1 (50%)	3	93,96	A
C2 (70%)	3	94,30	A
C3 (80%)	3	104,48	B

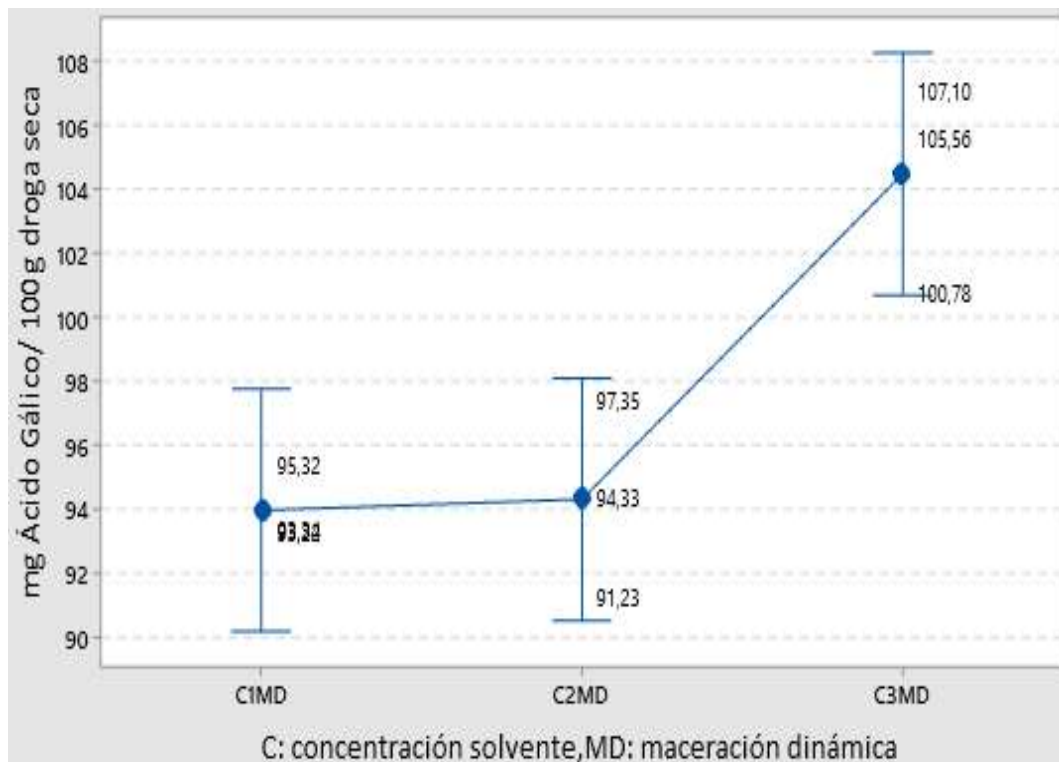
Elaborado por: Guanochanga C.

**Tabla 11** Comparación múltiple entre medias de fenoles totales por maceración dinámica.

Contraste	Sig.	Diferencia +/-	Límites
C1 - C2		-0,34	6,72469
C1 - C3	*	-10,52	6,72469
C2 - C3	*	-10,17	6,72469

Elaborado por: Guanochanga C.

La prueba de múltiples rangos permitió determinar los valores medios significativamente diferentes, los contrastes obtenidos entre cada par de medias (Ver Tabla 11) indican que la media de fenoles totales entre la concentración de solvente 50% y 70 % no presentan diferencia significativa, por otro parte se evidencia que la concentración 80% tiene un porcentaje de rendimiento de 10,1 % mayor respecto a la concentración 50% y un rendimiento de 9,7 % mayor respecto a la concentración 70%. El análisis de grupos homogéneos (Ver Tabla 10) corrobora lo antes mencionado evidenciándose la presencia de dos grupos (C1 y C2) que muestran diferencia significativa con respecto al último grupo (C3), de tal manera que el tratamiento más eficiente es concentración 80%.



**Figura 11** Intervalos de fenoles totales obtenidos a concentración de solvente 50%,70% y 80% por maceración dinámica.

## 6.4 Cuantificación de fenoles totales por método de extracción asistida por ultrasonido.

**Tabla 12** Absorbancias de extractos hidroalcohólicos por extracción asistida por ultrasonido.

Absorbancia extractos 760 nm		
Mezcla Etanol-Agua 50 %		
Lectura MAU1	Lectura MAU2	Lectura MAU3
0,679	0,664	0,694
Mezcla Etanol-Agua 70 %		
Lectura MAU1	Lectura MAU2	Lectura MAU3
0,720	0,738	0,719
Mezcla Etanol-Agua 80 %		
Lectura MAU1	Lectura MAU2	Lectura MAU3
0,761	0,787	0,809

Elaborado por: Guanochanga C.

La Tabla 12 muestra las absorbancias obtenidas por triplicado de los extractos hidroalcohólicos a diferente concentración de solvente, los fenoles totales se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13** Fenoles totales de extractos hidroalcohólicos por extracción asistida por ultrasonido.

Fenoles Totales		
Mezcla Etanol-Agua 50 %		
Lectura MAU1	Lectura MAU2	Lectura MAU3
92,77	90,46	95,08
Mezcla Etanol-Agua 70 %		
Lectura MAU1	Lectura MAU2	Lectura MAU3
99,09	101,86	98,94
Mezcla Etanol-Agua 80 %		
Lectura MAU1	Lectura MAU2	Lectura MAU3
105,41	109,41	112,80

Elaborado por: Guanochanga C.

La cuantificación de fenoles totales de los extractos obtenidos por extracción asistida por ultrasonido a diferentes concentraciones de solvente se muestra en la Tabla 13 expresados como miligramos de ácido gálico por cada 100 g de droga seca (Ver Figura 12).

#### 6.4.1 Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por extracción asistida por ultrasonido.

**Tabla 14** ANOVA de fenoles totales por extracción asistida por ultrasonido.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	407,34	2	203,67	28,13	0,0009
Intra grupos	43,44	6	7,24		
<b>Total (Corr.)</b>	450,79	8			

Elaborado por: Guanochanga C.

**Tabla 15** Resumen estadístico de fenoles totales por maceración dinámica.

Mezcla solvente	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
C1 (50%)	3	92,77	2,31	2,49%	90,46	95,08	4,62
C2 (70%)	3	99,96	1,64	1,64%	98,94	101,86	2,92
C3 (80%)	3	109,20	3,69	3,38%	105,41	112,8	7,39

Elaborado por: Guanochanga C.

El análisis de varianza indica diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los fenoles totales obtenidos por extracción asistida por ultrasonido a concentraciones de solvente de 50%,70% y 80% puesto que el que el valor-P es

menor que 0,05 (Ver Tabla 14), los resultados de las medias obtenidos en el resumen estadístico (Ver Tabla 15) permite determinar que existe influencia de la concentración de solvente sobre la concentración de fenoles totales.

### 6.4.2 Prueba de múltiples rangos por método Tukey.

**Tabla 16** Comparación de grupos homogéneos de fenoles totales por extracción asistida por ultrasonido.

Mezcla solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C1(50%)	3	92,77	A
C2(70%)	3	99,96	B
C3(80%)	3	109,20	C

Elaborado por: Guanochanga C.

**Tabla 17** Comparación múltiple entre medias de fenoles totales por extracción asistida por ultrasonido.

Contraste	Sig.	Diferencia +/-	Límites
C1 - C2	*	-7,19	6,74153
C1 - C3	*	-16,43	6,74153
C2 - C3	*	-9,24	6,74153

Elaborado por: Guanochanga C.

La prueba de múltiples rangos permitió determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, en los contrastes (Ver Tabla 17) se aprecia que entre las medias de fenoles totales existe diferencia significativa con un nivel de confianza de 95% donde la concentración 80% tiene un porcentaje de rendimiento de 15.1 % mayor respecto a la concentración 50% y un rendimiento de 8.5 % mayor respecto la concentración 70%. El análisis de grupos homogéneos corrobora lo antes mencionado y se evidencia la presencia de tres grupos que muestran diferencia significativa entre sí estableciendo la concentración 80% como la más eficiente (Ver Tabla 16).

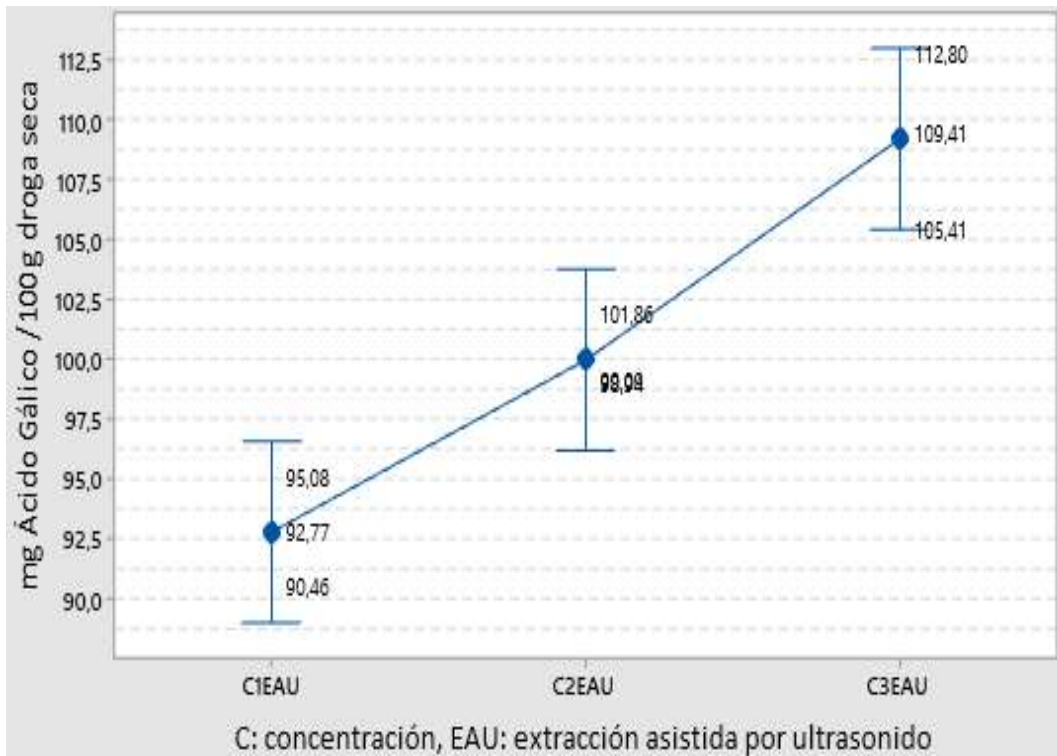


Figura 12 Intervalos de fenoles totales obtenidos a concentración de solvente 50%,70% y 80% por extracción asistida por ultrasonido.

## 6.5 Comparación entre métodos de extracción y concentración de solvente para fenoles totales.

### 6.5.1 Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.

Tabla 18 ANOVA de fenoles totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	677,26	5	135,45	17,04	<0,0001
Intra grupos	95,37	12	7,94		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>772,64</b>	<b>17</b>			

Elaborado por: Guanochanga C.

El análisis de varianza muestra un valor P menor a 0.05 (Ver Tabla 18) por lo tanto se establece que existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de 95% de confianza entre las medias de fenoles totales extraídos por el método de maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido demostrando así que

los métodos extractivos empleados difieren en su eficiencia bajo las respectivas condiciones de trabajo.

### 6.5.2 Prueba de múltiples rangos por método Tukey.

**Tabla 19** Comparación de grupos homogéneos de fenoles totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.

Mezcla solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C1EAU	3	92,77	A
C2MD	3	93,89	A
C1MD	3	93,92	A
C2EAU	3	99,96	AB
C3MD	3	104,48	BC
C3EAU	3	109,20	C

Elaborado por: Guanochanga C.

**Tabla 20** Comparación múltiple entre medias de fenoles totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.

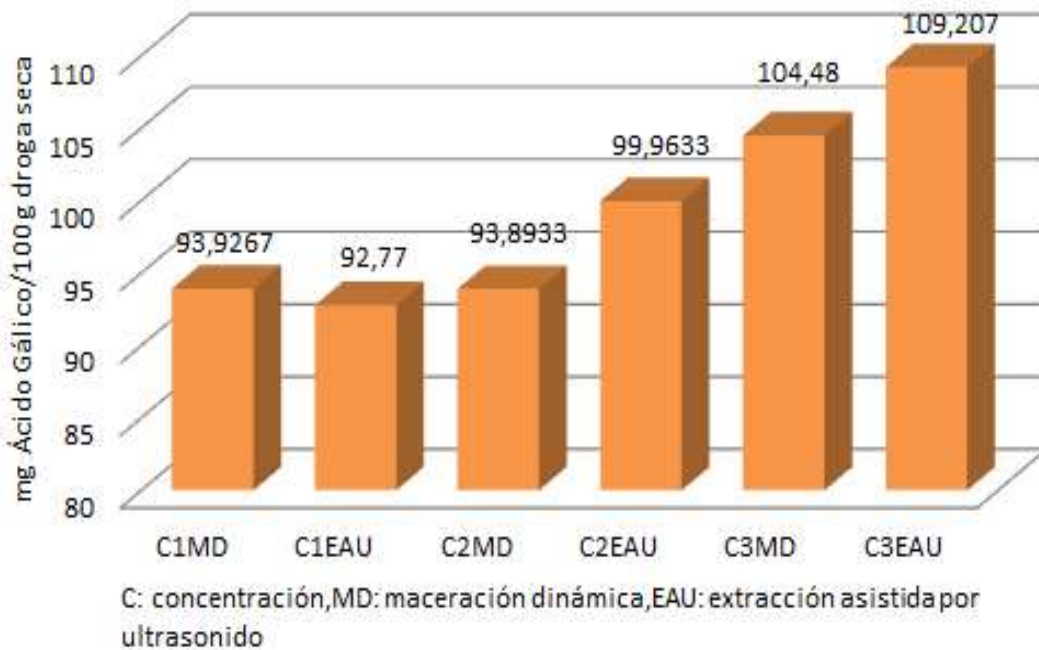
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<b>C1MD - C1EAU</b>		1,15	7,73296
C1MD - C2MD		0,03	7,73296
C1MD - C2EAU	*	-6,03	7,73296
C1MD - C3MD	*	-10,55	7,73296
C1MD - C3EAU	*	-15,28	7,73296
C1EAU - C2MD		-1,12	7,73296
C1EAU - C2EAU	*	-7,19	7,73296
C1EAU - C3MD	*	-11,71	7,73296
C1EAU - C3EAU	*	-16,43	7,73296
<b>C2MD - C2EAU</b>	*	-6,07	7,73296
C2MD - C3MD	*	-10,58	7,73296
C2MD - C3EAU	*	-15,31	7,73296
C2EAU - C3MD		-4,51	7,73296
C2EAU - C3EAU	*	-9,24	7,73296
<b>C3MD - C3EAU</b>		-4,72	7,73296

Elaborado por: Guanochanga C.

Los contrastes indican que la concentración de solvente al 50% no influye significativamente en la cantidad final de fenoles totales obtenidos tanto por método de maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido. Por otra parte la concentración de solvente 70% presenta diferencia significativa con un

nivel de confianza del 95% entre las medias de concentración de fenoles totales y a su vez indica que el método de extracción asistida por ultrasonido es más óptimo con respecto a la maceración dinámica teniendo una diferencia de rendimiento de aproximadamente de 6,1 %. Sin embargo al comparar los fenoles totales con concentración de solvente 80 % (Ver Tabla 20) se aprecia que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos métodos de extracción (Ver Figura 15). Lo antes mencionado se puede corroborar con la presencia de 3 grupos homogéneos uno de ellos corresponde a la concentración de fenoles totales obtenidos por ultrasonido y maceración dinámica con solvente de extracción 80% lo cual corrobora que no existe diferencia significativa (Ver Tabla 19).

### Método de extracción vs. Concentración de Solvente



**Figura 13** Comparación entre las medias de fenoles totales obtenidos por el método de maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido a concentración de solvente 50%,70% y 80%.

## 6.6 Cuantificación de flavonoides totales por método de maceración dinámica.

**Tabla 21** Absorbancias de extractos hidroalcohólicos por maceración dinámica.

<b>Absorbancia extractos 510 nm</b>		
<b>Mezcla Etanol-Agua 50 %</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
0,155	0,149	0,151
<b>Mezcla Etanol-Agua 70 %</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
0,169	0,173	0,176
<b>Mezcla Etanol-Agua 80 %</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
0,19	0,187	0,184

Elaborado por: Guanochanga C.

La Tabla 21 indica las absorbancias obtenidas por triplicado de los extractos hidroalcohólicos a diferente concentración de solvente.

**Tabla 22** Flavonoides totales de extractos hidroalcohólicos por maceración dinámica.

<b>Flavonoides Totales</b>		
<b>Mezcla Etanol-Agua 50%</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
41,4747	39,3945	38,6123
<b>Mezcla Etanol-Agua 70%</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
43,2019	45,9587	46,9605
<b>Mezcla Etanol-Agua 80%</b>		
<b>Lectura MD1</b>	<b>Lectura MD2</b>	<b>Lectura MD3</b>
49,9911	49,0212	48,0513

Elaborado por: Guanochanga C.

La cuantificación de flavonoides totales de los extractos hidroalcohólicos se muestra en la Tabla 22 expresados como miligramos de quercetina por cada 100 g de droga seca a diferentes concentraciones de solvente de extracción (Ver Figura 13).

### 6.6.1 Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por maceración dinámica.

**Tabla 23** ANOVA de flavonoides totales por maceración dinámica.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	128,59	2	64,29	27,88	0,0009
Intra grupos	13,83	6	2,30		
<b>Total (Corr.)</b>	142,43	8			

Elaborado por: Guanochanga C.

**Tabla 24** Resumen estadístico de flavonoides totales por maceración dinámica.

Mezcla solvente	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
C1 (50%)	3	39,82	1,47	3,71%	38,61	41,47	2,86
C2 (70%)	3	45,37	1,94	4,28%	43,20	46,96	3,75
C3 (80%)	3	49,02	0,96	1,97%	48,05	49,99	1,93

Elaborado por: Guanochanga C.

En el análisis de varianza ANOVA (Ver Tabla 23) se observa un valor P menor a 0,05 lo que indica que existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95% entre las medias de la concentración de flavonoides totales de los extractos hidroalcohólicos obtenidos a concentraciones de solvente de 50%,70% y 80%, este resultado apunta que existe efecto directo del solvente de extracción sobre la concentración final de flavonoides en específico la concentración de 80% que presenta un valor superior respecto a los otros dos tratamientos (Ver Tabla 24).

### 6.6.2 Prueba de múltiples rangos por método Tukey.

**Tabla 25** Comparación de grupos homogéneos de flavonoides totales por maceración dinámica.

Mezcla solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C1 (50%)	3	39,82	A
C2 (70%)	3	45,37	B
C3 (80%)	3	49,02	B

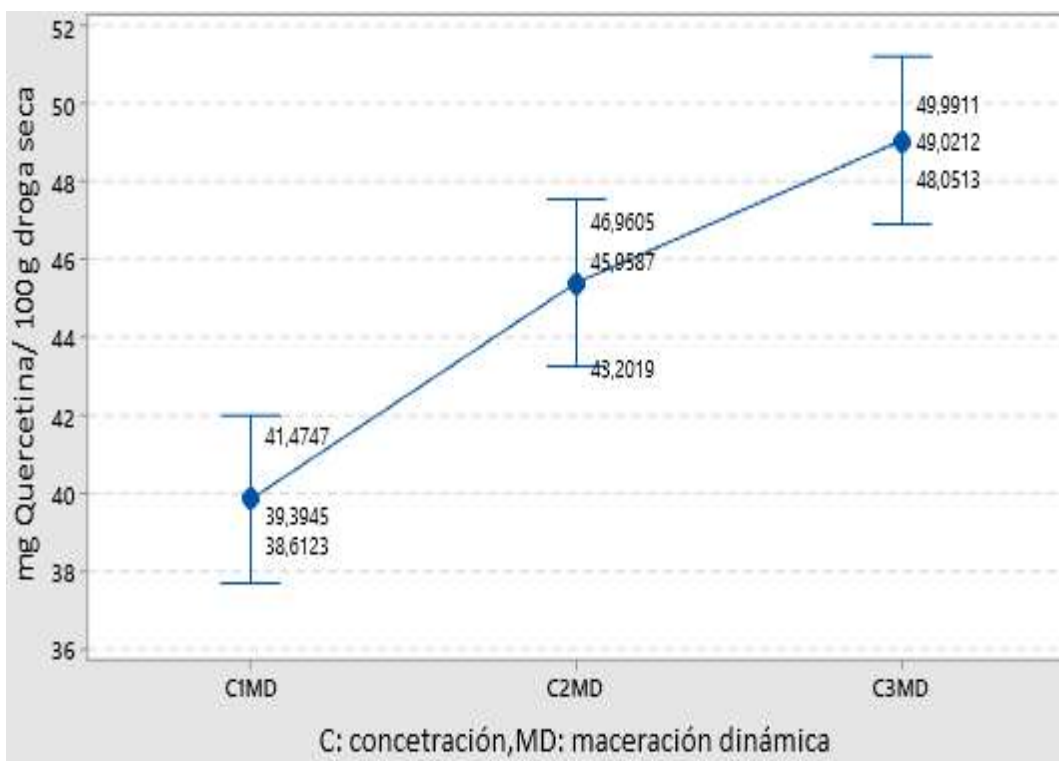
Elaborado por: Guanochanga C.

**Tabla 26** Comparación múltiple entre medias de flavonoides totales por maceración dinámica.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
C1 - C2	*	-5,54	3,80433
C1 - C3	*	-9,19	3,80433
C2 - C3		-3,64	3,80433

Elaborado por: Guanochanga C.

Los contrastes de las prueba de múltiples rangos indican que existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza de 95% entre las medias de flavonoides totales a concentraciones de solvente de extracción de 50%, 70% y 80% evidenciándose por la presencia de dos grupos homogéneos (Ver Tabla 25) mostrando que las medias son diferentes, la concentración de solvente 80% indica un porcentaje de rendimiento de 18.8% mayor con respecto a la concentración de solvente 50% a su vez la concentración 70% presenta un rendimiento de 12.2% mayor respecto a la concentración 50%, por otra parte la concentración de solvente 80% no presenta diferencia significativa respecto a la concentración 70% esto indica que el solvente de extracción a concentración 70% en términos de optimización de recursos (solvente) es igual de eficiente que la concentración 80% (Ver Tabla 26).



**Figura 14** Intervalos de flavonoides totales obtenidos a concentración de solvente 50%, 70% y 80% por maceración dinámica.

## 6.7 Cuantificación de flavonoides totales por extracción asistida por ultrasonido.

**Tabla 27** Absorbancias de extractos hidroalcohólicos por extracción asistida por ultrasonido.

<b>Absorbancia extractos 510 nm</b>		
<b>Mezcla Etanol-Agua 50%</b>		
<b>Lectura MAU1</b>	<b>Lectura MAU2</b>	<b>Lectura MAU3</b>
0,226	0,24	0,223
<b>Mezcla Etanol-Agua 70%</b>		
<b>Lectura MAU1</b>	<b>Lectura MAU2</b>	<b>Lectura MAU3</b>
0,188	0,170	0,167
<b>Mezcla Etanol-Agua 80%</b>		
<b>Lectura MAU1</b>	<b>Lectura MAU2</b>	<b>Lectura MAU3</b>
0,122	0,113	0,126

Elaborado por: Guanochangea C.

La Tabla 27 indica las absorbancias obtenidas por triplicado de los extractos hidroalcohólicos a diferente concentración de solvente.

**Tabla 28** Flavonoides totales de extractos hidroalcohólicos por extracción asistida por ultrasonido.

<b>Flavonoides Totales</b>		
<b>Mezcla Etanol-Agua 50 %</b>		
<b>Lectura MAU1</b>	<b>Lectura MAU2</b>	<b>Lectura MAU3</b>
61,6297	70,9434	60,6598
<b>Mezcla Etanol-Agua 70%</b>		
<b>Lectura MAU1</b>	<b>Lectura MAU2</b>	<b>Lectura MAU3</b>
49,3445	41,0912	42,5553
<b>Mezcla Etanol-Agua 80%</b>		
<b>Lectura MAU1</b>	<b>Lectura MAU2</b>	<b>Lectura MAU3</b>
28,0071	25,0974	29,3003

Elaborado por: Guanochangea C.

La cuantificación de flavonoides totales de los extractos hidroalcohólicos se muestra en la Tabla 28 expresados como miligramos de quercetina por cada 100 g de droga seca a diferentes concentraciones de solvente de extracción (Ver Figura 14).

### 6.7.1 Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por extracción asistida por ultrasonido.

**Tabla 29** ANOVA de flavonoides totales por extracción asistida por ultrasonido.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2052,32	2	1026,16	54,71	0,0001
Intra grupos	112,53	6	18,75		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>2164,86</b>	<b>8</b>			

Elaborado por: Guanochanga C.

**Tabla 30** Resumen estadístico de flavonoides totales por maceración dinámica.

Mezcla solvente	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
C1 (50%)	3	64,41	5,67	8,81%	60,65	70,94	10,28
C2 (70%)	3	44,33	4,40	9,93%	41,09	49,34	8,25
C3 (80%)	3	27,46	2,15	7,83%	25,09	29,30	4,20

Elaborado por: Guanochanga C.

El análisis de varianza ANOVA indica que existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza de 95% entre las medias de la concentración de flavonoides totales de los extractos hidroalcohólicos a concentración de solvente de 50%,70%,80% esto se evidencia en el valor P obtenido que es menor a 0,05 (Ver Tabla 29), en el resumen estadístico se puede observar un valor medio de concentración de flavonoides correspondiente a concentración de solvente 80% que difiere significativamente de las concentraciones de 70% y 80% de tal manera que el solvente y el método utilizado influye significativamente sobre la cantidad final de flavonoides (Ver Tabla 30).

### 6.7.2 Pruebas de Múltiple Rangos por método Tukey.

**Tabla 31** Comparación de grupos homogéneos de flavonoides totales por extracción asistida por ultrasonido.

Mezcla solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C3(80%)	3	27,46	A
C2(70%)	3	44,33	B
C1(50%)	3	64,41	C

Elaborado por: Guanochanga C.

**Tabla 32** Comparación múltiple entre medias de flavonoides totales por extracción asistida por ultrasonido.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
C1 - C2	*	20,08	10,8496
C1 - C3	*	36,94	10,8496
C2 - C3	*	16,86	10,8496

Elaborado por: Guanochangea C.

Se tiene la presencia de 3 grupos homogéneos que corrobora la diferencia significativa entre las medias de cada tratamiento (Ver Tabla 31), por otra parte en los contrastes obtenidos se observa que la concentración de solvente 50% presenta un 57.4% de rendimiento mayor respecto a la concentración 80% evidenciándose así una diferencia de 36,9427 mg Quercetina/100 g droga entre ambos tratamientos. De igual forma al comparar la concentración de solvente 50% y 70% se tiene que la primer tratamiento tiene un rendimiento de 31.2% mayor respecto al segundo esto se evidencia al tener una diferencia entre concentración media de 20.0886 mg Quercetina/100g droga. La comparación entre la concentración 70% y 80% indica que el primer tratamiento presenta un rendimiento de 38.1% mayor respecto a la concentración 80% tendiendo una diferencia de valores medios de concentración de 16.8621 mg Quercetina/100 g droga entre ambos tratamientos, una vez comparado los tratamientos se define al tratamiento de concentración 50% presenta mayor eficiencia en la extracción de flavonoides por el método de extracción asistida por ultrasonido (Ver Tabla 32).

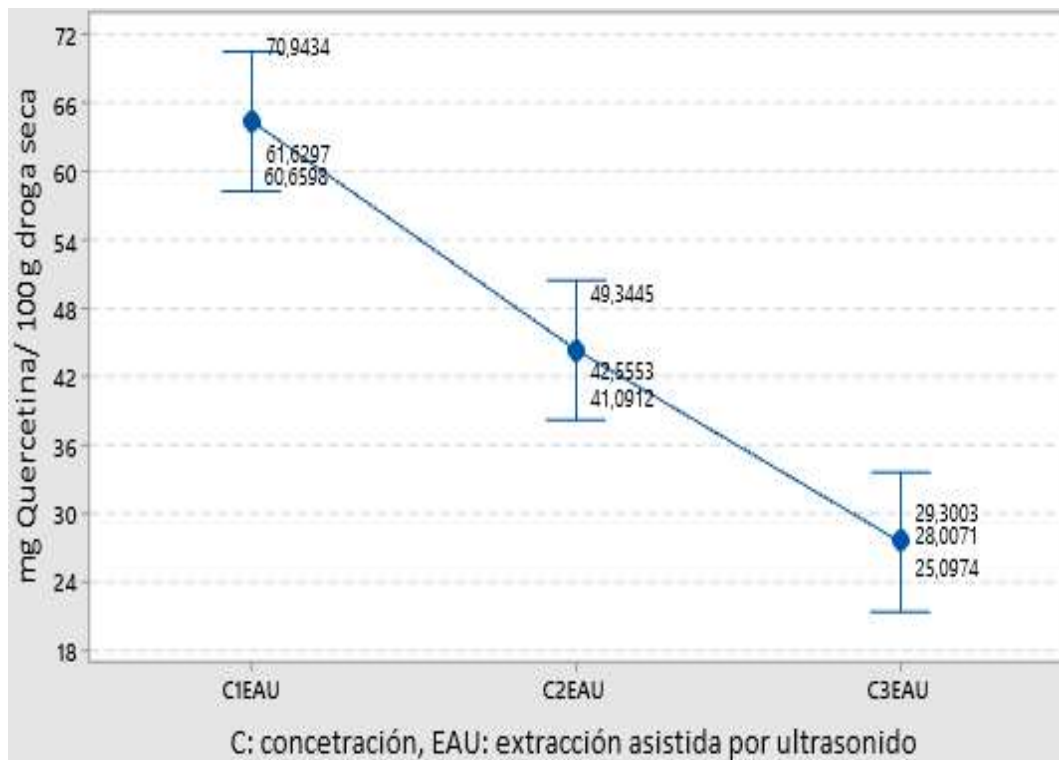


Figura 15 Intervalos de flavonoides totales obtenidos a concentración de solvente 50%,70% y 80% por extracción asistida por ultrasonido.

## 6.8 Comparación entre métodos de extracción y concentración de solvente para flavonoides totales.

### 6.8.1 Análisis de varianza ANOVA para extractos obtenidos por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.

Tabla 33 ANOVA de flavonoides totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2182,90	5	436,58	41,46	<0,0001
Intra grupos	126,36	12	10,53		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>2309,27</b>	<b>17</b>			

Elaborado por: Guanochanga C.

El análisis de varianza ANOVA con un valor P menor a 0.05 indica que existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza de 95% entre los valores medios de concentración de flavonoides totales expresados en mg de

Quercetina por cada 100 g de droga seca obtenidos a diferente concentración de solvente 50%, 70%, 80% por el método de maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido (Ver Tabla 33).

### 6.8.2 Pruebas de Múltiple Rangos por método Tukey.

**Tabla 34** Comparación de grupos homogéneos de flavonoides totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.

Mezcla solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C3EAU	3	27,46	A
C1MD	3	39,82	B
C2EAU	3	44,33	BC
C2MD	3	45,37	BC
C3MD	3	49,02	C
C1EAU	3	64,41	D

Elaborado por: Guanochanga C.

**Tabla 35** Comparación múltiple entre medias de flavonoides totales por maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<b>C1MD - C1EAU</b>	*	-24,58	8,90102
C1MD - C2MD		-5,54	8,90102
C1MD - C2EAU		-4,50	8,90102
C1MD - C3MD	*	-9,19	8,90102
C1MD - C3EAU	*	12,35	8,90102
C1EAU - C2MD	*	19,03	8,90102
C1EAU - C2EAU	*	20,08	8,90102
C1EAU - C3MD	*	15,38	8,90102
C1EAU - C3EAU	*	36,94	8,90102
<b>C2MD - C2EAU</b>		1,04	8,90102
C2MD - C3MD		-3,64	8,90102
C2MD - C3EAU	*	17,90	8,90102
C2EAU - C3MD		-4,69	8,90102
C2EAU - C3EAU	*	16,86	8,90102
<b>C3MD - C3EAU</b>	*	21,55	8,90102

Elaborado por: Guanochanga C.

En la prueba de múltiples rangos se identifican 4 grupos homogéneos (Ver Tabla 34) en los cuales todos los tratamientos que conforman cada grupo no presentan diferencia estadísticamente significativa entre sí (dentro de grupos), sin embargo las medias de

los 4 grupos si presentan diferencia estadísticamente significativa entre sí (entre grupo). Por otra parte el análisis de contrastes (Ver Tabla 35) entre tratamientos en los que se compara método de extracción y concentración de solvente de extracción se tiene que existe diferencia significativa de las medias de concentración de flavonoides totales entre los dos métodos de extracción a concentración de solvente 50% mostrando que la extracción asistida por ultrasonido presenta un porcentaje de rendimiento de 38,2% mayor respecto a maceración dinámica (Ver Figura 16). El tratamiento correspondiente a concentración 70% indica que no existe diferencia significativa entre el valor medio de la concentración de flavonoides totales obtenido por ambos métodos de extracción lo que apunta un rendimiento similar. La concentración de solvente 80% muestra diferencia significativa entre ambos métodos mostrando que la maceración dinámica tiene un rendimiento de 43.9% mayor respecto a extracción asistida por ultrasonido.

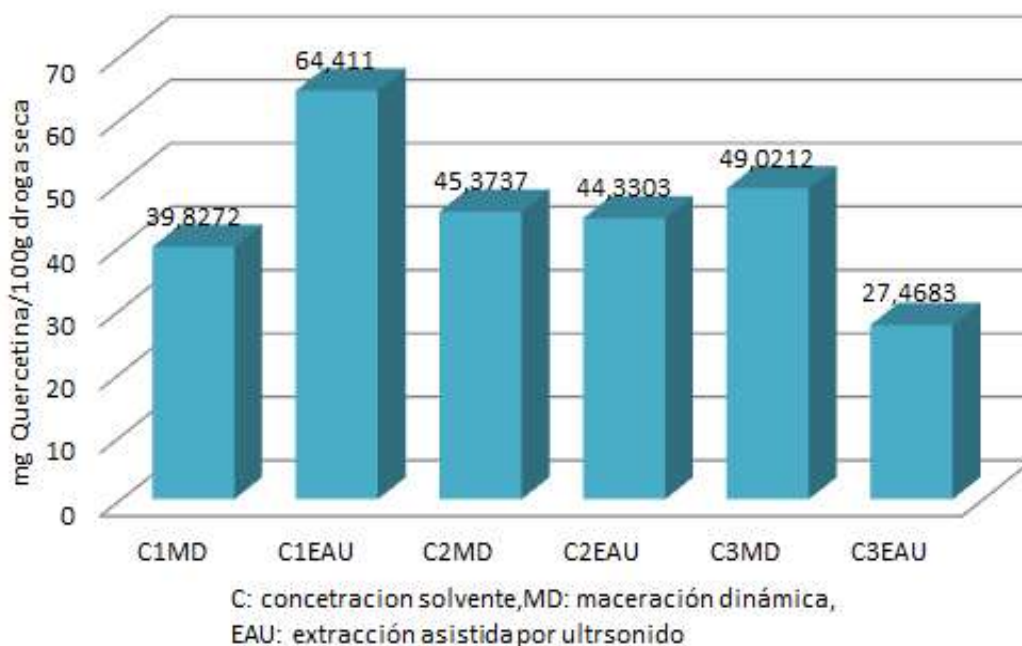
Al comparar los dos métodos de extracción y concentración de solvente (50%,70%,80%) se esperaría que a mayor concentración de solvente mayor es la capacidad extractiva de metabolitos secundarios sin embargo la selectividad del solvente juega un papel importante dentro del proceso extractivo puesto que de este dependerá que los extractos obtenidos puedan contener constituyentes químicos con determinadas características en este caso específico flavonoides presentes en las hojas de *Cannabis sativa*, la literatura de estudios realizados sobre este amplio grupo de metabolitos secundarios presentan varias características y una de ellas corresponde que son compuestos polares de tal manera que para lograr extraer desde la matriz vegetal es necesario el uso de solventes polares cuya propiedad química se relaciona directamente con la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ), es decir mientras más polar sea el solvente mayor será esta constante (Sharapin, 2000) y al utilizar mezcla de solventes como etanol ( $\epsilon=24.3$ ) y agua ( $\epsilon=78.3$ ) se tiene una mezcla de solventes que darán una nueva constante dieléctrica del sistema. En el caso puntual de la presente investigación las proporciones utilizadas de etanol y agua 50% ( $\epsilon=51.3$ ), 70% ( $\epsilon=40.5$ ) y 80% ( $\epsilon=35.1$ ) se observa que la constante dieléctrica de cada sistema disminuye conforme aumenta la proporción de etanol y disminuye la proporción de agua y de esta forma se explica la razón por la cual la concentración de flavonoides totales de los

extractos hidroalcohólicos obtenidos por extracción asistida por ultrasonido es mayor al utilizar la concentración de solvente 50% respecto a las concentraciones de 70% y 80%.

Se confirma que no solo la concentración de solvente de extracción influyente en la concentración final de flavonoides además el método extractivo también desempeña un papel importante evidenciado en la concentración de flavonoides totales obtenidos por el método de maceración dinámica en el cual se observa que la concentración de solvente 70% y 80% presentan valores similares de flavonoides a pesar de que los sistemas tienen una constante dieléctrica más baja respecto al solvente 50% esto responde al tiempo de extracción el cual no fue una variable de trabajo pero es intrínseca del método.

Con los resultados obtenidos se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa demostrando que la concentración de solvente y el método extractivo influyen sobre la concentración de flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Cannabis sativa*.

### Método de extracción vs. Concentración de Solvente



**Figura 16** Comparación entre las medias de flavonoides totales obtenidos por el método de maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido a concentración de solvente 50%,70% y 80%.

## 7 Conclusiones

Se elaboró extractos hidroalcohólicos a concentración de solvente 50%, 70% y 80% de hojas de *Cannabis sativa* a través de maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido cuya concentración de fenoles y flavonoides totales fueron determinadas en la presente investigación como indicador para establecer variables óptimas de extracción.

La cuantificación de los extractos hidroalcohólicos permitió obtener valores de fenoles y flavonoides totales expresados en miligramos de Ácido Gálico y Quercetina respectivamente por cada 100 g de droga seca los cuales a través del análisis estadístico brindaron una amplia información de gran aporte a la investigación a fin de establecer el método de extracción y las variables más eficientes.

Considerando el tratamiento con mejor rendimiento de extracción de flavonoides totales de hojas de *Cannabis sativa* por maceración dinámica la mezcla de etanol-agua 70% con tiempo de extracción de 24 horas y agitación de 125 rpm, temperatura 22°C frente al método de extracción asistida por ultrasonido con solvente al 50%, tiempo de extracción 15 minutos, temperatura 25°C y frecuencia de 42 KHz, la investigación concluye como el proceso de extracción más eficiente la extracción asistida por ultrasonido. Adicionalmente conocidas las condiciones de trabajo que demostró mejor rendimiento en el método de extracción asistida ultrasonido se recomienda para futuros estudios incluir el tiempo de extracción como una variable de trabajo y conocer si podría estar influyendo directamente sobre la concentración total de flavonoides a intervalos de tiempo más cortos o largos respecto al utilizado en la presente investigación.

## Referencias

- Agarwal, C. (2018). Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from Cannabis Sativa L. *Jornal of Food Science*, 11.
- Ángeles, G. (2014). *Cannabis sativa L., a singular plant*. Obtenido de Cielo: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952014000400004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000400004)
- Bautista, J. (2021). Flavonoids in Cannabis sativa: Biosynthesis, Bioactivities, and Biotechnology. *ACS OMEGA*, 5.
- Brenneisen, R. (2002). *Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents*. Obtenido de Medicinal Genomics: <https://www.medicinalgenomics.com/wp-content/uploads/2011/12/Chemical-constituents-of-cannabis.pdf>
- Christelle, A. (2016). *Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules*. Obtenido de National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4740396/>
- Cortez, J. (2018). *Redalyc*. Obtenido de Determination of polyphenols in fruits added with vitamin C: methodology to improve the specificity of the Folin-Ciocalteu test: <https://www.redalyc.org/journal/813/81357541002/html/#:~:text=Se%20basa%20en%20la%20capacidad%20de%20los%20fenoles,con%20cualquier%20tipo%20de%20fenol%20formando%20complejos%20fosfomol%C3%ADbdico-fosfotungstico.>
- ElSohly, M. (2017). *Phytochemistry of Cannabis sativa L.* Obtenido de National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28120229/>
- Flores-Sanchez, I. J. (2008). *Secondary metabolism in Cannabis*. Obtenido de Researchgate: [https://www.researchgate.net/publication/225587671\\_Secondary\\_metabolism\\_in\\_Cannabis](https://www.researchgate.net/publication/225587671_Secondary_metabolism_in_Cannabis)
- Hielscher. (2022). *Hielscher Ultrasonics*. Obtenido de <https://www.hielscher.com/es/ultrasonic-extraction-and-its-working-principle.htm>
- Horváth, G. (2014). Obtenido de [http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011-0016\\_08\\_pharmacognosy\\_2/ch13.html](http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011-0016_08_pharmacognosy_2/ch13.html)
- Isidore, E. (2021). Extraction of Phenolic Compounds and Terpenes from Cannabis. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 24.
- Jin, D. (2020). Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes. *natureresearch*, 14.
- Jin, D. (2020). *Secondary Metabolites Profled*. Obtenido de National Center for Biotechnology Information:

- [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7039888/pdf/41598\\_2020\\_Article\\_60172.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7039888/pdf/41598_2020_Article_60172.pdf)
- Kasprzak, M. (Enero de 2012). *RSC Advances*. Obtenido de <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ra/c5ra05069c>
- Köhler, F. E. (1887). *Köhler's Medicinal Plants*. Obtenido de Alchimia: <https://www.alchimiaweb.com/blagen/anatomy-cannabis/>
- Lamuela, R. (2017). *Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity*. Obtenido de Wiley Online Library: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9781119135388.ch6#accessDenialLayout>
- Lowe, H. (2021). *Non-Cannabinoid Metabolites of Cannabis sativa L. with Therapeutic Potential*. Obtenido de Plants: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/2/400>
- Monton, C. (2019). Optimal condition of cannabis maceration to obtain the high cannabidiol and THC content. *SciELO*, 9.
- Muñoz, O. (2017). *Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales*. Obtenido de ResearchGate: [https://www.researchgate.net/publication/317098261\\_Nuevo\\_acercamiento\\_a\\_la\\_interaccion\\_del\\_reactivo\\_de\\_Folin-Ciocalteu\\_con\\_azucares\\_durante\\_la\\_cuantificacion\\_de\\_polifenoles\\_totales](https://www.researchgate.net/publication/317098261_Nuevo_acercamiento_a_la_interaccion_del_reactivo_de_Folin-Ciocalteu_con_azucares_durante_la_cuantificacion_de_polifenoles_totales)
- Pecal, A. (Febrero de 2014). *Springer*. Obtenido de [https://www.google.com/search?q=Evaluation+of+Aluminium+Complexation+Reaction+for+Flavonoid+Content+Assay&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab&gfe\\_rd=cr&dcr=0&ei=AMqMWvC-B4G5-AWjiZTwDQ](https://www.google.com/search?q=Evaluation+of+Aluminium+Complexation+Reaction+for+Flavonoid+Content+Assay&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab&gfe_rd=cr&dcr=0&ei=AMqMWvC-B4G5-AWjiZTwDQ)
- PharmaGrown. (s.f.). *Supercritical Fluid Extraction – Principle, Instrumentation, Applications*. Obtenido de PharmaGrown: <https://pharmagroww.com/supercritical-fluid-extraction/>
- Ramirez, C. L. (2019). *Cannabinoids: Extraction Methods, Analysis, and Physicochemical Characterization*. Obtenido de ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978044464183000004X>
- Rea, K. (2019). Biosynthesis of cannflavins A and B from Cannabis sativa L. *ELSEVIER*, 10.
- Resende, E. (2021). *PIAUHY*. Obtenido de <https://www.piauhy.com/extraction-of-compounds-from-the-cannabis-sativa-plant-piauhy-labs/#:~:text=The%20most%20traditional%20and%20simplest%20method%20of%20extracting,water%20until%20most%20of%20the%20ingredients%20are%20dissolved.>
- Rozanc, J. (2021). *Different Cannabis sativa Extraction Methods Result in Different Biological Activities against a Colon Cancer Cell Line and Healthy Colon Cells*. Obtenido de National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8002592/pdf/plants-10-00566.pdf>
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*.
- Shirazi, O. U. (2014). *Determination of total phenolic, flavonoid content and free radical scavenging activities of common herbs and spices*. Obtenido de Phytojournal: [https://www.phytojournal.com/vol3Issue3/Issue\\_sep\\_2014/29.1.pdf](https://www.phytojournal.com/vol3Issue3/Issue_sep_2014/29.1.pdf)

- Ubeed, H. M. (2021). *A Comprehensive Review on the Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Cannabis*. Obtenido de National Center for Biotechnology Information:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8840415/pdf/molecules-27-00604.pdf>
- USP. (2016). United States Pharmacopeia. United States of America.
- Vibrans, H. (2009). *Cannabis sativa L*. Obtenido de Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad:  
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/cannabaceae/cannabis-sativa/fichas/ficha.htm>

DERECHOS RESERVADOS

2022 © Universidad Politécnica Salesiana.

QUITO– ECUADOR – SUDAMÉRICA

**CARLOS ALBERTO GUANOCHANGA GUZMÁN**

***Optimización de la extracción de flavonoides de hojas de Cannabis sativa mediante maceración dinámica y extracción asistida por ultrasonido.***