

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN CRISTOBAL  
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Optimización de la obtención del extracto  
hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis  
sativa* L. “marihuana”. Ayacucho 2018.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICA

**PRESENTADO POR LA:**

**“Bach. MENDEZ PEREZ, Flor Anali”**

AYACUCHO – PERÚ

2018

A Dios, fuente inagotable de mis fortalezas en este camino que se llama "vida".

A mis padres, María y Feliciano por haberme dado la vida. A mi madre por demostrarme siempre su amor y su apoyo incondicional. A mi padre, a pesar de nuestra distancia.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por brindarme los espacios necesarios para la elaboración de este trabajo.

Al comandante S. PNP Fredy R. Aguado Cuadros, jefe del departamento de Criminalística de la REGPOL – Ayacucho, sección de Química y Toxicología Forense.

A mi asesor Q.F Marco R. Arones Jara, por su dirección y el apoyo que me ha demostrado durante el tiempo que duro la investigación, confiando en mí en todo momento durante los momentos difíciles que he atravesado a lo largo de la elaboración de este trabajo.

Mí máximo agradecimiento y cariño a Javier C. Tovar Poma, sin cuya guía, comprensión y animo me habría resultado imposible terminar esta tesis.

A mis hermanos German, Nerio, Marco, Rosabel y Carlos, por su apoyo incondicional.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xvii
ABREVIATURAS	xix
RESUMEN	xxi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Cannabis sativa L	6
2.2.1 Clasificación taxonómica	6
2.2.2. Nombre vernácula (origen de la palabra marihuana)	7
2.2.3. Descripción botánica	7
2.2.4. Distribución	10
2.2.5. Estudios farmacológicos	11
2.2.6. Uso farmacológico	11
2.2.7. Uso etnobotánico	13
2.2.8. Composición química del cannabis	13
2.3. Los compuestos fenólicos	14
2.3.1. Clasificación de compuestos fenólicos	15
2.4. Método de extracción de compuestos fenólicos	21
2.5. Métodos para determinación de compuestos fenólicos	23
2.6. Espectroscopía UV/VIS	23
2.6.1. Cuantificación de compuestos fenólicos por espectrofotometría	24
2.7. Diseño de experimentos	27
2.7.1. Metodología para la aplicación del diseño de experimentos	27
2.7.2. Optimización de experimentos	30
2.7.3. Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)	30
2.8. Marco Legal	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. Ubicación	37
3.2. Población y muestra	37
3.2.1. Población	37
3.2.2. Muestra	37

3.2.3. Muestreo	37
3.2.4. Unidad experimental	38
3.3. Diseño metodológico	38
3.3.1. Recolección de la muestra	38
3.3.2. Secado y molienda	38
3.3.3. Diseño experimental	38
3.3.4. Extracción de compuestos fenólicos	39
3.3.5. Determinación de fenoles totales	41
3.3.6. Determinación de flavonoides totales	42
3.4. Diseño de investigación	42
3.5. Análisis de datos	43
IV. RESULTADOS	45
V. DISCUSIÓN	57
VI. CONCLUSIONES	67
VII. RECOMENDACIONES	69
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
IX. ANEXO	77

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Cannabis sativa</i> L.	6
Tabla 2. Partes de la planta <i>Cannabis sativa</i> L.	8
Tabla 3. Principales componentes del cannabis.	13
Tabla 4. Varios métodos de extracción.	22
Tabla 5. Matriz del diseño de Box – Behnken para tres factores.	32
Tabla 6. Factores (variables experimentales) y sus niveles experimentales utilizado en el diseño Box - Behnken, para optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. “marihuana”. Ayacucho 2018.	39
Tabla 7. Diseño experimental de Box - Behnken para la optimización de la extracción de compuestos fenólicos de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. “marihuana”, Ayacucho 2018.	40
Tabla 8. Selección del modelo apropiado para el contenido de compuestos fenólicos totales extraídos de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. “marihuana”. Ayacucho 2018.	46
Tabla 9. Coeficiente de regresión y ecuación del modelo matemático ajustado del contenido de fenoles totales extraídos de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L.	48
Tabla 10. Valores experimentales y predicho de fenoles totales bajo condiciones óptimas de la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. “marihuana”. Ayacucho 2018.	50
Tabla 11. Selección del modelo apropiado para el contenido de flavonoides totales extraídos de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. “marihuana”. Ayacucho 2018.	51
Tabla 12. Coeficiente de regresión y ecuación del modelo matemático ajustado del contenido de flavonoides totales extraídos de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. Ayacucho 2018.	53
Tabla 13. Valores experimentales y predicho de flavonoides totales bajo condiciones óptimas de la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. “marihuana”. Ayacucho 2018.	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Aspectos morfológicos del <i>Cannabis sativa</i> L.	9
Figura 2. Mapa de países en los cuales está disponible el cannabis medicinal.	10
Figura 3. Estructura básica de los compuestos fenólicos	14
Figura 4. Diferentes clasificaciones de polifenoles vegetales y clases polifenólicas basadas en el número de anillos de fenol y sus elementos estructurales.	16
Figura 5. Estructura básica de los flavonoides.	17
Figura 6. Clasificación de flavonoides. Las estructuras de los compuestos, tomados como ejemplos de cada clase, se informan en la figura 7.	17
Figura 7. Estructura básica de los flavonoides y diferentes clases basadas en ellos.	18
Figura 8. Estructura de cannflavinas A y B	20
Figura 9. Estructura química básica de los ácidos hidroxibenzoicos.	21
Figura 10. Estructura de ácidos hidroxicinámicos.	21
Figura 11. El espectro visible (390 – 780 nm) representa una pequeña parte del espectro electromagnético.	23
Figura 12. Principio de medición en espectroscopia UV/VIS.	24
Figura 13. Reacción de Folin - Ciocalteu.	25
Figura 14. Bandas de absorción de la Rutina.	26
Figura 15. Modelo general de un proceso o sistema	27
Figura 16. Procedimiento para la realización de un DOE.	28
Figura 17. Superficie de respuesta: a) descrita por un modelo de primer orden; b) superficie con un máximo, c) superficie con un mínimo y d) superficie con un punto silla (o minimax), descritas por modelos de segundo orden.	31
Figura 18. Representación del diseño de Box – Behnken para tres factores con un solo punto central.	33
Figura 19. Diagrama de Pareto de los efectos principales que afectan el contenido de fenoles totales en la obtención del extracto	

	hidroalcohólico de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. “marihuana”. Ayacucho, 2018.	47
Figura 20.	Gráficos de superficie de respuesta a) etanol, relación S/L y contenido de fenoles totales; b) etanol, tiempo y contenido de fenoles totales; c) tiempo, relación S/L y contenido de fenoles totales en el extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L.	49
Figura 21.	Diagrama de Pareto de los efectos principales que afectan el contenido de flavonoides totales en la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. “marihuana”. Ayacucho, 2018.	52
Figura 22.	Gráficos de superficie de respuesta a) etanol, relación S/L y contenido de fenoles totales; b) etanol, tiempo y contenido de flavonoides totales; c) tiempo, relación S/L y contenido de flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L.	54



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Certificado de identificación botánica de <i>Cannabis sativa</i> L.	78
Anexo 2. Constancia de adquisición de inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L.	79
Anexo 3. Flujograma de las etapas de la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L.	80
Anexo 4. Flujograma de las etapas de la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L.	81
Anexo 5. Fenoles totales (Método Folin - Ciocalteu)	82
Anexo 6. Flavonoides totales (Método Cloruro de Aluminio)	86
Anexo 7. Análisis de Varianza del contenido de fenoles totales	90
Anexo 8. Análisis de Varianza del contenido de flavonoides totales	91
Anexo 9. Matriz de consistencia	92

## ABREVIATURAS

CPT:	Compuestos fenólicos totales
CP:	Compuesto fenólico
EAM:	Extracción asistida por microondas
ELP:	Extracción de líquido presurizado
EFS:	Extracción de fluido supercrítico
EAE:	Extracción asistida por enzimas
PEF:	Extracción de campo eléctrico pulsado
GAE:	Equivalentes de ácido gálico
MSR:	Metodología de superficie de respuesta
DBB:	Diseño de Box – Behnken
EAU:	Extracción asistida por ultrasonido
ESC:	Extracción con solvente convencional
ABTS:	Método del Radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
EY:	Rendimiento de extracción
FT:	Flavonoides totales
ANVA:	Análisis de varianza
THC:	Tetrahidrocannabinol
TNF - $\alpha$ :	Factor alfa de necrosis tumoral
COX:	Ciclooxigenasa
FDA:	Administración de Medicamentos y Alimentos
CBD:	Cannabidiol
FC:	Folin – Ciocalteu
DDE:	Diseño de experimentos
DOE:	Diseño de experimentos
DCC:	Diseño central compuesto
MDA:	Metilendioxianfetamina
MDMA:	Metilendioximetanfetamina
PNP:	Policía Nacional del Perú
BHT:	Butil hidroxitouleno (E - 321) antioxidante sintético
REGPOL:	Registro de policías locales

## RESUMEN

El cannabis es la droga de abuso más frecuentemente utilizada no solo en Perú sino también en todo el mundo. Su uso aumenta drásticamente cada año. La prevalencia de esta planta se puede identificar a través del conocimiento de sus componentes. El propósito de este trabajo de investigación tuvo como finalidad la optimización del contenido de compuestos fenólicos totales durante la etapa de extracción hidroalcohólica de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L., empleando un método convencional (percolado). Se utilizó para esto, la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), el modelo de diseño de Box - Behnken (DBB) consistente en 15 corridas experimentales, se evaluó tres niveles de cada factor independiente: grado alcohólico (70, 80 y 90°GL), relación sólido:líquido (10:100, 10:200 y 10:300 g/mL) y tiempo de extracción (12, 30 y 48 h), que influye sobre el factor de respuesta (contenido de compuestos fenólicos totales). Con el análisis de la MSR, las condiciones óptimas para la extracción de fenoles y flavonoides totales fue: (etanol 80,7°GL, 10:300 g/mL y 22,8 h) y (etanol 90,0°GL, 10:187,2 g/mL y 44,8 h), respectivamente. En esta condición, el valor predicho de la respuesta fue (144,742 mg EAG/g y 8,910 mg ER/g). Los valores obtenidos experimentalmente fue 141,108 mg EAG/g y 8,452 mg ER/g, estuvieron de acuerdo con los predichos por el modelo RSM, lo que indica la idoneidad del modelo empleado y el éxito de la RSM en la optimización de las condiciones de extracción.

**Palabras clave:** Optimización, fenoles, flavonoides, *Cannabis sativa* L., metodología de superficie de respuesta, diseño de Box - Behnken

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los polifenoles representan uno de los metabolitos secundarios de plantas más conocidos y deseados, caracterizado por una amplia y diversa gama de propiedades bioactivas únicas y su capacidad de protección contra las enfermedades mediadas por radicales libres. La razón principal del interés de científicos y consumidores sobre los polifenoles es que muestran actividades farmacológicas, ellos pueden actuar en vasodilatación, como anticancerígeno, antiinflamatorio, y agentes bactericidas, estimulantes del sistema inmune, agentes antialérgicos, antivirales y estrógenos, y como inhibidores de la lipoxigenasa y la xantina oxidasa. Es un tema candente actual que involucra muchos campos de investigación, es entonces de gran importancia, aislar los principios activos de productos naturales, y su localización en diferentes partes de la planta o en los diferentes extractos, ya que los polifenoles en la salud han atraído la atención de nutricionistas y profesionales de la salud.<sup>1,2</sup>

Debido a la globalización del uso de cannabis,<sup>3</sup> como farmacéutica, es imposible dejar de estudiar metabolitos secundarios derivados de esta planta, es más, se podría decir que estudiarlas es una necesidad ya que hasta el momento solo hay un extenso cúmulo de artículos científicos del marcador químico THC. Esta premisa fue el germen que motivo y dio origen a este trabajo que ahora se ve materializado en este informe científico.

Cannabis es una planta con un largo historial de estudio, ya que hay una gran cantidad de literatura y que puede considerarse como la planta más controversial en nuestra sociedad, junto al importante uso médico. Además de implicaciones legales obvias, el cannabis como medicina herbal plantea serios desafíos para la medicina moderna, que opera de acuerdo con el paradigma "compuesto único, objetivo único" de farmacología.<sup>4</sup> La *Cannabis sativa* L., constituye una especie vegetal promisoría para la industria de Fitomedicamentos, rubro que evidentemente, se encuentra en una etapa de franca expansión. Dentro de la

cadena productiva de Fitomedicamentos deben tomarse varias decisiones a fin de obtener productos con un nivel óptimo de sustancias bioactivas. Un punto crítico, por ejemplo, es la etapa de extracción. No existe un método de extracción universal aplicable a fitoquímicos debido a la complejidad de estos compuestos y sus interacciones con los compuestos bioactivos de la matriz vegetal.<sup>5</sup>

Dada las propiedades fitoquímicas de la inflorescencia de cannabis, es de suma importancia contar con un método analítico eficiente para la extracción de este tipo de sustancias, que son solubles en soluciones hidroalcohólicas. Considerando lo anterior, es necesario buscar métodos analíticos simples, rápidos y sencillos para cuantificar compuestos fenólicos totales de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L., ya que poseen efectos beneficiosos para la salud humana, y la industria.

Los métodos de extracción convencionales con solventes orgánicos, se fundamenta en la interacción de un disolvente con la muestra, bajo condiciones de calor u homogeneización, como lo son la destilación, extracción Soxhlet, maceración e hidrodestilación.<sup>5-7</sup> Este hecho ha motivado que los investigadores estudien procesos de extracción aplicado a las plantas medicinales con el propósito de desarrollar metodologías adecuadas para evaluar la influencia de los parámetros de extracción sobre los marcadores activos contenidos en medicamentos a base de plantas.<sup>5</sup> Este es, precisamente, el tema central sobre el cual gira este informe.

#### **Objetivo general**

- Optimizar la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L.

#### **Objetivo específico**

- Determinar el efecto de los factores independientes como el grado alcohólico, relación sólido: líquido, tiempo de extracción y sus interacciones influyen de manera significativa en la extracción de compuestos fenólicos totales de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L.
- Determinar las condiciones óptimas de los factores independientes para el mejor tratamiento en la obtención de compuestos fenólicos totales de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. "marihuana".
- Determinar el análisis de regresión para la predicción y optimización de la extracción de compuestos fenólicos de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Agarwal y col.<sup>8</sup>, en el año 2018, realizaron un estudio de: "Extracción asistida por ultrasonido de cannabinoides de *Cannabis Sativa* L. Optimizada por la metodología de superficie de respuesta". En este trabajo utilizaron la extracción asistida por ultrasonidos para extraer compuestos bioactivos de *Cannabis sativa* L. como polifenoles, flavonoides y cannabinoides. Evaluaron la influencia de 3 factores independientes (tiempo, potencia de entrada y concentración de metanol) en la extracción de fenoles totales (CPT), flavonoides totales (FT), capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP) y el rendimiento general. En este caso, adoptaron el diseño central compuesto para el modelado estadístico de los datos de respuesta, seguido de regresión y análisis de varianza para determinar la importancia del modelo y los factores. Tanto la composición del disolvente como el tiempo afectaron significativamente en la extracción, mientras que el poder de sonificación no tuvo un impacto significativo en las respuestas. Las predicciones de respuestas que obtuvieron en condiciones de extracción óptimas fueron tiempo de 15 minutos, 130 W de potencia y 80% de metanol para 314,822 mg GAE / g DW de CPT; 28,173 mg QE / g DW de FT; 18,79 mM AAE / g DW de FRAP, y 10,86% de rendimiento. Las variables de respuesta experimentales bajo las condiciones optimizadas fueron de 312,452 mg GAE/g DW de CPT; 32,254 mg EQ/g DW para FT; 17,84 mM AAE/g DW para FRAP y 10,68% de rendimiento. De este estudio se concluyó que hay una buena correlación entre los valores predichos y experimentales de las respuestas, que validaron el modelo matemático.

Ali y col.<sup>9</sup>, en el año 2017, realizaron un estudio que lleva por título: "Optimización de la extracción asistida por ultrasonido de antioxidantes naturales de *Piper betle* utilizando la metodología de superficie de respuesta". Utilizaron el diseño Box - Behnken de tres niveles para optimizar la recuperación de antioxidantes naturales

de *Piper betle* a través de la extracción asistida por ultrasonido (EAU). En este trabajo se sometieron a estudio la influencia de tres parámetros de extracción, temperatura (50-70°C), concentración de etanol (70 - 90%) y proporción de solutos a solventes (1:10 - 1:30 g/mL) sobre el rendimiento de extracción (EY), contenido fenólico total (CPT) y la capacidad antioxidante. Las condiciones óptimas para EY, CPT y capacidad antioxidante se evaluaron por medio de la metodología de superficie de respuesta. Donde los parámetros óptimos fueron temperatura de 51,60°C; concentración de etanol de 78,74% y una relación de soluto a solvente de 1: 21,85 g/mL. La validación experimental mostró un EY máximo de 13,88% con CPT de 311,21 mg GAE/g y 97,57% de capacidad antioxidante que estaban dentro del 95% del nivel de confianza, que coincidió con los valores predichos. Además, la EAU dio un rendimiento significativamente mejor de 13,71%; CPT de 289,05 mg GAE/g; contenido total de flavonoides de 21,50 mg ER/g y actividad antioxidante 94,99% con respecto a la maceración, lo que dio un rendimiento menor de 10,96%; CPT de 246,98 mg GAE/g; contenido total de flavonoides de 13,48 mg ER/g y actividad antioxidante de 78,12% respectivamente.

Xi y col.<sup>10</sup>, en el año 2017, realizaron un estudio de: "Optimización de la extracción sólido-líquido a presión de los flavonoides de *Flos Sophorae* y evaluación de su actividad antioxidante". Utilizaron el diseño central compuesto y la metodología de superficie de respuesta para optimizar la extracción sólido - líquido de los flavonoides de *Flos Sophorae*. Las condiciones óptimas de extracción para la extracción sólido - líquido fueron: presión 460 MPa, concentración de etanol 75%, relación líquido / sólido 32 mL/g, temperatura 25 ° C y tiempo 5 min. En estas condiciones, el rendimiento de los flavonoides experimentales fue de 200 ± 8,63 mg/g, lo que concuerda con el valor predicho (202.915 mg/g). Estos resultados indicaron que el PSE era un enfoque adecuado para la extracción de flavonoides de *Flos Sophorae*.

Dahmoune y col.<sup>11</sup>, en el año 2014, realizaron un estudio de las: "Hojas de *Pistacia lentiscus L.* como fuente de compuestos fenólicos: extracción asistida por microondas optimizada y comparada con extracción con solvente convencional y asistida por ultrasonido". En este trabajo realizaron la extracción asistida por microondas (EAM) en la que investigaron la extracción de compuestos fenólicos totales (CPT) expresados como equivalentes de ácido gálico (GAE) de las hojas de *Pistacia lentiscus L.*, maximizado así el rendimiento fenólico total, en la que se empleó la metodología de superficie de respuesta (MSR) junto con un diseño Box-

Behnken. Los parámetros de procesamiento en la EAM óptimos fueron 46% de etanol, tiempo de extracción 60 s, densidad de potencia 17,86 g/mL y relación líquido/sólido 28:1, con un rendimiento de extracción de  $185,69 \pm 18,35$  mg GAE/g. Dueñas.<sup>12</sup>, en el año 2017, realizó un trabajo titulado: "Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de cascara de uva variedad quebranta (Ica, Perú) empleando técnicas convencionales y extracción asistida por ultrasonido". Para los distintos parámetros seleccionados en la extracción convencional (sólido - líquido) de los compuestos fenólicos totales, utilizaron el diseño de Box - Behnken para optimizar las condiciones de extracción de compuestos fenólicos de cáscara de uva variedad quebranta. Se evaluaron tres niveles de cada factor o variable independiente: solvente binario (mínimo etanol 45 % y máximo etanol 55 %), tiempo de extracción (mínimo 160 minutos y máximo 200 minutos) y temperatura de tratamiento (mínimo 75 °C y máximo 85 °C). En el diseño, los valores de las variables experimentales fueron codificadas y representadas como -1, 0 ó +1, dependiendo de la distancia relativa con el valor central. Con el análisis de la metodología de superficie de respuesta, las condiciones óptimas para la extracción convencional fueron: etanol 47 %, 85 °C y 184 minutos. Empleando dichas condiciones el valor óptimo para la extracción convencional en la determinación de compuestos fenólicos totales predichos fueron de 19,9144 mg GAE/g. Sin embargo, realizaron la parte experimental empleando las condiciones optimizadas donde arrojaron, la cantidad determinada de compuestos fenólicos totales fue de 17,7021 mg GAE/g, lo que coincidió con el valor predicho.

Velazco.<sup>5</sup>, titulada: "Optimización del proceso de extracción de flavonoides de las hojas de *Oenothera rosea* Ait, Ayacucho 2017". En este trabajo se aplicó el diseño experimental de Box - Behnken consistente en 15 corridas experimentales con 3 repeticiones en el punto central, donde se consideraron tres factores: concentración etanólica (30, 50 y 70%), temperatura (50, 60 y 70°C) y tiempo de extracción (2, 5 y 8 h), que influye sobre el rendimiento de flavonoides totales (FT). Las condiciones óptimas de extracción fueron evaluadas por medio de la metodología de superficie de respuesta (MSR). La superficie de respuesta mostro que los factores evaluados y sus interacciones influyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) sobre el rendimiento de FT de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. Se obtuvo un modelo matemático de regresión para predecir el rendimiento óptimo de extracción, cuyo análisis de varianza (ANVA) indico que el modelo polinómico



cuadrático representa muy bien el proceso de extracción. Los parámetros óptimos para la extracción de mayor cantidad de FT fueron concentración etanólica al 70%, temperatura de 69,34°C y tiempo de extracción de 2 h, dado que la media experimental de FT fue de (7,63%), bajo condiciones óptimas, la cual estuvo en concordancia con el valor predicho por el modelo matemático que fue (7,77%), por lo tanto, el proceso de extracción quedó optimizado.

## **2.2. *Cannabis sativa* L.**

### **2.2.1. Clasificación taxonómica**

En 1753, el famoso botánico suizo y padre de la taxonomía Carl Linnaeus reconoció y nombró la especie *Cannabis sativa* (C. sativa) como un cultivo, en su trabajo llamado Systema Naturae. La taxonomía oficial utilizada hoy día es *Cannabis sativa* L., donde L. hace referencia al propio Linnaeus.<sup>13</sup>

La **Tabla 1**, muestra la clasificación taxonómica de *Cannabis sativa* L., según el sistema de clasificación de Cronquist A., del año 1988. (**ANEXO 1**).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Cannabis sativa* L.

<b>DIVISIÓN</b>	MAGNOLIOPHYTA
<b>CLASE</b>	MAGNOLIOPSIDA
<b>SUBCLASE</b>	HAMAMELIDAE
<b>ORDEN</b>	URTICALES
<b>FAMILIA</b>	CANNABACEAE
<b>GÉNERO</b>	Cannabis
<b>ESPECIE</b>	<i>Cannabis sativa</i> L.
<b>N.V.</b>	“marihuana”

**Fuente:** constancia emitida por el Herbarium Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH 2017.

### **2.2.2. Nombre vernáculor (origen de la palabra marihuana)**

En Asia y África, donde aparece primero su consumo, se le ha llamado: hashish (Arabia); bhang, ganja, guasca, charas o churrús, en la India; haenep para los anglosajones; anasha en Rusia; grifao mota en España y México; kif en África del norte; dawamesk en Argelia; kanope en Polonia; moma en el Tíbet. El término hashish es de procedencia árabe, y el término marihuana, que es más utilizado en Estados Unidos, se considera una derivación de la palabra portuguesa “mariguango” que significa intoxicante. Se encontró otra versión, donde se relaciona el origen de la palabra marihuana con los diarios de navegación de Cristóbal Colón, que plantea: “en la página donde Colón habla de un archipiélago con infinidad de islas connota el historiador Navarrete en la cual aclara que dicho

archipiélago debe ser de Los Caicos, en cuyo grupo se encuentran localizadas las islas Inagua, Chica y Grande y la Isla Mariguana". Seguidamente refiere que el nombre aparece escrito con g y no con h intermedia. En tiempos anteriores los diccionarios traían con g dicha palabra, pero de diez años a esta parte Salvat y otras enciclopedias sin dejar de registrar con g, aceptan por extensión su ortografía con h y así figura en el Diccionario de la Real Academia Española. El mismo autor nos hace referencia a que la enciclopedia Salvat anota que con h intermedia Alonso de Ercilla inserta en La Araucana la palabra "Marihueno" pero esta no tiene nada que ver con la caña india, sino con la batalla de ese nombre ocurrida en Chile entre españoles y araucanos en tiempos de la Conquista. Y atendiendo a la estructura morfológica de otros vocablos similares de origen americano, como "iguana", y a su expresión fonética, es de suponer que marihuana debe escribirse con g.<sup>14</sup>

En el contexto colombiano los vocablos más conocidos para denominar el cannabis entre los consumidores de psicoactivos son: marihuana, cannabis, hierba, Popeye, espinaca, cilantro, María, Mariela, maracachafa, barilla, join, Bob Marley, la turca, la vitamina, marimba, pate-gallina, la trabis, chauma, grifa, alfalfa, bareta, chiriguaya, armadillo, ganja, María Juana, bate, Mary Jane, naturaleza, weed, cacho, cannabis sativa, la traba, vegetal, mona, hierba buena, soyis, la yoyis, la locomotora, vitamina C, bayer, yesca, porro, chirusa.<sup>14</sup>, cáñamo.<sup>15</sup>, marijuana.<sup>16</sup>

### **2.2.3. Descripción botánica**

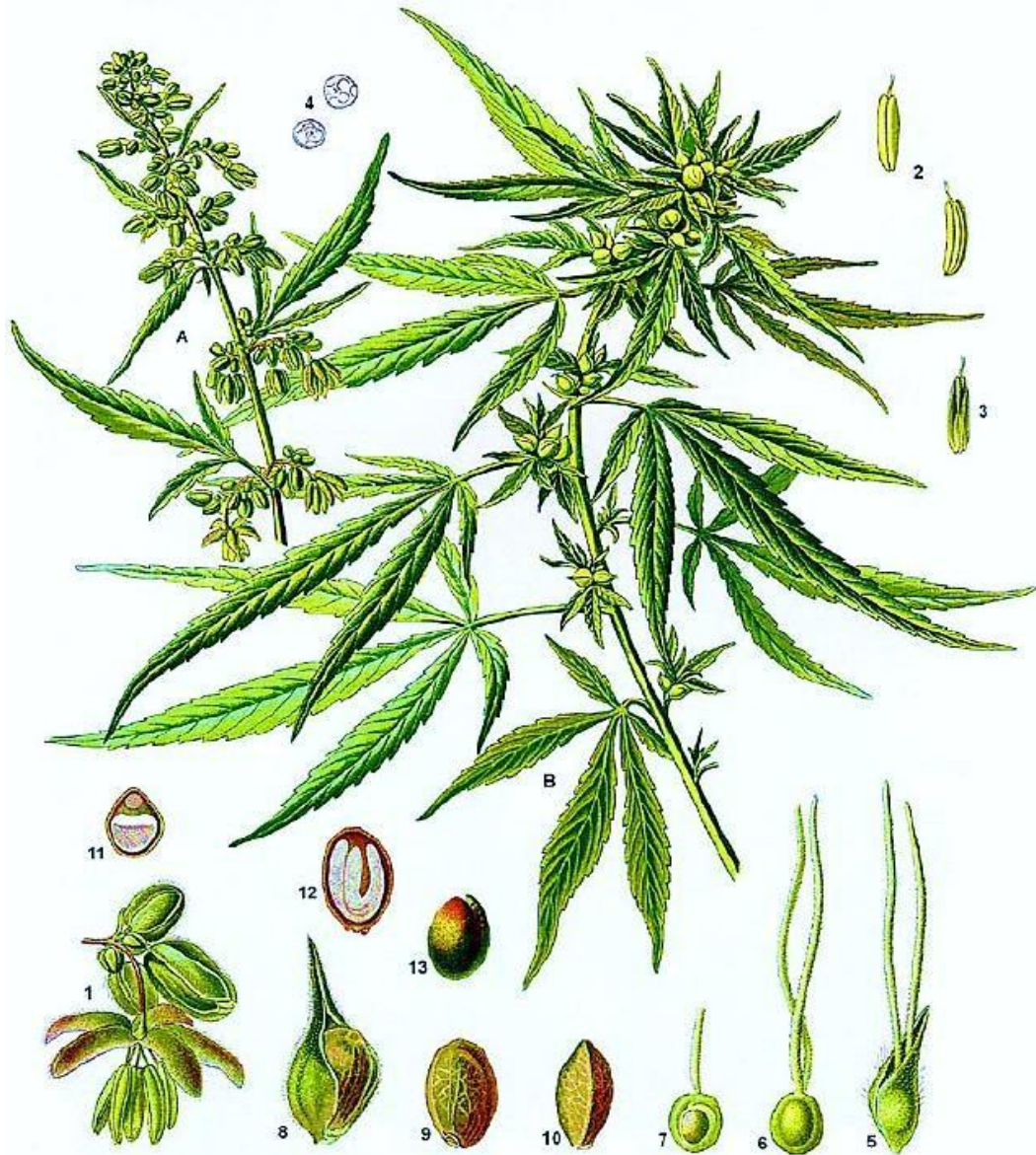
*Cannabis sativa* L., llamado comúnmente cáñamo, es una herbácea anual con tallo erguido no trepador, que son en su mayoría dioica (la única especie anual conocida con esta característica), raramente monoico cuyo tamaño oscila entre 50 cm y 6 m de altura a madurez. Las hojas son palmeadas y constituidas por foliolos dentados en forma de abanico, con un limbo dividido casi hasta el mismo peciolo, el primer par de hoja es unifoliado, el segundo par trifoliado y el número va subiendo en las hojas posteriores hasta llegar a 11 foliolos en algunos casos. Al principio del estadio vegetativo, la planta crece lentamente, formando entre 5 a 6 pares de hojas verdaderas opuestas y 4 a 6 entrenudos opuestos. A finales de este estadio, la planta, que posee entre 7 a 12 pares de hojas, se prepara para florecer notándose una importante aceleración del crecimiento, aparición de filotaxia alterna y estiramiento del tallo.<sup>13, 17</sup>

Se trata de una planta dioica con flores unisexuales estaminadas o pistiladas desarrolladas sobre individuos diferentes, en comparación con el macho, la hembra es generalmente más frondosa menos alta, florece más tarde y su ciclo vital se extiende hasta madurez de las semillas. En cambio, el macho se marchita una vez liberado el polen. Las flores masculinas se disponen en panículas terminales con un perianto constituido por cinco piezas y un androceo de cinco estambres mientras que las flores femeninas aparecen en grupo de 2 a 6 en las axilas de brácteas reunidas en glomérulos sentados y presentan un perianto integrado por cinco tépalos libres y un ovario supero y unilocular y dos estigmas. En cuanto se refiere a la floración, las flores masculinas aparecen una semana antes que las femeninas formándose, tras la fecundación, el fruto que es un aquenio que contiene en su interior una semilla que alcanza la madurez en la tercera a cuarta semana después de la fecundación.<sup>17</sup>

Las características morfológicas de las plantas de *Cannabis* están influenciadas por la cepa de la semilla, así como por factores ambientales como el tipo de suelo, la luz, el agua, los nutrientes y espacio.<sup>16</sup> En la **Tabla 2** y **Figura 1**, podemos observar algunas características de *Cannabis sativa* L.

**Tabla 2.** Partes de la planta *Cannabis sativa* L.<sup>18</sup>

<b>A</b>	Inflorescencia de la planta masculina (estaminada)
<b>B</b>	Planta femenina (pistilada) con fruto
<b>1</b>	Flor estaminada
<b>2</b>	Estambre (antera y filamento corto)
<b>3</b>	Estambre
<b>4</b>	Granos de polen
<b>5</b>	Flor pistilada con bráctea
<b>6</b>	Flor pistilada sin bráctea
<b>7</b>	Flor pistilada en la que se aprecia el ovario (sección longitudinal)
<b>8</b>	Semilla (aquenio <sup>1*</sup> ) con bráctea
<b>9</b>	Semilla sin bráctea
<b>10</b>	Semilla (vista lateral)
<b>11</b>	Semilla (sección transversal)
<b>12</b>	Semilla (sección longitudinal)
<b>13</b>	Semilla sin pericarpio (pelada)

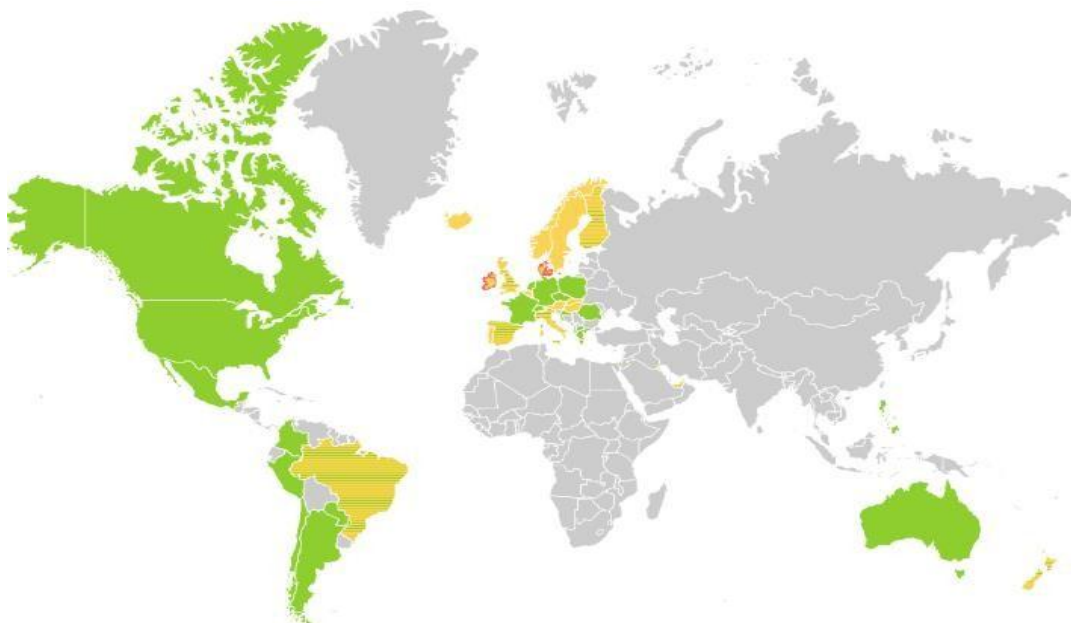


**Figura 1.** Aspectos morfológicos del *Cannabis sativa* L.<sup>18</sup>

#### **2.2.4. Distribución**

Actualmente se encuentra ampliamente distribuida en regiones templadas y subtropicales del mundo, que crece a lo largo de todo el año.<sup>15</sup> A causa de su rápida propagación y adaptabilidad ambiental, la Cannabis tuvo un gran impacto en las expresiones de diversas culturas.<sup>13</sup>

A pesar de que, a nivel mundial, el cannabis es todavía una sustancia prohibida, las últimas décadas han sido testigo de la inauguración de una serie de procesos políticos, legislativos y judiciales en distintas partes del mundo, de los que han emergido varias formas de regular legalmente su uso para fines médicos y terapéuticos **Figura 2.**<sup>19</sup>



**Figura 2.** Mapa de países en los cuales está disponible el cannabis medicinal.<sup>19</sup>

---

	<b>Regulación del cannabis con fines medicinales</b>
Alemania, Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, Croacia, España, Estados Unidos, Filipinas, Finlandia, Francia, Grecia, Israel, Italia, Jamaica, Macedonia, México, Nueva Zelanda, Países Bajos, Perú, Polonia, Puerto Rico, Reino Unido, República Checa, Rumania, Suiza, Uruguay.	
	<b>Proyectos pilotos sobre cannabis medicinal</b>
Dinamarca, Irlanda.	
	<b>Nabiximols (Sativex) autorizado</b>
Austria, Brasil, Bélgica, Dinamarca, Estados Unidos, Eslovaquia, España, Finlandia, Hungría, Irlanda, Islandia, Italia, Kuwait, Liechtenstein, Luxemburgo, Malta, Noruega, Nueva Zelanda, Portugal, Reino Unido, Suecia.	

---

### 2.2.5. Estudios farmacológicos

Los flavonoides pueden ser importantes para el efecto terapéutico general del tetrahidrocannabinol (THC) y de los otros cannabinoides, ya que pueden mejorar sinérgicamente o reducir sus efectos secundarios. Los flavonoides pueden contrarrestar algunos efectos indeseados causados por el THC, como la regulación al alza del factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). Con la inhibición de las enzimas CYP monooxigenasa, podrían alterar la farmacocinética del THC, convirtiéndola en 11-OH-THC. Por lo tanto los flavonoides supresores de CYP, pueden actuar como agentes quimioprotectores bloqueando la conversión de procarcinógenos como el benzo [ $\alpha$ ] pireno y aflatoxina B1, dos agentes dañinos que se encuentran potencialmente en el humo de cannabis, como resultado de

contaminación de Cannabis herbal con mohos. Algunos flavonoides aislados de Cannabis han sido probados para efectos farmacológicos. Cannflavinas A y B inhiben la prostaglandina E2 en células sinoviales reumatoideas humanas, la Cannflavina A lo hizo con una potencia de 30 veces más que la aspirina, también inhibió la ciclooxigenasa (COX) y las enzimas lipoxigenasas y, por lo tanto, tiene propiedades antiinflamatorias. Quizás no sea sorprendente que estos compuestos muestren fuertes actividades biológicas, porque la sustitución con un grupo prenilo aumenta la lipofilia de los flavonoides y las moléculas tienen una gran afinidad por las membranas biológicas. Los flavonoides prenilados atraen cada vez más la atención de la comunidad científica debido a sus potentes efectos antioxidantes y anticancerígenos, y su potencial para tratar problemas menopáusicos. Por lo tanto, es posible que las cannflavinas muestren que poseen más propiedades biológicas en el futuro.<sup>20</sup> Los estudios clínicos sobre flavonoides han demostrado que a menudo muy poco aglicona inalterada está presente en el plasma humano, pero que los metabolitos conjugados como los conjugados de ácido glucurónico están presentes a altas concentraciones. Por lo tanto, las formas bioactivas *in vivo* pueden no ser las formas fitoquímicas naturales, sino más bien sus metabolitos que derivan de ellos después de la absorción en el cuerpo. En consecuencia, el concepto de biodisponibilidad oral y la actividad de los flavonoides en la dieta es claramente un tema complejo. Sin embargo, es posible que los flavonoides en Cannabis tomados por vía oral tienen posibles efectos beneficiosos.<sup>20</sup>

#### **2.2.6. Uso farmacológico**

En la actualidad existen dos categorías de medicinas cannabinoides que se utilizan en mayor o menor grado en distintas regiones del mundo. La primera corresponde a los derivados farmacéuticos cuya eficacia y seguridad ha sido demostrada en el tratamiento de problemas clínicos específicos y han sido aprobados por agencias reguladoras como la FDA (o su contraparte en otros países) para su manufactura y venta en base a la prescripción de un médico. Estas compañías producen cannabinoides farmacéuticos sujetos a estándares de seguridad, pureza y contenido similar al de otros medicamentos.<sup>21</sup>

Los principales derivados farmacéuticos de cannabis son los siguientes:

**Dronabinol:** Es un THC sintético aprobado por la FDA para el tratamiento de las náuseas y vómitos asociados a la quimioterapia de cáncer en pacientes que no responden a terapias antieméticas convencionales. También está indicado para el tratamiento de anorexia y pérdida de peso en pacientes con Síndrome de

Inmunodeficiencia Adquirida. En Europa, también se indica para el dolor neuropático central o periférico. Puede hallarse como producto comercial (Marinol®, producido por Unimed Pharmaceuticals Inc.) en capsulas, o como producto preparado por el farmacéutico en gotas o capsulas de 2,5 mg; 5 mg; o 10 mg.<sup>21</sup>

**Nabilona:** Es un derivado semisintético del THC, aproximadamente 10 veces más potente que el Dronabinol. Está aprobado por la FDA, y también se usa para el tratamiento de las náuseas y vómitos asociados a la quimioterapia de cáncer en pacientes que fallan en responder adecuadamente a terapias antieméticas convencionales. En Europa, está indicado en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica. Es comercializado con el nombre Cesamet™ (Valeant Pharmaceuticals International) en capsulas de 1 mg.<sup>21</sup>

**Nabiximols (Sativex):** Es un derivado líquido (extracto) de dos cepas de *cannabis sativa*, dronabinol y CBD, en spray para la mucosa oral. Una aplicación provee 2,7 mg de dronabinol y 2,5 mg de CBD. Ha sido aprobado en Canadá, Nueva Zelanda y ocho países europeos para el alivio sintomático de la espasticidad en la esclerosis múltiple en adultos con respuesta inadecuada a otras terapias, el alivio sintomático del dolor neuropático en la esclerosis múltiple y el dolor oncológico refractario al tratamiento. Producido por la compañía GW Pharmaceuticals. Aún no cuenta con aprobación de la FDA y se halla en fase tres.<sup>21</sup>

**Epidiolex:** Corresponde al cannabinoide CBD purificado derivado de la marihuana. Actualmente aprobado por la FDA. Para el tratamiento de convulsiones relacionadas con dos tipos poco comunes y severos de epilepsia el síndrome de Lennox - Gastaut y el síndrome de Dravet (epilepsia mioclónica grave de la infancia) en pacientes de dos años de edad y mayores.<sup>23</sup>

### 2.2.7. Uso etnobotánico

*Cannabis sativa* es originaria de Asia y se usó para producir fibras y confeccionar diversos productos textiles, data de 4000 a.C., mientras que su registro de uso en la medicina tradicional data de 2700 a.C. De acuerdo al conocimiento popular, se le han atribuido propiedades analgésicas, relajantes musculares, antidepresivas, hipnóticas, inmunosupresoras, antiinflamatorias, ansiolíticas, broncodilatadoras, entre otras.<sup>15</sup>

Se aprovecha el consumo de todas las partes de la planta de cannabis desde su forma en cáñamo, flor, hoja, ramas, semillas y sumidades florales; excepto la raíz, así como en su presentación herbal. Existe variabilidad de concentración y

absorción de los componentes activos según la planta y la forma de administración (inhulado, vaporizado, ingerido). Y su uso alimentario – dietéticos: pienso y forraje, fabricación de hilos, tejidos y cuerdas, fabricación de papel, insecticida, repelente de animales, medicamento en veterinaria, abstergente, combustible, e incienso ceremonial).<sup>15, 21</sup>

El aceite esencial de cannabis se emplea tradicionalmente como antiinflamatorio en el tracto respiratorio y digestivo sin contraindicaciones conocidas en dosificaciones fisiológicas.<sup>22</sup>

### 2.2.8. Composición química del cannabis

La composición química de esta especie se ha estudiado ampliamente en el que se ha identificado aproximadamente 500 compuestos.<sup>15</sup>

Las clases de compuestos más importantes extraídos de preparaciones de cannabis se describen en la **Tabla 3**. Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunos componentes pueden ser el resultado de oxidaciones o degradaciones de otros compuestos producidas por la acción del calor o enzimas.<sup>24</sup> Estos compuestos son secretados en forma de exudado resinoso por protuberancias epidérmicas (tricomas) distribuidas mayoritariamente por la superficie de brácteas. Aunque los tricomas se encuentran en plantas femeninas y masculinas, están más concentrados en las brácteas que sostienen las inflorescencias femeninas.<sup>25</sup>

**Tabla 3.** Principales componentes del cannabis.<sup>24</sup>

Clase de compuesto	Compuestos identificados
Terpenos	>120
Cannabinoides	>70
Hidrocarbonos	50
Azucares	34
Compuestos nitrogenados	27
Fenoles no cannabinoides	25
Flavonoides	23
Ácidos grasos	22
Ácidos simples	21
Aminoácidos	18
Cetonas simples	13
Esteres simples y lactonas	13
Aldehídos simples	12
Proteínas, glicoproteínas y enzimas	11
Esteroides	11

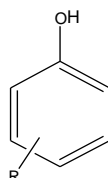


Elementos	9
Alcoholes simples	7
Pigmentos	2
Vitaminas	1

### 2.3. Los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (también llamados fenólicos), o polifenoles<sup>26</sup>, son el grupo más grande de fitoquímicos (estimados en 100,000 a 200,000 compuestos diferentes). Son biosintetizados en las plantas a través del metabolismo secundario y cumplen numerosas funciones biológicas que han permitido la adaptación y evolución de las distintas especies. Entre las cuales se encuentran, el transporte de hormonas, la atracción de agentes polinizadores, el crecimiento del tubo polínico y la fecundación, la dispersión de semillas, el establecimiento de relaciones simbióticas, la protección de los fotosistemas frente al daño oxidativo, las respuestas de defensa frente a herbívoros y al ataque de patógenos, y la tolerancia a condiciones abióticas desfavorables.<sup>12, 27</sup>

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos incluyen una gran diversidad de estructuras muy heterogéneas, que se caracterizan por poseer al menos un núcleo bencénico sustituido con uno o varios grupos hidroxilos y una cadena lateral funcional (**Figura 3**).<sup>12</sup>



**Figura 3.** Estructura básica de los compuestos fenólicos.<sup>12</sup>

Su reactividad se debe tanto al carácter ácido de la función fenólica como al carácter nucleofílico que le confiere la alta densidad electrónica del anillo bencénico.<sup>12</sup> Y desde el punto de vista biológico, se les han asignado numerosas actividades, siendo la más importante la actividad antioxidante. Esta actividad, que está relacionado con la alta tendencia a quelar metales de compuestos fenólicos, depende del número y las posiciones de los grupos hidroxilo y la naturaleza de sustituciones en los anillos aromáticos. Otras actividades biológicas son anticarcinogénico, antimutagénico y antiinflamatorio, todos ellos relacionados a la actividad antioxidante que tiene extrema importancia para la prevención y tratamiento del cáncer.<sup>27</sup>

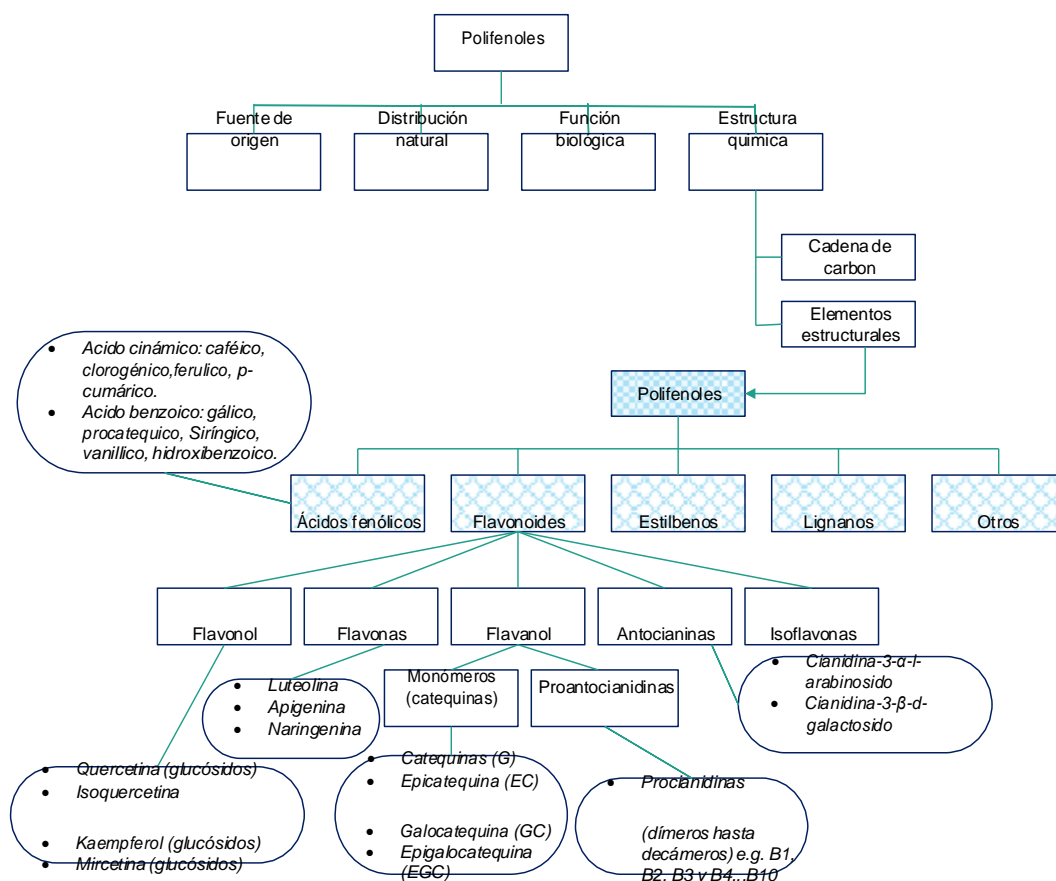
La mayoría de estos compuestos se originan a partir de dos aminoácidos, fenilalanina o tirosina, que entran en la ruta fenilpropanoide que al desaminarse dan lugar a ácidos cinámicos. Por lo tanto, la biosíntesis por esta vía produce una gran variedad de polifenoles vegetales: ácidos benzoicos (C6 - C1), ácidos cinámicos (C6 - C3), cumarinas (C6 - C3), flavonoides (C6 - C3 - C6), Proantocianidinas [(C6 - C3 - C6) n], estilbenos (C6 - C2 - C6), lignanos (C6 - C3 - C3 - C6) y ligninas [(C6 - C3) n].<sup>2,27</sup> Además de la diversidad química, los polifenoles pueden estar asociados con diversos carbohidratos (que existen como glucósidos con diferentes unidades de azúcar (glucosa > galactosa > ramnosa > xilosa > arabinosa) y azúcares acilados en diferentes posiciones de los esqueletos de polifenol) y ácidos orgánicos o entre sí, que originan diferentes características químicas y propiedades biológicas.<sup>2,27</sup>

Según Neira.<sup>28</sup>, los CP son polares y tienden a ser solubles en agua, pudiendo ser detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro que producen cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico. Dado la naturaleza aromática muestran una intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método espectral muy utilizado para el análisis cuantitativo. Los polifenoles influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor.<sup>29</sup>

### **2.3.1. Clasificación de compuestos fenólicos**

Se han identificado varios miles de compuestos polifenólicos diferentes (entre ellos más de 8150 flavonoides) con una gran variedad de estructuras. La diversidad y amplia distribución de polifenoles en las plantas ha llevado a diferentes formas de categorizar estos compuestos naturales, como se puede ver en la **Figura 4.**<sup>2</sup>

Según Galanakis y col.<sup>2</sup> Los polifenoles se han clasificado por su fuente de origen, distribución natural, función biológica y estructura química. Con respecto a su distribución en la naturaleza, los compuestos fenólicos se pueden dividir en tres clases: brevemente distribuidos (como fenoles simples, pirocatecol, hidroquinona, resorcinol, aldehídos derivados de ácidos benzoicos que son componentes de aceites esenciales, como vainillina), ampliamente distribuidos (divididos en flavonoides y sus derivados, cumarinas y ácidos fenólicos, como el ácido benzoico y cinámico y sus derivados) y polímeros (taninos y ligninas).

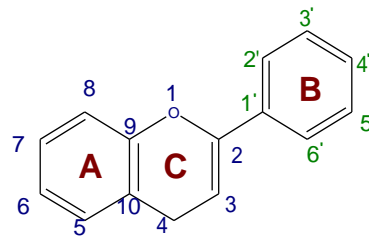


**Figura 4.** Diferentes clasificaciones de polifenoles vegetales y clases polifenólicas basadas en el número de anillos de fenol y sus elementos estructurales.<sup>2</sup>

Según Horst y col.<sup>30</sup> Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en dos grandes grupos: flavonoides y no - flavonoides.

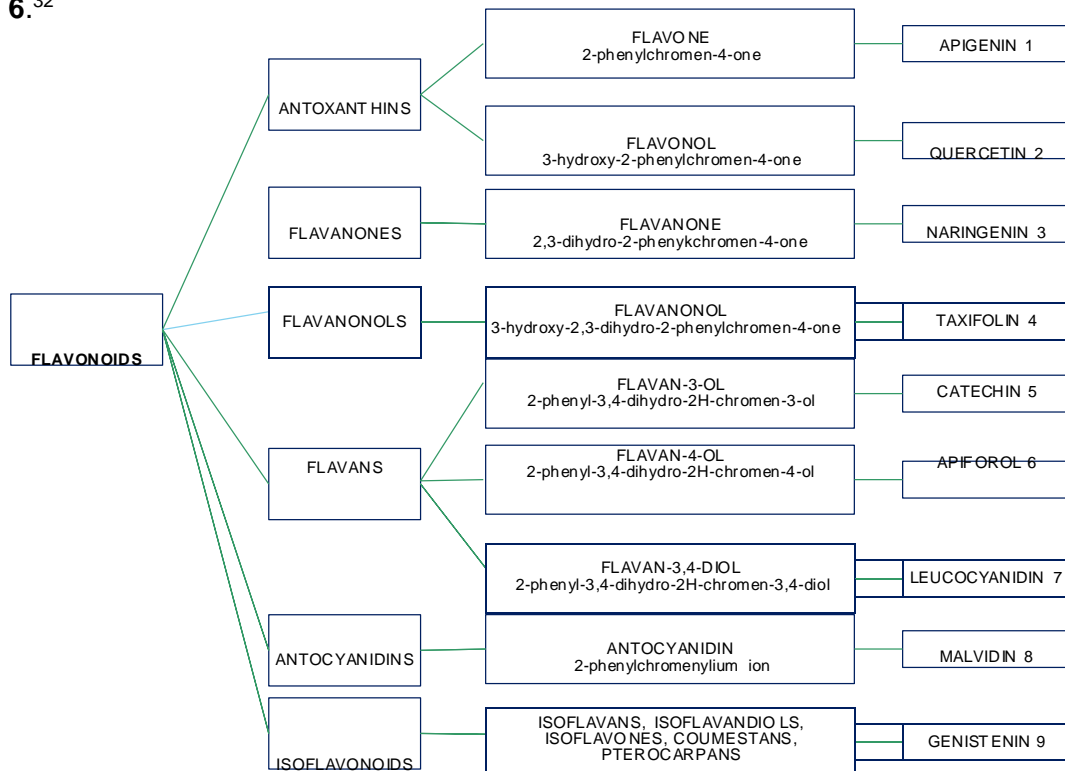
### 2.3.1.1. Los compuestos flavonoides

Los flavonoides son sustancias químicas del grupo polifenol cuyo esqueleto primario comprende 15 átomos de carbono dispuestos en dos anillos de fenilo (A y B), unidos por un puente de 3 carbonos. Los flavonoides son los pigmentos que colorean la mayoría de las flores, frutas y semillas. En las plantas superiores, estos compuestos se dividen en varias clases que difieren en el número y la ubicación de los grupos hidroxilo en los anillos A y B, el grado de oxidación del anillo C, y la presencia de estructuras diméricas, en otras palabras, la repetición de la estructura C6 - C3 - C6. La **Figura 5**, presenta la estructura química de los flavonoides. Hasta ahora, se han identificado más de 7000 derivados que contienen esta estructura.<sup>2</sup>



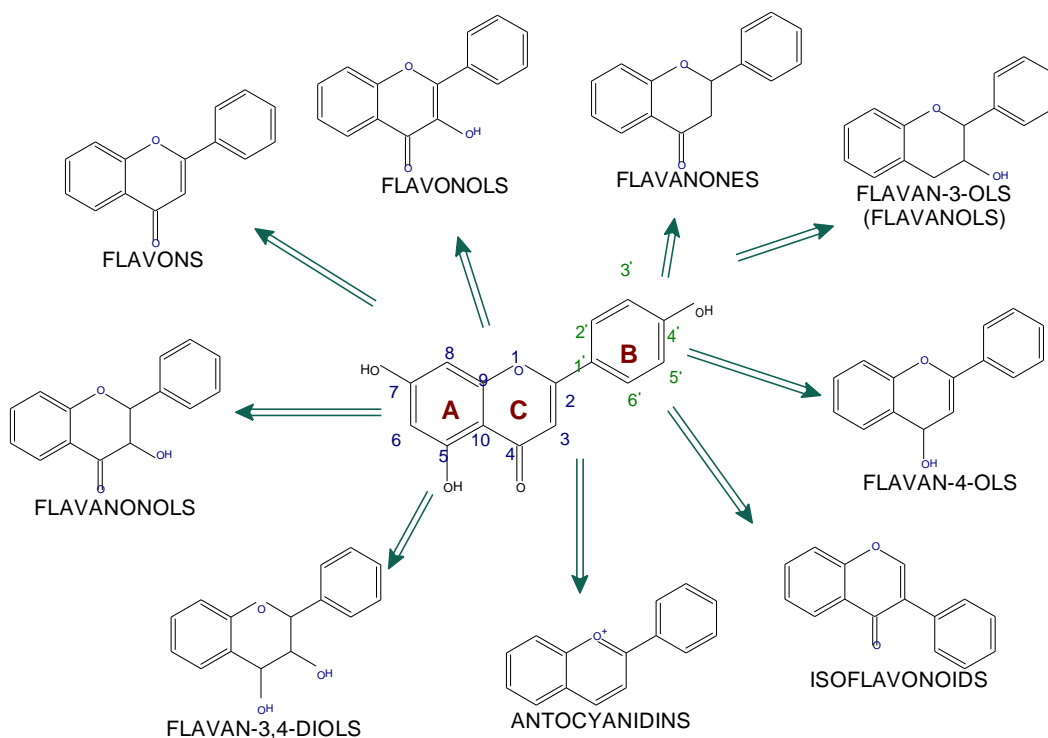
**Figura 5.** Estructura básica de los flavonoides.<sup>31</sup>

A la familia de flavonoides pertenecen varias clases de compuestos que incluyen antoxantinas, a su vez subdivididos en dos subgrupos: flavonas y flavonoles; flavanones; flavanonoles; flavans, a su vez subdivididos en tres subgrupos: flavan 3-oles, flavan-4-oles y flavan-3,4-dioles; antocianidinas e isoflavonoides **Figura 6.**<sup>32</sup>



**Figura 6.** Clasificación de flavonoides. Las estructuras de los compuestos, tomados como ejemplos de cada clase, se informan en la **figura 7.**<sup>32</sup>

La modificación de la estructura básica, a través de diferentes niveles de oxidación y sustituyentes al anillo C, es responsable de las diferentes clases de flavonoides **Figura 7.**<sup>32</sup>



**Figura 7.** Estructura básica de los flavonoides y diferentes clases basadas en ellos.<sup>32</sup>

Los flavonoides se presentan como agliconas, glucósidos y derivados metilados.<sup>31</sup>

### 2.3.1.1. Flavonoides del género cannabis

Se han identificado 23 flavonoides comunes en Cannabis, como flavonoides libres y glucósidos conjugados, que existen principalmente como C- / O- y O-glucósidos del flavon y Flavonol - tipo agliconas apigenina, luteolina, quercetina y kaempferol. Orientina, vitexina, luteolin-7-O-glucoside y apigenin-7-O-glucoside eran los principales glucósidos de flavonoides presentes en cultivares de cannabis bajo en THC.<sup>22, 33</sup> La distribución de estos en la planta varía dependiendo del flavonoide en cuestión, pero en las raíces del Cannabis no se han encontrado flavonoides. En las hojas y flores de Cannabis el contenido total de flavonoides puede llegar a ser hasta el 2,5 % del peso seco, mientras que en las semillas y raíces es casi nulo. Algunos estudios sugieren que la distribución y la concentración de los flavonoides pueden ser de utilidad como carácter químico - taxonómico en el Cannabis.<sup>34</sup> Algunos flavonoides son volátiles, lipofílicos, permean las membranas y aparentemente retienen actividad farmacológica en el humo de cannabis.<sup>22</sup> En la planta de Cannabis se ha identificado la Cannflavina A, la cannflavina B, la cannflavina C (flavonoides prenilados) como se muestra en la **Figura 8**, que es propia de cannabis.<sup>33</sup>

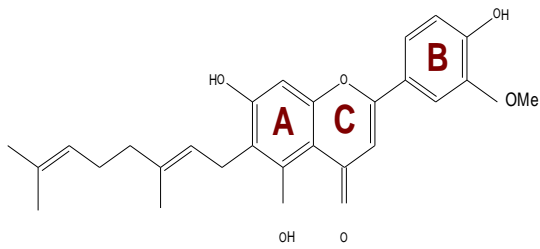
La cannflavina A es uno de un par de flavonas prenilados aparentemente únicas para el cannabis. El rendimiento de cannflavina A es 0.02% de hierba seca. Este compuesto es un potente inhibidor de la prostaglandina E2 en células sinoviales reumatoides humanas, con una  $CI_{50}$  de 31 ng/ml, aproximadamente 30 veces más potente que la aspirina en ese sistema. La cannflavina A inhibe las enzimas de la ciclooxigenasa (COX) y las enzimas lipoxigenasas (LO) de forma más potente que el THC. Sin embargo, estos ensayos se realizaron con cannflavina extraída con alcohol; cuestionamos si cannflavina es suficientemente volátil. Otros fenoles relacionados con los flavonoides son volátiles y aparentemente retienen actividad farmacológica en el humo del cannabis, como el eugenol y el p-vinilfenol. La apigenina y otros flavonoides interactúan con los receptores de estrógenos y parecen ser los principales agentes estrogénicos en el humo de cannabis. Aunque la apigenina tiene una alta afinidad por los receptores de estrógenos (especialmente receptores  $\beta$ -estrógenos), tiene baja actividad estrogénica; la apigenina en realidad inhibe la proliferación estradiol inducida de células de cáncer de mama.<sup>22</sup>

La quercetina es un flavonol que se encuentra en casi todas las plantas vasculares, incluida el cannabis. La quercetina es un potente antioxidante; por algunas medidas más potente que el ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol y BHT.<sup>22</sup>

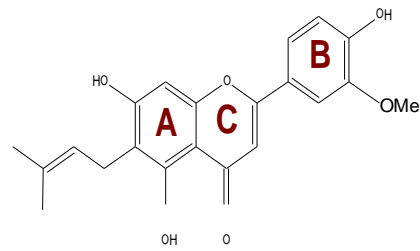
Las combinaciones de quercetina y otros antioxidantes funcionan sinérgicamente. El potencial antioxidante de la quercetina y otros flavonoides debe probarse contra el CBD, otro potente antioxidante. Quizás los flavonoides pueden inducir la reducción química del CBD, reciclando efectivamente el CBD como antioxidante. Los flavonoides bloquean la formación de radicales libres en varios pasos: eliminando aniones superóxido (en sistemas enzimáticos y no enzimáticos), apagando radicales peroxilo y alcoxilo intermedios, y por quelación de iones de hierro, que catalizan muchas reacciones de Fenton que conducen a la formación de radicales libres. Los radicales libres activan NF- $\kappa$ B, una proteína del factor de transcripción que induce la expresión de oncogenes, inflamación y apoptosis. La quercetina detiene la formación de NF- $\kappa$ B, al bloquear la fosforilación inducida por PKC de una subunidad inhibidora de NF- $\kappa$ B llamada I $\kappa$ B, en consecuencia, la quercetina impide la carcinogénesis y las enfermedades inflamatorias. NF- $\kappa$ B también juega un papel en la activación del VIH-1, por lo que la quercetina puede dificultar la replicación de ese virus. Estos flavonoides pueden sinergizar con CBN, que también regula negativamente a NF- $\kappa$ B, contrarrestando así los efectos del

THC, que puede aumentar la actividad de NF- $\kappa$ B.<sup>22</sup>

Los flavonoides tienen grandes actividades farmacológicas en modelos "*in vitro*" tales como: antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, antibióticas, antidiarreicas y contra el cáncer. En modelos "*in vivo*" no se ha podido demostrar la actividad antioxidante, así como no se han podido relacionar directamente con la efectividad contra el cáncer.<sup>34</sup>



Cannflavin A



Cannflavin B

**Figura 8.** Estructura de cannflavinas A y B.<sup>35</sup>

### 2.3.1.2. Los compuestos no - flavonoides

#### a. Los ácidos fenólicos

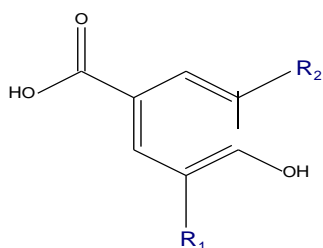
Los ácidos fenólicos generalmente existen en forma libre, esterificada o glicosilada en las plantas.<sup>36</sup>

Los ácidos fenólicos incluyen ácidos hidroxibenzoicos con 7 átomos de carbono, y ácidos hidroxicinámicos con 9 átomos de carbono. Están formados básicamente por un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo. Son denominados hidroxicinámicos o hidroxibenzoico por la sustitución del grupo -OH (hidroxilo) en el anillo aromático.<sup>32</sup>

#### b. Los ácidos hidroxibenzoicos

Los ácidos hidroxibenzoicos tienen una estructura general C1-C6 y derivan directamente del ácido benzoico. Las variaciones en las estructuras de los diferentes ácidos hidroxibenzoico se encuentran en las hidroxilaciones y las metilaciones del anillo aromático. Encontramos especialmente cuatro ácidos fenólicos: p-hidroxibenzoico, vanílico, sirínico y protocatéquico. Pueden estar presentes en forma soluble combinados con azúcares o ácidos orgánicos, así como en las fracciones de las paredes celulares, por ejemplo, la lignina. Un ácido hidroxibenzoico también muy común es el ácido salicílico (hidroxibenzoato).<sup>32</sup>

El ácido gálico es un derivado trihidroxílico involucrado en la formación de galotaninos hidrolizados. Su producto de condensación dimérica (ácido hexahidroxidifenico) y dilactona (ácido elágico) (**Figura 9**) son metabolitos comunes en la planta.<sup>32</sup> El ácido elágico está normalmente presente en los elagitaninos en forma de éster.<sup>32</sup>



Ácidos hidroxibenzoico	R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>
Ácido p-hidroxibenzoico	H	H
Protocatéquico	OH	H
Vanílico	OCH <sub>3</sub>	H
Sirínico	H	OCH <sub>3</sub>
Ácido gálico	OH	OH

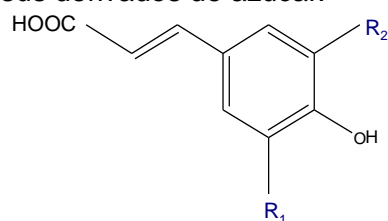
**Figura 9.** Estructura química básica de los ácidos hidroxibenzoicos.<sup>32</sup>

#### c. Los ácidos hidroxicinámicos

Los cuatro ácidos hidroxicinámicos más conocidos y de mayor abundancia en la naturaleza son los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, por lo general se



encuentran en diversas formas conjugadas, siendo las más habituales los esteres de hidroxiácidos tales como el ácido quínico y ácido tartárico, así como sus derivados de azúcar.<sup>32</sup>



Ácidos hidroxicinámicos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
P-cumárico	H	H
Caféico	OH	H
Ferúlico	COH <sub>3</sub>	H
Sinápico	COH <sub>3</sub>	COH <sub>3</sub>

**Figura 10.** Estructura de ácidos hidroxicinámicos.<sup>32</sup>

#### 2.4. Método de extracción de compuestos fenólicos

El procedimiento de extracción es un paso primario en la identificación y/o cuantificación del proceso de compuestos químicos. Numerosos informes se centran en la extracción y el análisis de CP a partir de materiales vegetales, como hierbas, frutas y verduras.<sup>37</sup> Sin embargo, actualmente no existe un método o un protocolo de extracción estándar.<sup>12</sup>

La extracción completa de compuestos fenólicos es el siguiente paso crítico después de la preparación de la muestra. Las técnicas más comunes para extraer compuestos fenólicos emplean disolventes, ya sean orgánicos o inorgánicos. Varios parámetros pueden influir en el rendimiento de compuestos fenólicos, incluidos el tiempo de extracción, la temperatura, la relación disolvente a muestra, el número de extracciones repetidas de la muestra, así como el tipo de disolvente. Además, la recuperación óptima de compuestos fenólicos es diferente de una

muestra a otra y depende del tipo de planta y sus compuestos activos. La elección de solventes de extracción tales como agua, acetona, acetato de etilo, alcoholes (metanol, etanol y propanol) y sus mezclas influirán en los rendimientos de fenólicos extraídos.<sup>36</sup>

Además de seleccionar el solvente de extracción óptimo, existen otros dos parámetros importantes que afectan el rendimiento de compuestos fenólicos extraídos de alimentos vegetales: tiempo y temperatura. Normalmente, el aumento del tiempo y la temperatura promueven la solubilidad del analito; sin embargo, los compuestos fenólicos de la planta generalmente se degradan o experimentan reacciones indeseables tales como la oxidación enzimática por tiempos de extracción prolongados y altas temperaturas. La relación de disolvente a muestra y el número de extracciones repetidas realizadas para cada muestra también afectan la recuperación de fenólicos. Aumentar la relación de disolvente a muestra promueve la extracción fenólica de las muestras de plantas, pero es aconsejable determinar la proporción óptima, de forma que se minimicen los efectos de entrada y saturación del solvente por los fenólicos. La técnica y el solvente son factores clave para maximizar la recuperación selectivamente, evitando sustancias no deseadas. En los métodos tradicionales, se usa equipo simple, donde a menudo la calidad, cantidad y tiempo de extracción son cuestionables. Con el tiempo, estos métodos se han mejorado para aumentar la eficiencia de extracción y para reducir el tiempo de extracción. Se han desarrollado muchas técnicas de extracción modernas para la extracción rápida y selectiva con menos cantidad de disolvente. Algunas técnicas comunes de extracción se enumeran en la **Tabla 4**.<sup>38</sup>

**Tabla 4.** Varios métodos de extracción.<sup>38</sup>

Método Tradicional	Método Avanzado
Infusión	Extracción de líquido presurizado (ELP)
Decocción	Extracción de fluido supercrítico (EFS)
Maceración	Extracción asistida por microondas (EAM)
Percolación	Extracción asistida por ultrasonido (EAU)
Extracción de reflujo	Extracción asistida por enzimas (EAE)
Extracción soxhlet	Extracción de campo eléctrico pulsado (PEF)

## 2.5. Métodos para determinación de compuestos fenólicos

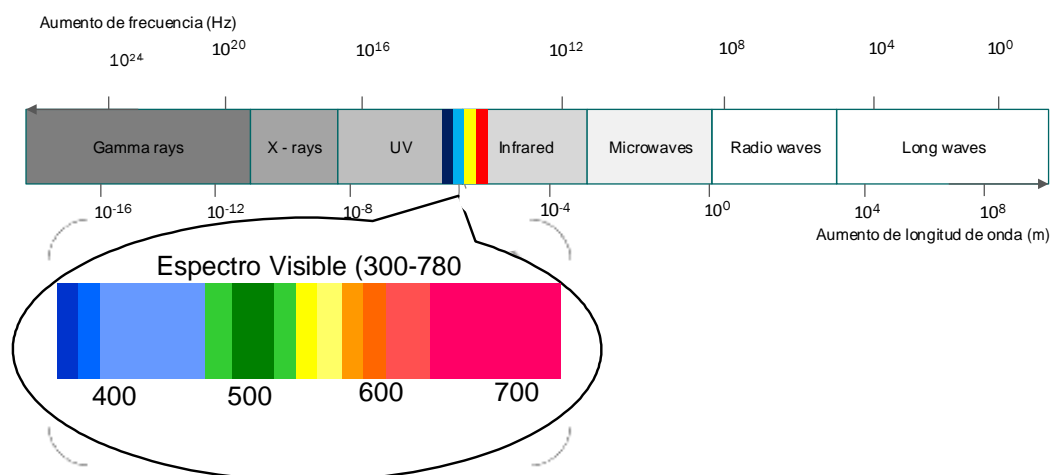
El análisis de los compuestos fenólicos en los vegetales inicia con una extracción; este procedimiento depende del tipo de vegetal que vaya a ser analizado y el

compuesto fenólico que se desee obtener. El primer paso consiste en partir, moler o macerar la muestra para incrementar el área superficial, esto permite un mejor contacto con el disolvente que se utilice para extraer los compuestos de interés. Esto también ayuda en el mezclado de la muestra para asegurar que la porción extraída es representativa de la muestra completa. Como muchos de los compuestos fenólicos se encuentran en forma de glicósidos o ésteres, la preparación de la muestra puede incluir hidrólisis ácida, alcalina e incluso enzimática para liberar los enlaces fenólicos.<sup>39</sup>

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar compuestos fenólicos totales en alimentos y vegetales son el ensayo de vainillina y el de Folin-Ciocalteu.<sup>39</sup>

## 2.6. Espectroscopía UV/VIS

En términos físicos, la luz es un tipo de energía que se propaga en el espacio a una velocidad muy alta. Más específicamente, la luz se extiende como una onda electromagnética que viaja en el espacio - es energía radiante. La energía de la luz oscila periódicamente entre un mínimo y un máximo en función del tiempo - como una onda. La distancia entre dos máximos o dos mínimos, respectivamente, de la onda electromagnética se define como la longitud de onda dada en nanómetros (nm). Cada color tiene una longitud de onda específica. Por lo tanto, los diferentes componentes de la luz se caracterizan por una longitud de onda específica. Donde la suma de todos los componentes, es decir, de todas las longitudes de onda, es llamada un espectro que representa una distribución de la energía radiante. Por ejemplo, en la **Figura 11**, el espectro electromagnético de la luz visible va desde aproximadamente 390 nm hasta aproximadamente 780 nm.<sup>40</sup>



**Figura 11.** El espectro visible (390 – 780 nm) representa una pequeña parte del espectro electromagnético.<sup>40</sup>

Un espectrofotómetro UV/VIS mide la intensidad de la luz que pasa a través de una solución de muestra en una cubeta, y la compara con la intensidad de la luz antes de que pase a través de la muestra. Los principales componentes de un espectrofotómetro UV/VIS son una fuente de luz, un soporte de muestras, un dispositivo de dispersión para separar las diferentes longitudes de onda de la luz (por ejemplo, un monocromador), y un detector adecuado.<sup>40</sup>



**Figura 12.** Principio de medición en espectroscopia UV/VIS.<sup>40</sup>

### 2.6.1. Cuantificación de compuestos fenólicos por espectrofotometría

Se han desarrollado varios métodos espectrofotométricos para la cuantificación de compuestos fenólicos de subproductos de plantas y alimentos, así como para medir la capacidad antioxidante de sus extractos.<sup>2</sup> Los métodos Folin - Denis y Folin - Ciocalteu fueron los dos ensayos espectrofotométricos ampliamente utilizados para medir fenólicos totales en materiales vegetales durante muchos años. Ambos métodos se basan en una reducción química que incluye reactivos que contienen tungsteno y molibdeno. Los productos de esta reducción en presencia de compuestos fenólicos tienen un color azul con un amplio espectro de absorción de luz alrededor de 760 nm. Los reactivos para ambos métodos no reaccionan específicamente solo con fenoles, sino también con otras sustancias como ácido ascórbico, aminas aromáticas y azúcares.<sup>36</sup>

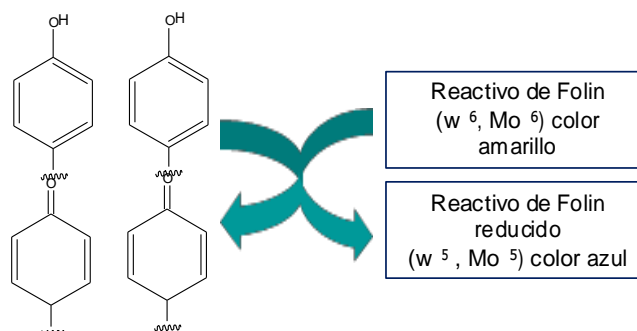
La cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales, proantocianidina (tanino condensado) y el tanino hidrolizable también se pueden estimar mediante métodos colorimétricos. Los extractos metanólicos o etanólicos de fenoles vegetales mezclados con  $AlCl_3$  permiten la medición de flavonoides totales en el rango de 470 a 423 nm.<sup>36</sup>

Los ensayos espectrofotométricos son adecuados para el análisis de polifenoles ya que el espectro UV-Vis se atribuye a las transiciones electrónicas que tienen lugar dentro de los grupos OH-fenólicos. La ocurrencia de las transiciones es característica de las diferentes clases de compuestos fenólicos. Estos métodos se basan en la determinación de diferentes grupos estructurales presentes en compuestos fenólicos para proporcionar el contenido total de polifenoles. Además,

estos ensayos tienen la ventaja de ser simples, de bajo costo y relativamente rápidos.<sup>2</sup>

### 2.6.1.1. Determinación de compuestos fenólicos totales

El método de Folin - Ciocalteu (FC) o de Folin - Denis es el ensayo más ampliamente utilizado para cuantificar los compuestos fenólicos totales presentes en una muestra. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos. Sin embargo, este reactivo no solo mide los fenoles totales, sino que reaccionará con cualquier sustancia reductora, por lo que mide la capacidad reductora total de una muestra. En la **Figura 13**, el ácido fosfomolibdotúngstico de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul en un medio alcalino, que es el que medimos a una longitud de onda de 760 nm.<sup>3, 41</sup>



**Figura 13.** Reacción de Folin – Ciocalteu.<sup>41</sup>

El reactivo FC reacciona fuertemente con compuestos que donan fácilmente electrones, como compuestos fenólicos mono y dihidroxilados. Luego, los resultados obtenidos en estas mediciones se expresan en mg de equivalente de ácido gálico/g de extracto seco o muestra (mg GAE/g) en sólidos y/o mg de ácido gálico equivalente/L (mg GAE/L) en muestras líquidas, es decir la concentración de ácido Gálico genera una respuesta equivalente a la producida por los compuestos fenólicos presentes en la muestra.<sup>2</sup>

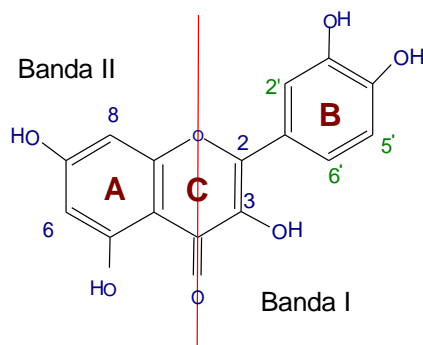
El reactivo FC no es específico para componentes fenólicos ya que puede ser reducido por varios compuestos no fenólicos. Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo FC solo bajo condiciones de basicidad (ajustado mediante una disolución de carbonato sódico a pH 10). La disociación de un protón de un grupo fenólico lleva a la formación de un anión fenolato que es capaz de reducir el reactivo FC. Los componentes azules formados por los fenolatos y el reactivo FC son independientes de la estructura de los componentes fenólicos lo

cual descarta la posibilidad de que sean complejos formados entre el centro metálico y los componentes fenólicos.<sup>42</sup>

### 2.6.1.2. Determinación de compuestos flavonoides totales

La espectroscopia UV ha llegado a ser la mejor técnica para el análisis estructural de los flavonoides por dos principales razones: 1) requiere solo una pequeña cantidad de sustancia pura y 2) la información estructural obtenida de un espectro UV se incrementa por el uso de reactivos específicos que reaccionan con uno o más grupos funcionales del núcleo de los flavonoides. La adición de cada uno de esos reactivos por separado a una solución alcohólica de los flavonoides induce cambios estructuralmente significativos en el espectro UV. Los cambios de este tipo son comúnmente inducidos por la adición de metóxido de sodio (NaOMe), acetato de sodio (NaOAc), acetato de sodio/ácido bórico (NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) y cloruro de aluminio/ácido clorhídrico (AlCl<sub>3</sub>/HCl).<sup>5</sup>

El espectro ultravioleta de muchos flavonoides consiste en dos máximos de absorción, uno de los cuales ocurre en el intervalo de 240-285 nm (Banda II) y la otra entre los 300-400 nm (Banda I). En términos generales, la banda de absorción II se considera que se origina del sistema benzoilo del anillo A y la banda I del sistema cinamoilo del anillo B (**Figura 14**).<sup>5</sup>



**Figura 14.** Bandas de absorción de la quercetina.<sup>5</sup>

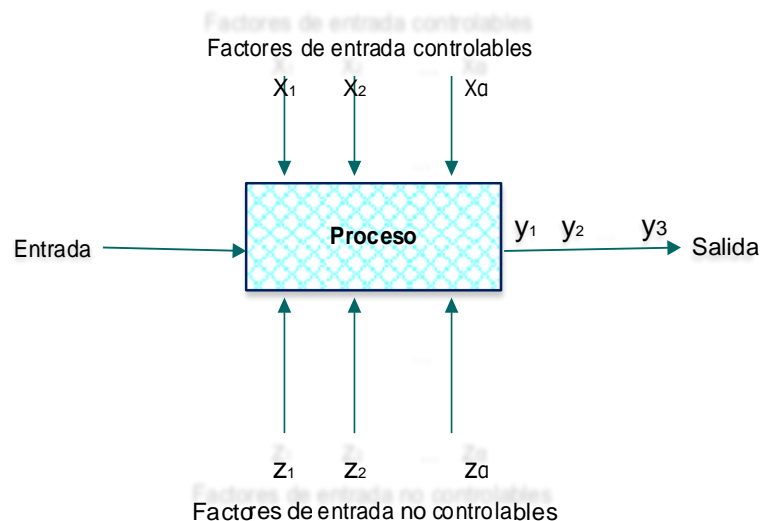
La mayoría de los flavonoides que se encuentran en las plantas, frutas y hierbas están glucosilados (especialmente flavonoles y flavonas), lo que puede bloquear la quelación adecuada con cloruro de aluminio. Entonces el bloqueo de los grupos hidroxilo (glucosilación) en la posición 3, 5, 3' o 4' dificulta la quelación con AlCl<sub>3</sub>, disminuyendo el desplazamiento batocrómico a 415-420 nm.<sup>2</sup>

### 2.7. Diseño de experimentos

El diseño de experimentos (DDE) es un conjunto de técnicas activas, en el sentido de que no esperan que el proceso mande las señales útiles, sino que este se "manipula" para que proporcione la información que se requiere para su mejoría.<sup>43</sup>

Los experimentos se utilizan para estudiar el rendimiento de procesos y sistemas. El proceso o sistema se puede representar mediante el modelo que se muestra en la **Figura 15**. Donde, podemos visualizar el proceso como una combinación de operaciones, máquinas, métodos, personas y otros recursos que transforman una entrada (a menudo un material) en una salida que tiene uno o más variables de respuesta observables. Algunas de las variables de proceso y las propiedades del material  $X_1, X_2, \dots, X_p$  son controlables, mientras que otras variables  $Z_1, Z_2, \dots, Z_q$  son incontrolables (aunque pueden ser controlables para los fines de una prueba). Los objetivos del experimento pueden incluir lo siguiente:

1) Determinar qué variables son más influyentes en la respuesta,  $Y$ ; y 2) Determinar dónde establecer las  $X$  influyentes para que  $Y$  esté casi siempre cerca del valor nominal deseado 3) Determinar dónde establecer las  $X$  influyentes para que la variabilidad en  $Y$  sea pequeña 4) Determinar dónde establecer las  $X$  influyentes para que los efectos de las variables incontrolables  $Z_1, Z_2, \dots, Z_q$  estén minimizados.<sup>44</sup>

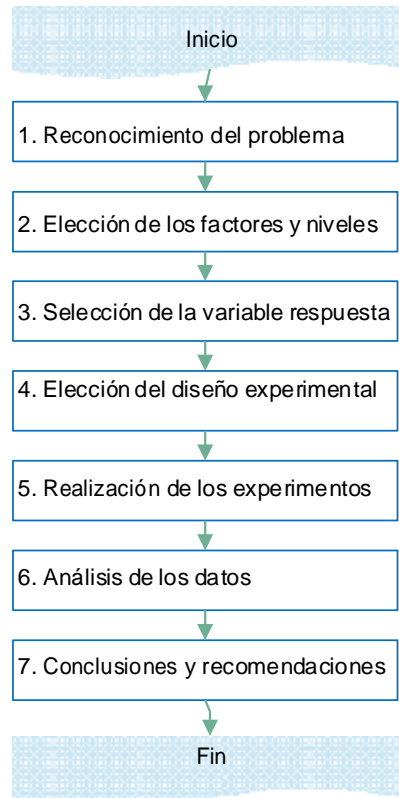


**Figura 15.** Modelo general de un proceso o sistema. <sup>43, 44</sup>

### 2.7.1. Metodología para la aplicación del diseño de experimentos

Un diseño de experimentos implica mucho más que decidir cuáles son las condiciones en las que se realizaran cada uno de los experimentos necesarios para conseguir el objetivo; se deben considerar, además, varias etapas previas y posteriores a la ejecución de tales experimentos. Por eso se prefiere denominarlo "planificación de la investigación", pues considera que este término es más amplio que el DOE. Sin embargo, en esta investigación se continuará usando, el termino antiguo.<sup>45</sup>

A lo largo de la historia varios autores han clasificado de distintas maneras las etapas necesarias para aplicar el DOE. Para la presente investigación se ha decidido seguir la metodología de Montgomery, base de muchas otras, que consta de las siete etapas mostrada en el **Figura 16**.<sup>45</sup>



**Figura 16.** Procedimiento para la realización de un DOE.<sup>45</sup>

### **1. Reconocimiento del problema**

El primer paso para realizar un DOE, es reconocer el problema. Se entiende como problema tanto una situación no deseable en la que algo está funcionando mal, como una situación que trabaja correctamente, pero que desea mejorar. La formulación del problema debe ser una descripción concisa y centrada en aquello que está mal; siempre que sea posible, será conveniente cuantificar el problema en términos de costo, pues esto permitirá cuantificarla mejora conseguida al final del proceso.<sup>45</sup>

### **2. Elección de los factores y niveles**

El paso siguiente consiste en proponer cuales son los factores que se intuye que puede influir en el problema que se está considerando. El trabajo en equipo es importante en esta etapa, incluyendo en especial a las personas más cercanas al proceso; la técnica de brainstorming y el uso de diagramas de causa – efecto pueden ayudar a ejecutar esta etapa de manera ordenada y consensuada. En un



diseño de experimentos se evaluará cada factor en condiciones diferentes, llamados niveles del factor.<sup>45</sup>

### **3. Selección de la variable de respuesta**

Se llama respuesta o variable dependiente a la variable con que se evalúa el problema. En la práctica es usual no poder establecer una única respuesta para un problema, ya que, por ejemplo, se puede necesitar optimizar dos variables al mismo tiempo.<sup>45</sup>

### **4. Elección del diseño experimental**

Establecido los factores y niveles con los que experimenta, es necesario seleccionar las condiciones en las que se deben realizar los experimentos. La experiencia y conocimientos teóricos sobre distintos diseños son de gran ayuda en esta etapa; en gran medida ellos determinan el número de experimentos que se van a realizar. La elección de un diseño está directamente asociada con un modelo matemático que relaciona la respuesta con los factores analizados. La mayoría de los diseños utilizados (factoriales, ortogonales de Taguchi, Plackett - Burman) suponen un modelo lineal en la respuesta. Si se prevé una no linealidad importante se debe recurrir a diseños que permitan ajustar modelos de orden superior. Diseños de segundo orden como los diseños compuestos centrales (DCC) y diseños de Box Behnken (BBD), por ejemplo, son muy utilizados en la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), en zonas cercanas al óptimo.<sup>45</sup>

### **5. Realización de los experimentos**

Para realizar los experimentos, primero hay que asegurarse de que todos los recursos necesarios están disponibles.<sup>45</sup>

Coleman et al.<sup>47</sup> sugieren que antes de la realización del experimento puede ser conveniente realizar pruebas piloto que proporcionan información acerca de la consistencia del material experimental y chequean los sistemas de medición para realizar una primera estimación del error experimental. Si sucediera algún imprevisto, las pruebas piloto permiten modificar decisiones previas. Cumplidas las etapas anteriores se proceden a la realización del experimento y recopilar información.

### **6. Análisis de datos**

Esta es la etapa que requiere mayor conocimiento estadístico. Los estadísticos se utilizan para analizar los datos, procurando que los resultados y las conclusiones sean objetivos. La diversidad de Software permite realizar los cálculos matemáticos y los gráficos necesarios; en este caso se ha utilizado STATGRAPHICS

Centurión XVI.

### **2.7.2. Optimización de experimentos**

Optimización es mejorar y aumentar el rendimiento de un proceso o sistema con el fin de obtener el máximo beneficio de él. Los estudios de optimización pueden llevarse a cabo utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR), el cual se hace mención en el numeral 2.7.3., que mide una variable de interés, para encontrar combinaciones de variables que maximicen o minimicen la respuesta óptima del producto.<sup>47</sup>

### **2.7.3. Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)**

La MSR es una colección de técnicas estadísticas y matemáticas útil para desarrollar, mejorar y optimizar procesos. También tiene importantes aplicaciones en el diseño, desarrollo y formulación de nuevos productos, así como en mejora de diseños de productos existentes.<sup>48</sup>

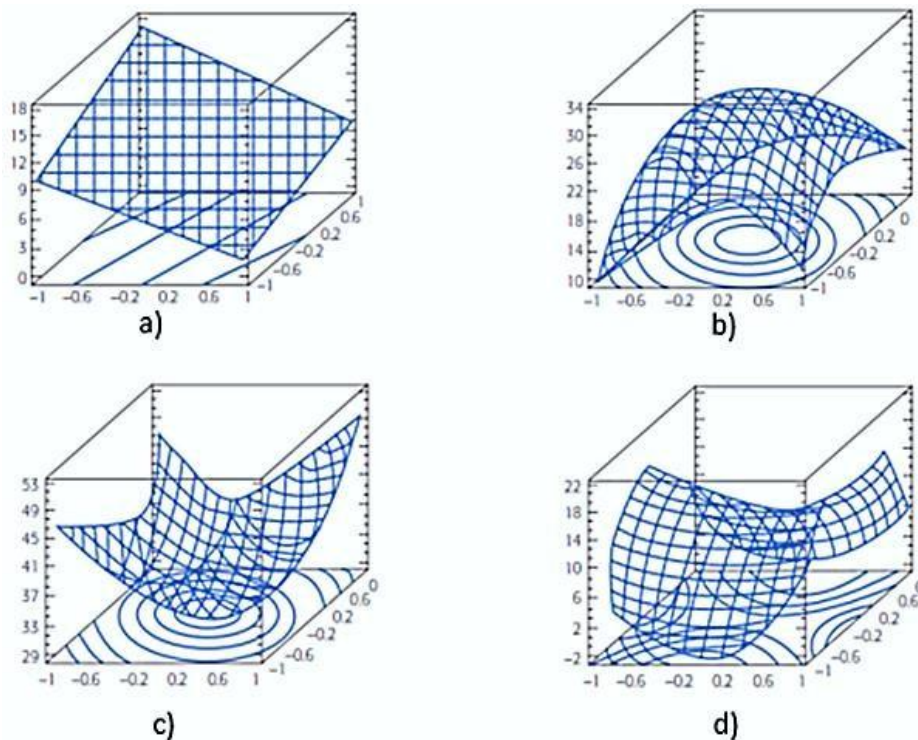
Las aplicaciones más extensas de MSR están en el mundo industrial, particularmente en situaciones donde varias variables de entrada pueden influir en las medidas de rendimiento o características de calidad del producto o proceso. Estas medidas de rendimiento o características de calidad se llaman la respuesta.<sup>48</sup> La MSR es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado "valores óptimos" de una o varias características de calidad del producto.<sup>43</sup>

#### **2.7.3.1. Elementos de la MSR**

La MSR implica tres aspectos: diseño, modelo y técnica de optimización. El diseño y el modelo se piensan al mismo tiempo, y dependen del tipo de comportamiento que se espera en la respuesta. De manera específica, el modelo puede ser de primero o segundo orden (plano o con curvatura); por ello, el tipo de diseño utilizado y el método de optimización se clasifican, según sea el caso, como de primero o segundo orden. El aspecto diseño implica que para optimizar un proceso se debe aplicar el diseño de experimentos, en particular aquellos que sirven para ajustar un modelo de regresión lineal múltiple. El aspecto del modelo utiliza el análisis de regresión lineal múltiple, junto con sus elementos básicos que son: parámetros del modelo, modelo ajustado, significancia del modelo, prueba de falta de ajuste, residuos, predichos, intervalos de confianza para predichos y coeficiente de determinación. Por último, el aspecto de optimización está formado por algunas técnicas matemáticas que sirven para que, dado un modelo ajustado,

explorarlo a fin de obtener información sobre el punto óptimo.<sup>43</sup>

En la MSR, se distinguen tres etapas en la búsqueda del punto óptimo: a) Cribado, la optimización de un proceso se inicia con esta etapa cuando tiene muchos factores (más de 6 u 8) que influyen en la variable de interés; b) Búsqueda I o de primer orden, se aplica cuando se tienen pocos factores ( $k < 5$ ), y se sabe que éstos influyen en la variable de respuesta. En esta etapa se corre un diseño de primer orden que permita caracterizar en forma preliminar el tipo de superficie de respuesta y detectar la presencia de curvatura. Por lo general se utiliza un diseño factorial completo o fraccionado con repeticiones al centro, y c) Búsqueda II o de segundo orden. Cuando el experimentador se encuentre relativamente cerca del óptimo, se requiere un modelo que incorpore la curvatura para aproximar la respuesta, se corre o se completa un diseño de segundo orden para caracterizar la naturaleza de la superficie y modelar la curvatura. La localización del punto estacionario podría representar 1) un punto de respuesta máxima; 2) punto de respuesta mínima y 3) un punto silla (**Figura 17**) Con el modelo ajustado se determinan las condiciones óptimas de operación del proceso.<sup>43, 44</sup>



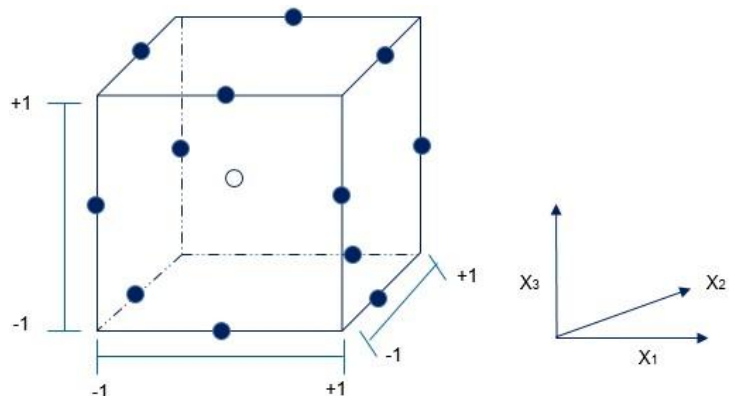
**Figura 17.** Superficie de respuesta: a) descrita por un modelo de primer orden; b) superficie con un máximo, c) superficie con un mínimo y d) superficie con un punto silla (o minimax), descritas por modelos de segundo orden.<sup>43, 44</sup>

### 2.7.3.2. Diseño Box - Behnken

El diseño de Box - Behnken (DBB) se aplica cuando se tienen tres o más factores, y suelen ser eficientes en cuanto al número de corridas y son rotables o casi rotables.<sup>43</sup> El diseño de Box - Behnken es un diseño esférico, con todos los puntos localizados en una esfera de radio  $\sqrt{2}$ . Asimismo, el diseño de Box - Behnken no contiene ningún punto en los vértices de la región cubica creada por los límites superior e inferior de cada variable. Esto podría ser una ventaja cuando los puntos de los vértices del cubo representan combinaciones de los niveles de los factores cuya prueba es prohibitivamente costosa e imposible debido a restricciones físicas del proceso.<sup>44</sup> En la **Tabla 5**, se muestran los 15 tratamientos del DBB para tres factores. Su representación geométrica se muestra en la **Figura 18**. Note que los puntos de este diseño se ubican en medio de las aristas centrado en el origen y; como se había señalado, no incluye los tratamientos de los vértices, como el (1, 1, 1) y el (-1, -1, -1) que en algunas situaciones experimentales resulta extremos y no se pueden correr. Esto hace que los tratamientos del DBB al menos de los factores se fijan en la mitad de su rango de prueba. Lo anterior también ocurre con este diseño para más factores.<sup>43</sup>

**Tabla 5.** Matriz del diseño de Box - Behnken para tres factores.<sup>43</sup>

Corrida	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	0	-1	-1
6	0	1	-1
7	0	-1	1
8	0	1	1
9	-1	0	-1
10	1	0	-1
11	-1	0	1
12	1	0	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0



**Figura 18.** Representación del diseño de Box – Behnken para tres factores con un solo punto central.<sup>43, 44</sup>

## 2.8. Marco Legal

La legalidad del cannabis o regulación legal del cannabis, referida al uso del cannabis como droga ha sido y es objeto de debate y controversia desde hace décadas. Prácticamente todos los países tienen leyes concernientes al cultivo, posesión, venta y consumo de cannabis. Los productos no psicoactivos (p.ej. fibra y semillas) son legales en muchos países y en ellos las autoridades pueden dar licencia para el cultivo orientado a dichos fines. La hierba, sin embargo, es una sustancia controlada en casi todo el mundo, aunque existen excepciones por motivos médicos.<sup>49</sup>

En octubre de 2017, Perú aprobó la “Ley que regula el uso medicinal y terapéutico del cannabis y sus derivados”.<sup>50</sup>, que fue promulgada por el presidente Pedro Pablo Kuczynski el 16 de noviembre.<sup>51</sup> La ley propone el uso de registros para los diversos actores que deseen tener acceso al cannabis (es decir, pacientes, importadores, entidades de investigación y entidades públicas), así como el otorgamiento de licencias gubernamentales para la investigación, importación, comercialización y producción. Es importante señalar que el país ha reconocido los beneficios del cannabis como parte del tratamiento de síntomas en enfermedades como el cáncer o la esclerosis múltiple, quedando pendiente la clarificación del mecanismo regulatorio que posibilitará el acceso legal a esta sustancia.<sup>52</sup>

**Ley N° 30681 “Ley que regula el uso medicinal y terapéutico del cannabis y sus derivados”.**<sup>50</sup>

**Artículo 5, Licencias.** - Las actividades señaladas en el artículo 3, con excepción del uso informado, requieren el otorgamiento de una licencia a cargo del poder ejecutivo. El reglamento de la presente ley establece los requisitos para el otorga-

miento de las licencias.<sup>50</sup>

Los tipos de licencia son los siguientes:

- Licencia para la investigación científica, para las universidades e instituciones de investigación agraria y en la salud.
- Licencia para la importación y/o comercialización.
- Licencia para la producción, que se otorga exclusivamente a las entidades públicas y laboratorios debidamente registrados y certificados.

**Artículo 8, Licencias para investigación.-** La licencia para investigación científica del cannabis y sus derivados, con fines exclusivamente medicinales y terapéuticos requiere de laboratorios acreditados y certificados en las condiciones que establezca el reglamento. La licencia de investigación requiere la descripción de los proyectos de investigación, los responsables técnicos a cargo de los proyectos, la duración y el informe de los resultados.<sup>50</sup>

Los restos del cannabis y sus derivados no utilizados en la producción y en la investigación, para fines exclusivamente medicinales y terapéuticos se incineran, en las condiciones que establezca el reglamento, bajo sanción automática de la de la licencia, y sin perjuicio de las responsabilidades administrativas, civiles y penales.<sup>50</sup>

**Artículo 299.-** No es punible la posesión de droga para el propio e inmediato consumo, en cantidad que no exceda de cinco gramos de pasta básica de cocaína, dos gramos de clorhidrato de cocaína, ocho gramos de marihuana o dos gramos de sus derivados, un gramo de látex de opio o doscientos miligramos de sus derivados o doscientos cincuenta miligramos de éxtasis, conteniendo Metilendioxianfetamina-MDA, Metilendioximetanfetamina-MDMA, Metanfetamina o sustancias análogas.<sup>50</sup>

Se excluye de los alcances de lo establecido en el párrafo precedente la posesión de dos o más tipos de drogas.<sup>53</sup>

**Ley N° 29459 “Ley de los productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios”**

Es importante indicar que, dentro de lo regulado por la Ley, solo los productos farmacéuticos estarían relacionados al presente trabajo. Estos se definen, de acuerdo al **artículo 4** de la norma, como un preparado de composición conocida, rotulado y envasado uniformemente, destinado a ser usado en la prevención, diagnóstico, tratamiento y curación de una enfermedad, conservación y rehabilitación de la salud. En ese sentido, un producto farmacéutico podría ser los

cannabinoides sintéticos elaborados para el tratamiento del dolor neuropático a partir del *Cannabis sativa*. Por su parte, los dispositivos médicos son cualquier instrumento, aparato, implemento, máquina, reactivo o calibrador in vitro u otro artículo similar o relacionado, previsto por el fabricante para ser empleado en seres humanos para el diagnóstico, prevención, monitoreo, tratamiento o alivio de una enfermedad, entre otros. Mientras que el producto sanitario es aquel destinado a la limpieza y protección personal. Se concluye por ello, que el *Cannabis Sativa* no puede ser utilizado para elaborar un dispositivo médico ni para elaborar un producto sanitario, por lo que solo encaja dentro del concepto de producto farmacéutico.<sup>53</sup>

**Decreto Supremo Nº 023-2001-SA “Reglamento de estupefacientes, psicotrópicos y otras sustancias sujetas a fiscalización sanitaria”**

El artículo 2 del reglamento comprende las Listas I A, I B, II A, II B, III A, III B, III C, IV A, IV B, V y VI del Decreto Ley Nº 22095 y Listas conexas de Convenios Internacionales sobre la materia incorporados al derecho interno. Asimismo, se indica que queda prohibido la producción, fabricación, exportación, importación, comercio y uso de las sustancias de la Lista I A y I B del Anexo Nº 2. El Cannabis, resinas y aceites esenciales están considerados dentro de la Lista I A como sustancia sometida a fiscalización. Por su lado, el artículo 23 permite la prescripción de medicamentos que contienen las sustancias incluidas en las Listas II A, III A, III B y III C.<sup>53</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación**

Este estudio se realizó en el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos "Laboratorio de Control de Calidad", del Área Académica de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.

#### **3.2. Población y muestra**

##### **3.2.1. Población**

Inflorescencia femenina de *Cannabis sativa* L. "marihuana" incautadas por los peritos del Departamento de Criminalística de la REGPOL - Ayacucho, sección de Química y Toxicología Forense, del distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, Departamento Ayacucho.

##### **3.2.2. Muestra**

La muestra consistió en 400 g de inflorescencia seca de *Cannabis sativa* L., entregado por los peritos del Departamento de Criminalística de la REGPOL - Ayacucho.

##### **3.2.3. Muestreo**

La técnica de muestreo fue no probabilístico en la que se empleó la estrategia del muestreo aleatorio simple ya que se cuenta una población relativamente pequeña además con un listado de unidades. Como se trata de optimizar un proceso donde la variable de respuesta es cuantitativa (contenido de fenoles y flavonoides totales), el muestreo se realizó de tal modo que se garantice la mejor respuesta, por lo que se tuvo en consideración algunos criterios generales de inclusión y exclusión de la muestra.

###### **3.2.3.1. Criterios de inclusión**

- Inflorescencia en buen estado de conservación.
- Inflorescencia de planta en etapa de floración.
- Inflorescencia integras sin lesiones por traumatismo o plaga.



- Inflorescencias, normalmente pigmentadas.

#### **3.2.3.2. Criterios de exclusión**

- Inflorescencias que se encuentren en mal estado de conservación y que presente signos visibles de descomposición microbiana.
- Inflorescencia, de plantas en etapa juvenil.
- Inflorescencias incompletas, con lesiones por traumatismo o plaga.
- Inflorescencias polinizadas.

#### **3.2.4. Unidad experimental**

Diez gramos de inflorescencia seca, molido y tamizado de *Cannabis sativa* L.

### **3.3. Diseño metodológico**

#### **3.3.1. Recolección de la muestra**

Para este estudio, las inflorescencias femeninas de *Cannabis sativa* L. "marihuana", muestra que fue incautada por parte de los peritos del Departamento de Criminalística de la REGPOL - Ayacucho, fueron facilitados previa documentación. La remisión de la muestra seca se realizó al Laboratorio de Control de Calidad de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica.

La identificación y clasificación taxonómica de la planta se realizó en el laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas por la Bióloga Laura Aucasime Medina, la cual consta en el **Anexo 1**.

#### **3.3.2. Secado y molienda**

Las inflorescencias secas fueron separadas del meristemo apical y semillas, para ser reducidas a partículas finas en un mortero.

El método analítico consistió en colocar los tamices, uno sobre otro en orden creciente de abertura para luego transferir la muestra al tamiz superior. Posteriormente se agito hasta completar el pasaje del polvo que tuvo como tamaño nominal la abertura de 0.5 mm.

#### **3.3.3. Diseño experimental**

Los niveles usados en dichos factores o variables independientes se deben a que en un estudio preliminar se trabajó con concentraciones de etanol de 50 a 90 °GL manteniendo fijos todos los factores restantes y como sus resultados fueron mejores con 80 °GL se optó por trabajar con un rango de 70 a 90 °GL de etanol, en el mismo estudio se utilizó una relación sólido:líquido de 10:100 a 10:250 g/mL y como sus resultados fueron mejores a 10:200 g/mL se optó por trabajar con un rango de 10:100 a 10:300 g/mL . En cuanto al tiempo se utilizó 12 a 48 h. Y como

factores o variables dependientes será contenido de compuestos fenólicos totales (mg GAE/g) y contenido de compuestos de flavonoides totales (mg ER/g). Con base en los factores y niveles seleccionados se determinó aplicar en este estudio el diseño Box - Behnken, que es uno de los diseños más utilizados para la optimización de procesos. Donde se ha propuesto utilizar diseños de tres factores o variable independiente: etanol, relación S:L y tiempo de extracción (denotado por A, B y C) con tres niveles codificados para modelar los datos experimentales en lugar de los valores reales, como se muestra en la **Tabla 6**, cada predictor tenía 3 niveles de -1, 0 y 1 correspondientes a los valores inferior, central y superior, respectivamente.

**Tabla 6.** Factores (variables experimentales) y sus niveles experimentales utilizado en el diseño Box - Behnken, para la optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. "marihuana", Ayacucho 2018.

Factor (variables experimentales)	Niveles experimentales			Variable de respuesta
	-1	0	+1	mg EAG/g de
A: Grado alcohólico (°GL)	70	80	90	muestra seca y
B: Relación sólido: líquido (g/mL)	10:100	10:200	10:300	mg ER/g de muestra seca.
C: Tiempo de extracción (h)	12	30	48	

La matriz del diseño experimental fue generada en el software STATGRAPHICS Centurión XVI, la misma que estuvo constituida por 15 tratamientos experimentales aleatorizados, como se muestra en la **Tabla 7**, todas las experimentaciones se realizaron por duplicado, sometidas en las mismas condiciones.

### 3.3.4. Extracción de compuestos fenólicos

A partir de los 15 tratamientos aleatorizados, empezar la extracción con el tratamiento 1 (90°GL, 10:100 g/mL y 30h), por duplicado sometidos a las mismas condiciones. Se siguió el siguiente procedimiento:

- La inflorescencia de cannabis previamente triturado, se pulverizo de un tamaño de partícula de 0,5 mm; y se pesó en masa equivalente a 10 g llevándolo posteriormente a agitación magnética constante por 1 h con 100, 200 y 300 mL de menstruo (etanol de 70, 80 y 90°GL) por un periodo de 12,

30 y 48 h, según corresponda el tratamiento experimental, para que la droga entre en contacto con el solvente.

**Tabla 7.** Diseño experimental de Box - Behnken para la optimización de la extracción de compuestos fenólicos de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. "marihuana", Ayacucho 2018.

Tratamiento	A: Grado alcohólico (°GL)	B: Relación sólido: líquido (g/mL)	C: Tiempo (h)
1	90	10:100	30
2	90	10:200	12
3	80	10:100	48
4	90	10:200	48
5	70	10:200	12
6	80	10:100	12
7	70	10:300	30
8	70	10:200	48
9	80	10:300	12
10	70	10:100	30
11	90	10:300	30
12	80	10:300	48
13	80	10:200	30
14	80	10:200	30
15	80	10:200	30

- Transferir la muestra a un percolador, previamente acondicionado con algodón y papel filtro Whatman® grado 589/3 (41, Ashless, Circles, 150mm Dia, Cat No 1441 150), dejar pasar el menstuo a chorro tres veces, y dejar macerar. Se deja extraer durante el tiempo que corresponda el tratamiento experimental.
- Se sigue cada proceso de extracción según el orden de tratamientos establecidas por el diseño de Box - Behnken expuesto en la **Tabla 7**.
- Iniciar la percolación a razón de 30 a 40 gotas por minuto. Filtrar el percolado con papel de filtro Whatman® grado 589/3, para dejarlo libre de sólidos en suspensión.
- Concentrar el filtrado a una temperatura constante de 40°C en la estufa modelo JSON-100.
- Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales. Calcular los miligramos de fenoles totales expresados en ácido gálico por gramo de

extracto seco y miligramos de flavonoides totales expresado en rutina por gramo de extracto seco.

- Se realizará las extracciones con mezcla hidroalcohólica de 70°, 80° y 90°GL, con una relación sólido - líquido de 10:100, 10:200 y 10:300 g/mL y tiempo de extracción 12, 30 y 48 h por duplicado los 15 tratamientos que figura en la **Tabla 7.**

### **3.3.5. Determinación de fenoles totales**

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Subedi y col.<sup>54</sup>

Se preparó una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración fue de 10 - 60 µg/mL. Los extractos hidroalcohólicos de las 30 muestras fueron evaluados.

Cuyo fin es medir fenoles totales presentes en la muestra (marihuana). En el **Anexo 5** se detalla el procedimiento y se describe los cálculos.

#### **Preparación de la solución madre:**

Pesar 20 mg de ácido gálico, disolver con H<sub>2</sub>O destilada y enrazar a un volumen de 25 mL para obtener una solución madre de 800 µg/mL.

#### **Preparación de la curva de calibración de Ácido gálico:**

A partir de la solución madre se preparan soluciones estándares de 10, 20, 40, 60 µg/mL.

Tomar 100 µL de las soluciones estándares de ácido gálico luego adicionar 500 µL del reactivo de Folin - Ciocalteu (1/10) y 400 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%. Transcurrido 30 minutos se mide la absorbancia a 765 nm.

**Blanco:** 100 µL de agua destilada, 500 µL del reactivo de Folin - Ciocalteu (1/10) y 400 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%.

Diluir el reactivo Folin - Ciocalteu 1/10 con agua destilada (1 mL de reactivo Folin - Ciocalteu enrazar con agua destilada en una fiola de 10 mL).

**Muestra:** tomar 25 mg (extracto seco de *Cannabis sativa* L.) y llevar a una fiola de 25 mL y aforar con agua destilada (solución muestra).

**Procedimiento:** tomar directamente 100 µL de la solución muestra luego adicionar 500 µL del reactivo de Folin - Ciocalteu y 400 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%. Transcurrido 30 minutos se mide la absorbancia de cada uno a 765 nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra. La cantidad de compuestos fenólicos en extracto se determina en miligramos de contenido fenólico equivalente de ácido gálico/g de extracto, utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración de ácido gálico de 10 a 60 µg/mL.

Para determinar el valor del contenido de fenoles totales se procede a realizar una regresión lineal con las absorbancias obtenidas de tal manera que se obtiene la siguiente ecuación  $y=mx+b$ , para calcular el contenido de fenoles totales se debe reemplazar en el valor correspondiente en el "y" y en el eje "x". Posteriormente fueron expresadas como mg GAE/g de extracto.

### **3.3.6. Determinación de flavonoides totales**

El contenido de flavonoides totales en los extractos hidroalcohólicos fue determinado mediante el ensayo colorimétrico con  $AlCl_3$ , propuesto por Palominio.<sup>55</sup>

#### **Construcción de la curva de calibración**

Pesar 1 mg de rutina, llevar a un matraz volumétrico de 25 mL, se disolvió con 2,5 mL de metanol luego se aforo con etanol al 50%. De esta solución madre se tomaran directamente alícuotas de 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 mL luego se adicionó 0,5 mL de  $AlCl_3$  2% y etanol al 50% cantidad suficiente para 5 mL.

**Blanco:** se preparó de igual forma sin la muestra.

Se dejó reposar por 15 minutos y luego se realizó las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm.

**Muestra:** pesar 25 mg (extracto seco de *Cannabis sativa* L.) y llevar a una fiola de 25 mL y aforar con etanol al 50% (solución muestra).

**Procedimiento:** tomar directamente 2 mL de la solución muestra; 0,5 mL del reactivo de  $AlCl_3$  2% y etanol al 50% cantidad suficiente para 5 mL. Transcurrido 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 415 nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra. El contenido de flavonoides totales se calculara como miligramo equivalente de rutina/g de extracto a partir de la curva de calibración de este compuesto.

La curva de calibración se trabajara en un intervalo de concentración de 8 -32  $\mu g/mL$ . Las lecturas de los extractos de *Cannabis sativa* L. se realizaran por triplicado.

### **3.4. Diseño de investigación**

Según Hernández y col.<sup>56</sup>, el presente proyecto es una investigación cuantitativa en la que es posible encontrar diferentes clasificaciones de los diseños. En este proyecto adoptamos la siguiente clasificación: investigación experimental. Esta a su vez se divide en experimentos puros, y esta la subdividimos en un diseño factorial en la que se pretende analizar experimentalmente el efecto que sobre las variables dependientes tiene la manipulación de más de una variable

independiente. Es un diseño factorial donde se manipulan dos o más variables independientes e incluyen dos o más niveles o modalidades de presencia en cada una de las variables independientes. Se utilizan muy a menudo en la investigación experimental. La preparación básica de un diseño factorial consiste en que todos los niveles o modalidades de cada variable independiente son tomados en combinación con todos los niveles o modalidades de las otras variables independientes.

### **3.5. Análisis de datos**

La obtención del extracto hidroalcohólico de compuestos fenólicos totales de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L., fue optimizado con la MSR, haciendo uso del software STATGRAPHICS Centurion XVI.

Los datos obtenidos experimentalmente fueron sometidos a tratamientos estadísticos como análisis de varianza (ANVA), para saber cuál de los tres factores A, B, C y las interacciones AB, AC, BC, AA, BB o CC actúan sobre las variables de respuesta. También se representaron mediante el Diagrama de Pareto, los efectos que fueron significativos.

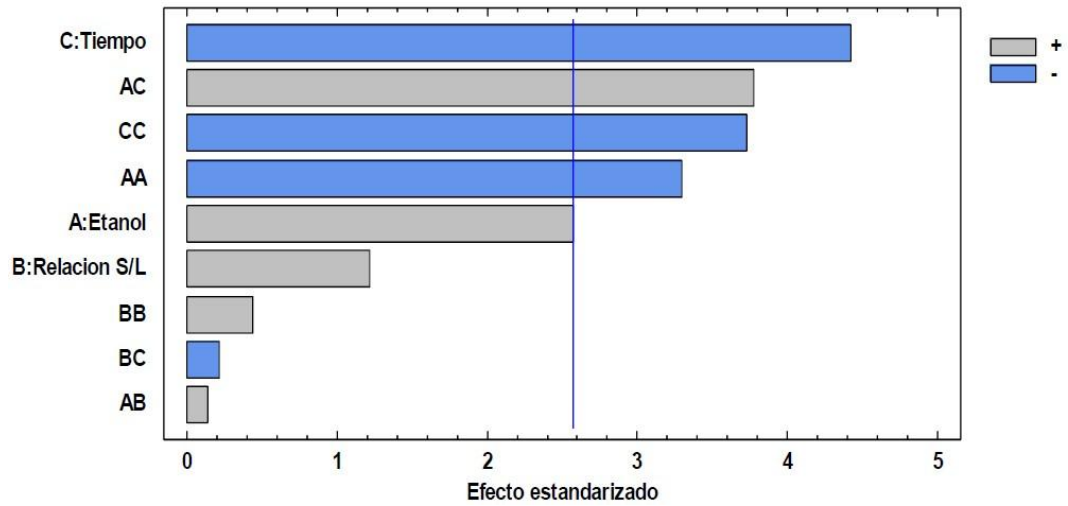
## **IV. RESULTADOS**

**Tabla 8.** Absorbancias y contenido de fenoles totales extraídos de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. "marihuana". Ayacucho 2018.

Tratamiento	X <sub>1</sub> : Etanol (°GL)	X <sub>2</sub> : Relación S:L (g/mL)	X <sub>3</sub> : Tiempo (h)	Abs. (DO 765 nm)	Contenido de fenoles totales (mg EAG/g)
1	90	10:100	30	0,553 ± 0,000	127,861 ± 0,110
2	90	10:200	12	0,537 ± 0,002	122,677 ± 0,473
3	80	10:100	48	0,534 ± 0,002	122,946 ± 0,477
4	90	10:200	48	0,548 ± 0,002	127,198 ± 0,481
5	70	10:200	12	0,566 ± 0,001	131,409 ± 0,292
6	80	10:100	12	0,612 ± 0,001	139,874 ± 0,188
7	70	10:300	30	0,574 ± 0,001	133,125 ± 0,221
8	70	10:200	48	0,412 ± 0,002	94,255 ± 0,475
9	80	10:300	12	0,592 ± 0,002	137,493 ± 0,481
10	70	10:100	30	0,524 ± 0,002	120,546 ± 0,379
11	90	10:300	30	0,614 ± 0,001	141,921 ± 0,291
12	80	10:300	48	0,515 ± 0,002	118,071 ± 0,475
13	80	10:200	30	0,599 ± 0,001	138,975 ± 0,221
14	80	10:200	30	0,609 ± 0,000	139,106 ± 0,108
15	80	10:200	30	0,609 ± 0,000	139,106 ± 0,108

Los resultados se muestran como media ± DE (n = 3)





**Figura 19.** Diagrama de Pareto de los efectos principales que afectan el contenido de fenoles totales en la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. "marihuana". Ayacucho 2018.

**Tabla 9.** Coeficiente de regresión y ecuación del modelo matemático ajustado del contenido de fenoles totales extraídos de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L.

Coeficiente		Estimado
C	Constante	-379,485
<b>Lineal</b>		
X <sub>1</sub>	Etanol	13,848
X <sub>2</sub>	Relación S:L	-0,0475379
X <sub>3</sub>	Tiempo	-3,06087
<b>Cuadrático</b>		
(X <sub>1</sub> ) <sup>2</sup>	Etanol Etanol	-0,0947471
(X <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>	Relación S:L Relación S:L	0,000125579
(X <sub>3</sub> ) <sup>2</sup>	Tiempo Tiempo	-0,0330369
<b>Interacción</b>		
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	Etanol Relación S:L	0,00039025
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	Relación S:L Tiempo	-0,000335833
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	Etanol Tiempo	0,0578833
<b>Modelo matemático ajustado</b>		
$Y = -379,485 + 13,848 * X_1 - 0,047 5379 * X_2 - 3,06087 * X_3 - 0,0947471 * X_1^2 + 0,00039025 * X_1 * X_2 + 0,0578833 * X_1 * X_3 + 0,000125579 * X_2^2 - 0,000335833 * X_2 * X_3 - 0,0330369 * X_3^2$		

Y: Contenido de fenoles totales

R-cuadrada = **92.9451** por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **80.2462** por ciento

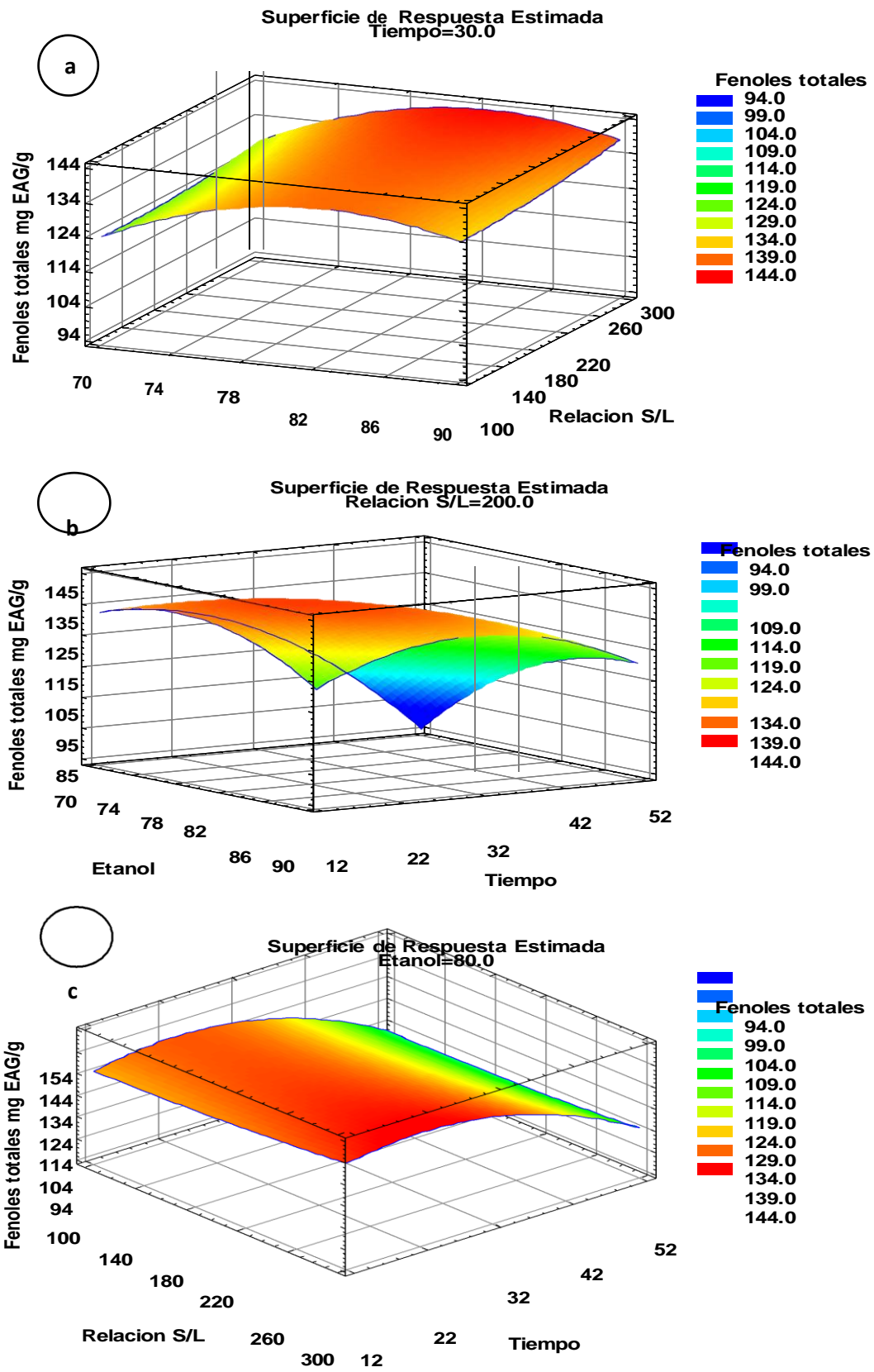


Figura 20. Gráficos de superficie de repuesta a) etanol, relación S:L y contenido

de fenoles totales; b) etanol, tiempo y contenido de fenoles totales; c) tiempo, relación S:L y contenido de fenoles totales en el extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L.

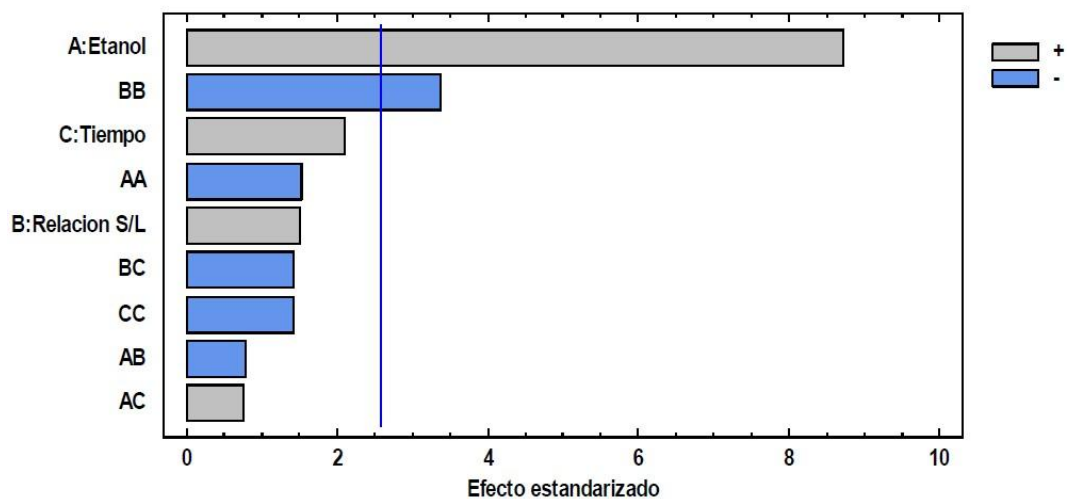
**Tabla 10.** Valores experimentales y predicho de fenoles totales bajo condiciones óptimas de la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. "marihuana". Ayacucho 2018.

Condición óptima			Fenoles totales (mg EAG/g)	
Etanol (°GL)	Relación S:L (g/L)	Tiempo (h)	Experimental ± DE n=3	Predicho
80,7	10:300,0	22,8	141,108 ± 0,509	144,742

**Tabla 11.** Absorbancias y contenido de flavonoides totales extraídos de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. "marihuana". Ayacucho 2018.

Tratamiento	X <sub>1</sub> : Etanol (°GL)	X <sub>2</sub> : Relación S:L (g/mL)	X <sub>3</sub> : Tiempo (h)	Absorbancia ( DO 415 nm)	Contenido de flavonoides totales (mg ER/g)
1	90	10:100	30	0,510 ± 0,002	8,140 ± 0,039
2	90	10:200	12	0,483 ± 0,003	7,626 ± 0,052
3	80	10:100	48	0,408 ± 0,003	6,494 ± 0,051
4	90	10:200	48	0,524 ± 0,001	8,396 ± 0,013
5	70	10:200	12	0,320 ± 0,003	5,147 ± 0,046
6	80	10:100	12	0,280 ± 0,000	4,439 ± 0,007
7	70	10:300	30	0,267 ± 0,000	4,292 ± 0,008
8	70	10:200	48	0,320 ± 0,001	5,087 ± 0,020
9	80	10:300	12	0,396 ± 0,000	6,349 ± 0,008
10	70	10:100	30	0,239 ± 0,003	3,820 ± 0,046
11	90	10:300	30	0,485 ± 0,001	7,743 ± 0,013
12	80	10:300	48	0,432 ± 0,002	6,842 ± 0,039
13	80	10:200	30	0,463 ± 0,002	7,407 ± 0,023
14	80	10:200	30	0,468 ± 0,000	7,390 ± 0,008
15	80	10:200	30	0,469 ± 0,000	7,396 ± 0,008

Los resultados se muestran como media ± DE (n = 3)



**Figura 21.** Diagrama de Pareto de los efectos principales que afectan el contenido de flavonoides totales en la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. "marihuana". Ayacucho 2018.

**Tabla 12.** Coeficiente de regresión y ecuación del modelo matemático ajustado del contenido de flavonoides totales extraídos de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. Ayacucho 2018.

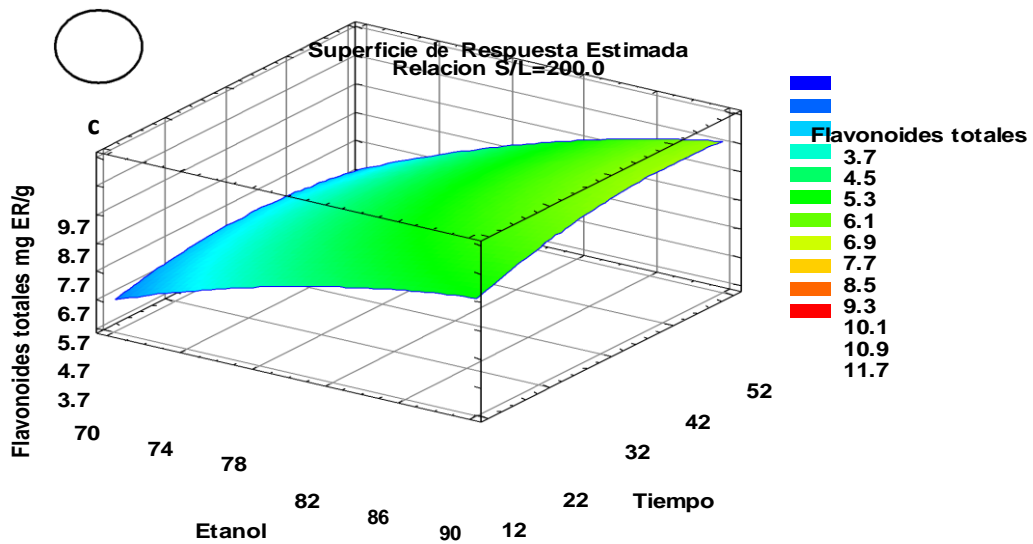
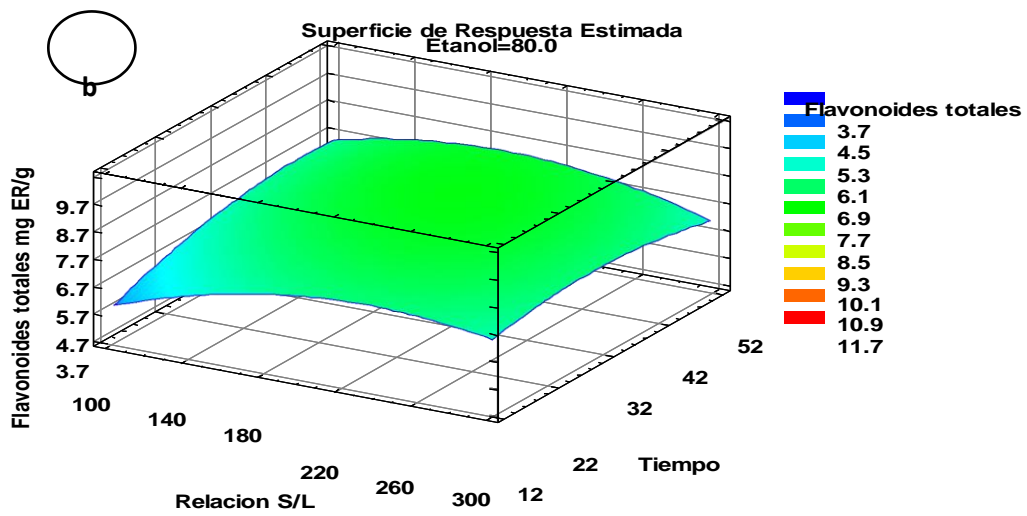
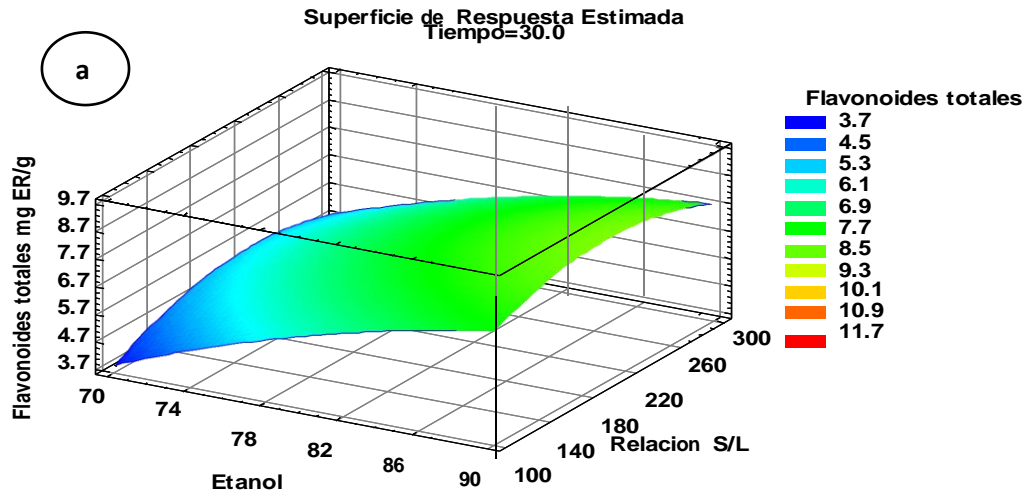
<b>Coefficiente</b>		<b>Estimado</b>
c	Constante	-42,4313
<b>Lineal</b>		
X <sub>1</sub>	Etanol	0,878396
X <sub>2</sub>	Relación S:L	0,0655704
X <sub>3</sub>	Tiempo	0,0484907
<b>Cuadrático</b>		
(X <sub>1</sub> ) <sup>2</sup>	Etanol Etanol	-0,004375
(X <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>	Relación S:L Relación S:L	-0,00009655
(X <sub>3</sub> ) <sup>2</sup>	Tiempo Tiempo	-0,00125077
<b>Interacción</b>		
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	Etanol Relación S:L	-0,0002185
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	Relación S:L Tiempo	-0,000217639
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	Etanol Tiempo	0,00115972
<b>Modelo matemático ajustado</b>		
$Y = -42,4313 + 0,878396 * X_1 + 0,0655704 * X_2 + 0,0484907 * X_3 - 0,004375 * X_1^2 - 0,0002185 * X_1 * X_2 + 0,00115972 * X_1 * X_3 - 0,00009655 * X_2^2 - 0,000217639 * X_2 * X_3 - 0,00125077 * X_3^2$		

Y: Contenido de flavonoides totales

-cuadrada = **95.2458** porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **86.6882** porciento





**Figura 22.** Gráficos de superficie de repuesta a) etanol, relación S:L y contenido de flavonoides totales; b) etanol, tiempo y contenido de flavonoides totales; c)

tiempo, relación S:L y contenido de flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L.

**Tabla 13.** Valores experimentales y predicho de flavonoides totales bajo condiciones óptimas de la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. "marihuana". Ayacucho 2018.

Condición óptima			Flavonoides totales	
Etanol (°GL)	Relación S:L (g/L)	Tiempo (h)	Experimental ± DE n=3	Predicho
90,0	10:187,2	44,8	8,619 ± 0,015	8,910

## V. DISCUSIÓN

La metodología de superficie de respuesta (MSR) representa una técnica de optimización con la finalidad de hacer eficientes los tratamientos de un proceso. Como resultado permite minimizar gastos de energía, costos de operación (tiempo de extracción, volumen de solventes, cantidad de muestra, entre otros) y la generación de desechos químicos con alto impacto ambiental, por lo que actualmente es aplicada ampliamente como alternativa en los procesos de extracción.<sup>12</sup>

Teóricamente, las variables o factores que interfieren en el proceso de extracción, independientemente de la escala de producción o del tipo de producto final, son la, agitación, la temperatura, el pH, la naturaleza del solvente, el tiempo de extracción, proporción de disolvente a sólido y factores relacionados con la materia prima (tamaño de partícula) .<sup>5, 57</sup>

En este estudio, con base en algunos antecedentes y en la prueba preliminar realizada, en el desarrollo de nuestro experimento se consideraron básicamente tres factores o variables independientes influyentes tales como el etanol, relación S:L y tiempo de extracción (denotados por A, B y C), que afectan en el contenido de compuestos fenólicos totales. Manteniéndose constante la velocidad de agitación magnética a 1 h y el tamaño de la partícula de la droga 0,5 mm basado líneas abajo.

Oreopoulou y col.<sup>57</sup>, reportaron que la disminución del tamaño de partícula aumenta la superficie del material vegetal en contacto con el solvente y, por lo tanto, la velocidad de transferencia de masa. Además, la molienda, que se usa comúnmente para obtener partículas más pequeñas, puede causar la ruptura de las células de la planta y, en consecuencia, la liberación de algunos componentes fenólicos ubicados dentro de la célula. La molienda de romero a tamaños de partículas en el rango de 0,2 a 0,8 mm aumentó el rendimiento total de fenol, ácido rosmarínico y ácido carnósico de 2 a 10 veces, según el solvente y el compuesto

extraído. En forma similar, Jovanović y col.<sup>58</sup>, reportaron que el impacto del tamaño de partícula (0,3; 0,7 y 1,5 mm) afectó sobre la cantidad de extracción TPC de *Thymus serpyllum* L.; donde demostraron que los valores más altos de TPC se lograron durante la extracción con partículas de 0,3 mm de diámetro. Y el mayor rendimiento de polifenol se logra principalmente con las partículas más finas, debido a la mayor área de superficie activa y al mayor contacto del material vegetal con el disolvente, lo que, en consecuencia, también conduce a la reducción del tiempo de extracción. Además, se informó anteriormente que los rendimientos máximos de TP se produjeron utilizando el mayor grado de molienda, es decir, el nivel más alto de células destruidas, lo que indicaba que la transferencia de masa por convección tenía el efecto dominante. Sin embargo, el uso de fragmentos muy pequeños puede causar dificultades técnicas durante el proceso de mezcla y filtración.

La optimización de las condiciones de extracción hidroalcohólica de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L., se realizó en 15 tratamientos experimentales aleatorios, bajo el diseño de Box - Behnken (DBB) para estudiar el efecto de las tres variables independientes y sus tres niveles con respecto a la variable dependiente (o variable de respuesta).

La **Tabla 8**, nos muestra las lecturas de las absorbancias a 765 nm y las importantes variaciones en el contenido de fenoles totales de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L., con valores que van desde 94,270 a 141,859 mg GAE/g. Y la **Tabla 11**, nos muestra las lecturas de las absorbancias a 415 nm y las variaciones en el contenido de flavonoides totales, que van desde 8,396 a 3,820 mg ER/g. Se considera que estas variaciones son producto del efecto de las variables de proceso ensayadas sobre el sistema de extracción a través de los diversos fenómenos involucrados en ésta, tales como: estabilidad y/o degradación de compuestos activos, difusión interna y externa, solubilización y selectividad de los compuestos fenólicos, así como sobre los fenómenos de adhesión líquido/sólido, cuyos efectos combinados determinan la concentración final de los compuestos fenólicos presentes en los extractos.<sup>59</sup>, también pueden ser las posibles interferencias de la cuantificación por el método FC.

En la **Figura 19** y **Figura 21**, el diagrama de Pareto estandarizado representa de manera descriptiva la realidad observada de los efectos para señalar cuales efectos son o no significativos, nos representa los efectos divididos entre su error estándar, la cual es una estimación de su desviación estándar y esta a su vez es

una estimación de la variación muestral o experimental. Es así, que nos permite observar de forma gráfica (en valor absoluto) los diferentes factores que presentan efectos significativos sobre el modelo formulado para el contenido de fenoles y flavonoides totales de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. El efecto estandarizado nos sirve como estadístico de prueba para probar la hipótesis:

$H_0$ : efecto poblacional = 0;  $H_a$ : efecto poblacional  $\neq$  0

Así, se rechaza  $H_0$  si el valor absoluto del efecto estandarizado es mayor que el valor crítico de tablas de la distribución  $T$  de Student con  $\nu$  grados de libertad:  $t_{\alpha/2, \nu}$ , donde  $\alpha$  es el nivel de significancia prefijado para la prueba (por lo general  $\alpha = 0,05$ ), y  $\nu$  son los grados de libertad asociados al error. Como el error para el contenido de fenoles totales y flavonoides totales tienen 5 grados de libertad y trabaja con  $\alpha = 0,05$ ; entonces de la tabla para la distribución  $T$  de Student del apéndice se obtiene que el valor crítico es  $t_{0,025, 5} = 2,5706$  respectivamente. Por lo tanto, como el valor absoluto de la estimación del efecto estandarizado es mayor que 2,5706; entonces el efecto poblacional correspondiente de cinco factores para fenoles y dos para flavonoides, es estadísticamente diferente de cero. De modo que se rechaza las cinco hipótesis nulas para fenoles porque la significancia observada es menor que la significancia dada, o sea, valor- $p < \alpha$ ;  $H_0$ : efecto A = 0,  $H_0$ : efecto C = 0,  $H_0$ : efecto AA = 0,  $H_0$ : efecto AC = 0 y  $H_0$ : efecto CC = 0, y se concluye que  $H_a$ : efecto A  $\neq$  0,  $H_a$ : efecto C  $\neq$  0,  $H_a$ : efecto AA  $\neq$  0,  $H_a$ : efecto AC  $\neq$  0 y  $H_a$ : efecto CC  $\neq$  0, respectivamente, con  $\alpha = 0,05$ , son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%. Asimismo, se rechaza las dos hipótesis nulas para flavonoides  $H_0$ : efecto A = 0 y  $H_0$ : efecto BB = 0, y se concluye que la  $H_a$ : efecto A  $\neq$  0 y  $H_a$ : efecto BB  $\neq$  0, correspondientemente, con  $\alpha = 0,05$ ; son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

Una forma sencilla de representar esta prueba es agregar una línea azul en el diagrama de Pareto estandarizado a la altura del valor crítico como se muestra en la **Figura 19** y **Figura 21**. De esta manera, podemos observar claramente, los efectos cuyas barras superan la línea azul son estadísticamente significativos. Así para fenoles totales existen efectos lineales (C y A), y cuadráticos (CC y AA) así como interacciones (AC) que son estadísticamente significativos, excepto (B, BB, BC y AB) que no es estadísticamente significativo (0,2765; 0,6803; 0,8353 y 0,8931  $<$  0,05), es decir, la relación S:L, el efecto cuadrático de esta y su interacción relación S:L - tiempo y etanol - relación S:L no contribuye en gran

medida al proceso de extracción de fenoles totales. Asimismo, para flavonoides totales existen efectos lineales (A), y cuadrático (BB) que son significativos, excepto (C, AA, B, BC, CC, AB y AC) que no son estadísticamente significativos (0,0895; 0,1867; 0,1906; 0,2134; 0,2158; 0,4627 y 0,4818 < 0,05), es decir, que los efectos cuyas barras no superan la línea azul no contribuyen en el proceso de extracción de flavonoides totales. Estos valores también fueron corroborados con el análisis de varianza (ANVA) del contenido de fenoles y flavonoides totales experimentalmente obtenidos (**Anexo 7** y **Anexo 8**), donde se aprecia que los efectos que tienen el valor de la razón-F alto y un valor-p menor que 0,05 indica que el modelo es significativo, donde los efectos lineales, cuadrático e interacción para fenoles (C, A, CC, AA, BC y AB) es más importante; y para flavonoides los efectos son lineales y cuadrático (A y BB) y su valor de la razón-F es alto y un valor-p menor que 0,05 que indica que el modelo es significativo, que coincide con lo visto en el diagrama de Pareto estandarizado. También, al final de este análisis se obtiene el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para el modelo predicho fue para fenoles y flavonoides totales 0,929451 y 0,952458 respectivamente, mientras que el valor del coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{aj}$ ) fue 0,802462 y 0,866882, lo que indica un alto grado de correlación entre los valores experimentales y los pronosticados del contenido de fenoles y flavonoides totales, es explicado por los efectos considerados en la **Tabla 9** y **Tabla 12**.

En el **Anexo 7**, se cumple que  $0 < R^2_{aj} = 0,802462$  (80,2462%)  $\leq R^2 = 0,929451$

(92,9451%) < 1 (100%); asimismo, para flavonoides **Anexo 8**, se cumple que  $0 < R^2_{aj} = 0,866882$  (86,6882%)  $\leq R^2 = 0,952458$  (95,2458%) < 1 (100%); en general este es un modelo satisfactorio porque ambos coeficientes de la variable de respuesta tienen valores superiores a 0,7 (70%); por lo tanto, se procede a explorar la superficie de respuesta descrita por el modelo cuadrático para encontrar la combinación de niveles en los factores que dan por resultado un valor óptimo de la respuesta, porque su calidad de predicción es buena.<sup>43</sup>

El elevado valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) del modelo seleccionado para predecir el contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico, permite interpretar los resultados mediante gráficos de superficie de respuesta **Figura 20** y **Figura 22**.

El modelo ajustado del contenido de fenoles totales presenta la siguiente ecuación con Y: Contenido de fenoles totales,  $X_1$ : Etanol,  $X_2$ : Relación S:L y  $X_3$ : Tiempo,

como se observa en la **Tabla 9**. Visto que, únicamente se han considerado los factores significativos que influyeron en el contenido de fenoles totales, los mismo que se representan en el diagrama de Pareto.

$$\begin{aligned} \hat{Y} = & -379,485 + 13,848X_1 - 0,0475379X_2 - 3,06087X_3 - 0,0947471X_1^2 \\ & + 0,00039025X_1X_2 + 0,0578833X_1X_3 + 0,000125579X_2^2 \\ & - 0,000335833X_2X_3 - 0,0330369X_3^2 \end{aligned}$$

Los signos de los coeficientes indican si el nivel del factor correspondiente se debe incrementar o disminuir para llevar a un mejor valor a Y.<sup>43</sup>

El factor  $X_2$ ,  $X_1X_2$ ,  $X_2^2$ ,  $X_2X_3$  fue rechazado debido a que su valor- $p$  es mayor a 0,05. Por lo tanto, no muestra un efecto significativo sobre el contenido de fenoles. Asimismo, el modelo ajustado para el contenido de flavonoides totales presenta la siguiente ecuación con Y: Contenido de flavonoides totales,  $X_1$ : Etanol,  $X_2$ : Relación S:L y  $X_3$ : Tiempo, como se observa en la **Tabla 12**. Visto que, únicamente se han considerado los factores significativos que influyeron en el contenido de flavonoides totales, los mismo que se representan en el diagrama de Pareto.

$$\begin{aligned} \hat{Y} = & -42,4313 + 0,878396X_1 + 0,0655704X_2 + 0,0484907X_3 - 0,004375X_1^2 \\ & - 0,0002185X_1X_2 + 0,00115972X_1X_3 - 0,00009655X_2^2 \\ & - 0,000217639X_2X_3 - 0,00125077X_3^2 \end{aligned}$$

Los signos de los coeficientes indican si el nivel del factor correspondiente se debe incrementar o disminuir para llevar a un mejor valor a Y.<sup>43</sup>

Los datos del factor revelan que los términos lineales ( $X_2$ ,  $X_3$ ), cuadrático ( $X_2^2$ ,  $X_3^2$ ) y la interacción ( $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$ ,  $X_2X_3$ ), no muestra ningún efecto apreciable en la respuesta. Fue rechazado debido a que su valor- $p$  es mayor a 0,05. Por lo tanto, no muestra un efecto significativo sobre el contenido de flavonoides totales.

En la **Figura 20**, se muestran las gráficas de superficies de respuesta tridimensional (3-D) de los factores que influye sobre la variable de respuesta (contenido de fenoles totales) que se generó utilizando el software Statgraphics centurion XVI. Estas gráficas, proporcionan una visión clara de la relación potencial establecido, variando dos factores o variables predictoras (en el Ejes X e Y) frente a la variable de respuesta (en el eje Z) manteniendo la tercera variable fija con el nivel medio constante (en el valor central). Dado que presentan ligera curvatura, corresponden a diseños de segundo orden donde fue factible estudiar, además de los efectos lineales y de interacción, los efectos cuadráticos o de curvatura pura.<sup>43</sup> En la **Figura 20a**, se observa la variación del contenido de fenoles en función del etanol, la relación S:L y manteniendo constante la media del factor tiempo. Se ve,



que a medida que se incrementa la relación S:L desde (10:100 a 10:300 g/mL), hay un incremento en el contenido de fenoles; a su vez, a medida que se aumentó el grado alcohólico (70 a 90°GL), incremento el contenido de fenoles con un ligero descenso. Sin embargo, el contenido de fenoles de cannabis se vio afectado positivamente cuando la relación S:L 10:300 g/mL y etanol a 80 °GL, se incrementaron.

El incremento de la relación S:L en el contenido de fenoles podría explicarse por la alta solubilidad de los polifenoles en solución hidroalcohólica, particularmente en su forma de glucósido, que proporcionó una mayor tasa de difusión a una relación de sólido a disolvente de 10:300 g/mL. Por el contrario, menor a esta contribuyo a la saturación y consiguiente atenuación de la extracción de fenoles totales. La razón de la influencia de la relación S:L podría ser por una mayor proporción de disolvente a sólido que acelera los fenómenos de transferencia de masa debido a una mayor diferencia en la concentración entre la matriz sólida y la fase en masa del disolvente.<sup>57, 58</sup>

Wong y col.<sup>60</sup>, reportaron que un aumento en la relación líquido: sólido dio como resultado una fuerte lineal positiva y efectos cuadráticos en el rendimiento del TPC. Además, la interacción entre ambos factores (es decir, la concentración de etanol y relación líquido: sólido) fue significativa, lo que indica que el efecto de la concentración de etanol no es la misma en todos los líquidos: relaciones sólidas. Asimismo, Jovanović y col.<sup>58</sup>, refiere que varios estudios han reportado que el TPC aumentó rápidamente con el aumento de la relación, y a temperatura ambiente.

Asimismo, en la **Figura 20b**, también se observa que, la variación del contenido de fenoles en función del etanol y tiempo, manteniendo constante la media de la relación S:L. Se avizora, que a medida que se incrementa el grado alcohólico de (70 a 90°GL) y el tiempo de (12 a 48 h). En contraste ambos factores en la extracción exhiben una fuerte influencia negativa, lo que indica que la extracción de fenoles totales decrece apreciablemente al aumentar el etanol o tiempo o ambos; sin embargo, se nota que el contenido de fenoles totales se incrementa rápidamente a las 22 h de extracción y a 80°GL.

Nuestros resultados concuerdan con los estudios de Ali y col.<sup>9</sup>, donde reportaron que los efectos de la concentración de etanol optimo fue 78,74% para un mejor rendimiento de compuestos fenólicos. Por su parte Dueñas.<sup>12</sup>, hace referencia que un sistema de disolvente binario es superior al de un sistema mono-disolvente si se emplea agua o etanol puro en la extracción de compuestos fenólicos. Sin

embargo, en el estudio de Agarwal y col.<sup>8</sup>, reportaron que el metanol al 80% afectó significativamente en la extracción de compuestos bioactivos de *Cannabis sativa* L., expresando mayor contenido de compuestos fenólicos totales en inflorescencias de *Cannabis sativa* L.; y el de Dahmoune y col.<sup>11</sup>, el solvente óptimo fue 46% de etanol en muestras de hojas *Pistacia lentiscus* L.; observando que las polaridades de los compuestos fenólicos extraídos variaban significativamente, siendo difícil el desarrollo de un método único para la extracción óptima de todos los compuestos fenólicos. Por lo tanto, la selección de parámetros y la optimización del procedimiento de extracción son esencialmente para un ensayo preciso de compuestos fenólicos de diferentes matrices de alimentos.

La selección del solvente es un tema clave, en la extracción selectiva de los compuestos diana ya que determinará, al final, la solubilidad de los analitos objetivo.<sup>61</sup> La eficiencia de un solvente depende principalmente de su capacidad para disolver grupos fenólicos específicos. Además, el disolvente puede influir en la permeabilidad de las células vegetales mediante una alteración química o biofísica. El metanol y el etanol son los disolventes más utilizados para la extracción cuantitativa de polifenoles de plantas aromáticas. Tal es el caso del etanol que aumenta la permeabilidad celular al afectar la bicapa de fosfolípidos de la membrana. Es así, que se han utilizado con éxito mezclas de metanol o etanol con agua, debido a que presentan una polaridad significativamente menor en comparación con el agua y esto favorece la solubilidad y difusión de los compuestos fenólicos mediante la reducción de la constante dieléctrica del disolvente. Sin embargo, estudios previos coinciden en que el uso de solventes orgánicos altamente puros puede conducir a la deshidratación y el colapso de las células vegetales, así como la desnaturalización de las proteínas de la pared celular, lo que hace que la extracción de compuestos fenólicos sea difícil. Por esta razón, mezclas hidroalcohólicas, especialmente etanol, son los sistemas de disolventes más adecuados para la extracción debido a las diferentes polaridades de los compuestos fenólicos y la aceptabilidad de este sistema para el consumo humano e industrias farmacéuticas y alimentarias.<sup>57, 61</sup> En este contexto, informaron que el mejor rendimiento de extracción de compuestos fenólicos se logró utilizando una mezcla de etanol y agua al 50% - 50%. Mientras que 70% y el 72% -85%, v / v, etanol en agua fue necesario para la recuperación cuantitativa de polifenoles totales de pasas negras y cáscaras de cítricos, respectivamente.

Estas diferencias pueden atribuirse no solo a la matriz sino también a los grupos fenólicos específicos presentes en la planta.<sup>57</sup> Estos autores apuntan a un efecto sinérgico entre los solventes ya que el agua actúa como un agente de hinchamiento de la matriz de la planta, aumentando la superficie de contacto, mientras que el etanol induce la ruptura del enlace entre los solutos y la matriz. Como el etanol presenta rendimientos similares a los del metanol en la mayoría de los casos, puede usarse en lugar de los últimos para usos alimenticios o cosméticos de los polifenoles recuperados de la corriente del extracto, ya que es menos tóxico, estado GRAS (generalmente reconocido como seguro) y de bajo costo. Buscar autor para la parte subrayada y del párrafo anterior esta en cuaderno.<sup>62</sup> Por esta razón, se optó por utilizar mezclas hidroalcohólicas, dado al fácil acceso, manipulación y a lo mencionado líneas arriba

En cuanto al tiempo de extracción, Se ha informado que el tiempo de extracción de 1 a 10 h es eficiente para la recuperación cuantitativa de compuestos fenólicos a través de extracción convencional de plantas aromáticas. Como el proceso está controlado por fenómenos de transferencia de masa, la partícula el tamaño de la materia prima es un factor importante, y un tamaño de partícula más pequeño mejora la recuperación cuantitativa en una extracción más corta tiempo.<sup>57</sup>

De igual manera se observa en la **Figura 20c**, que, a medida se aumentó la relación S:L (10:100 a 10:300 g/mL), se incrementó en el contenido de fenoles totales, y a medida que se incrementó el tiempo (12 a 48 h), se exhibe un efecto débil en el contenido de fenoles totales. Estas observaciones evidencian la influencia a una relación S:L de 10:300 g/mL y a un tiempo de 22 h en la extracción de los fenoles totales, aproximadamente.

En la **Figura 22a**, se ve la variación del contenido de FT en función del etanol y la relación S:L, manteniendo constantes la media del factor tiempo. A medida que se incrementa el grado alcohólico desde (70 a 90°GL) y la relación S:L de (10:100 a 10:300 g/mL), la cantidad del contenido de FT también se incrementa ascendentemente, lográndose un máximo contenido de FT a 90°GL y relación S:L 10:300 mL, aproximadamente.

Li y col.<sup>63</sup>, encontraron que la concentración de etanol al 85% fue óptimo para la extracción de flavonoides. En forma similar, Ali y col.<sup>9</sup>, reportaron que la concentración del solvente óptimo fue 78,74% usando el MSR, esto puede corroborar los resultados obtenidos en este estudio.

Asimismo, en la **Figura 22b**, se observa que, independientemente del grado alcohólico, a medida que incrementa la relación S:L (10:100 a 10:300 g/mL) y el tiempo de (12 a 48 h), la cantidad de FT alcanza un máximo a una relación S:L de 10:180 g/mL y tiempo 44 h, aproximadamente y luego desciende.

Como se ve, un aumento del tiempo de extracción no promueve un incremento significativo del rendimiento de extracción en términos de FT. El tiempo de extracción es uno de los factores importantes que afectan el rendimiento de extracción de flavonoides. Este fenómeno podría ocurrir debido a que, dentro de un cierto periodo de tiempo, la solución intracelular y extracelular alcanzan un equilibrio. Sin embargo, con un tiempo de extracción prolongado también puede haber reacciones negativas que acusen el declive del rendimiento.<sup>5</sup>

Comportamiento similar sucede en la **Figura 22c**, donde independientemente de la relación S:L, el incremento del grado alcohólico de (70 a 90°GL) y el tiempo de extracción de (12 a 48 h), la cantidad de FT alcanza a un ligero incremento a un grado alcohólico de 90°GL y 44 h.

Para la optimización de FT casi ninguno de los factores estudiados fue significativo. Las razones, es por es porque los niveles asignados a los factores fueron muy estrechos, de forma que la diferencia entre lo que pasa en un nivel y otro es prácticamente imperceptible por la variable de respuesta. En este caso habrá que reescalar y volver a correr el experimento. Y otra de las causas es porque los factores estudiados no son los principales responsables de la variación de la variable de respuesta; por lo tanto, hay otras situaciones o factores no considerados que son los que en realidad tienen influencia sobre la respuesta. En este caso, eso puede ser un aprendizaje importante, ya que ayudara a enfocar la solución desde otra perspectiva para no cometer los mismos errores en un siguiente estudio experimental.<sup>43</sup>

La **Tabla 10** y **Tabla 13**, nos muestra, los factores óptimos. Para el rango investigado de factores, la condición óptima para las extracciones de fenoles totales y para flavonoides totales fue (80,7°GL de etanol; 10:300 g/mL relación S:L y 22,8 horas) y (90,0°GL; 10:187,2 g/mL y 44,8 h) respectivamente. En esta condición, el valor predicho de la respuesta fue (144,742 mg GAE/g y 8,910 mg ER/g), esto se confirmó experimentalmente para validar el modelo predicho en la respuesta y el valor obtenido fue 141,108 mg GAE/g y 8,619 mg ER/g. Un parecido cercano entre el valor predicho y el valor experimental, valido el modelo para la respuesta investigada en las condiciones óptimas de los factores de diseño.

Nuestros resultados difieren con los estudios de Agarwal y col.<sup>8</sup> debido a que sus condiciones óptimas de los valores predichos encontradas, arrojó 314,822 mg GAE/g DW de CPT y 28,173 mg EQ/g de FT. Estos fueron confirmados experimentalmente para validar el modelo predicho en las respuestas y los valores obtenidos fueron: TPC: 312,452 mg GAE/g DW, TF: 32,254 mg QE/g DW, en las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. Este valor, obviamente, resultó ser superior al obtenido en este presente trabajo. Donde las condiciones de los valores predichos óptimos encontrados, arrojó 144,742 mg GAE/g de contenido fenólico total y 8,910 mg ER/g de contenido de flavonoides totales, cantidad muy cercano al valor experimental: 141,108 mg GAE/g y 8,619 mg ER/g en las inflorescencias de *Cannabis sativa* L.

## VI. CONCLUSIONES

1. Los efectos lineales del factor tiempo (C), grado alcohólico (A) y de interacción (AC) y los efectos cuadráticos (CC, AA) afectaron en el proceso de extracción de fenoles totales de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L., de manera estadísticamente significativa (0,0069; 0,0496; 0,0130; 0,0136; 0,0215 < 0,05) excepto (B, BB, BC y AB). Asimismo, el efecto lineal para el factor grado alcohólico (A) y el efecto cuadrático (BB) afecto en el proceso de extracción de flavonoides totales de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L., de manera estadísticamente significativa (0,0003; 0,0198 < 0,05) excepto (C, AA, B, BC, CC, AB y AC).
2. Se logró las condiciones de grado alcohólico, relación sólido:líquido y tiempo de extracción mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta a través del diseño Box-Behnken. Las condiciones optimizadas fueron 80,7°GL; 10:300 g/mL y 22,8 h, respectivamente, para un contenido de 144,742 mg EAG/g de fenoles totales de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. Asimismo, las condiciones optimizadas para flavonoides totales fueron 90,0°GL; 187,2 g/mL y 44,8 h, para un contenido de 8,910 mg ER/g de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L.
3. El análisis de varianza, el diagrama de Pareto, la regresión lineal múltiple y el valor de  $R^2_{aj}$  indicaron que los datos experimentales del contenido de fenoles y flavonoides totales, se ajustaron de forma significativa al modelo cuadrático hallado, adecuado para la simulación del proceso de extracción de fenoles y flavonoides totales, respectivamente, a partir de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L., donde no se observaron diferencias significativas entre el valor experimental y el valor predicho.



## VII. RECOMENDACIONES

1. Aplicar la optimización simultánea de varias respuestas de interés mediante el método de la función de deseabilidad.
2. Continuar con los estudios de optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos de *Cannabis sativa* L., empleando diferentes técnicas extractivas donde se evalúen la actividad antioxidante con los métodos DPPH, ABTS y FRAP.
3. La extracción de polifenoles de *Cannabis sativa* L. debe ser modelada y optimizada por una red neuronal, entrenada con un algoritmo de retro-propagación de error para evaluar los efectos del grado alcohólico, relación soluto - solvente y tiempo en el contenido fenólico total de los extractos de *Cannabis sativa* L. y para optimizar las condiciones necesarias para obtener el mayor rendimiento de polifenoles del cannabis.





## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pinela J., Prieto MA., Barros L., Carvalho AM., Oliveira MB., Saraiva JA., Ferreira I. Cold extraction of phenolic compounds from watercress by high hydrostatic pressure: Process modelling and optimization. Separation and Purification Technology. [Internet]. 2018 [citado 05 de mayo de 2018];192, 501–512. Disponible en: doi:10.1016/j.seppur.2017.10.007
2. Galanakis CM. Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. Woodhead Publishing; 2018.
3. Carmona JC., Ceballos LM., González CH. Polyphenols and Flavonoids in Colombian Fruit and Vegetables - Applications and Benefits: A Review. Journal of Food and Nutrition Research [Internet]. 2018 [citado 05 de mayo de 2018]; Vol.6,Nº.3,176-181. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Juan\\_Carmona-Hernandez/publication/323756194\\_Polyphenols\\_and\\_Flavonoids\\_in\\_Colombian\\_Fruit\\_and\\_Vegetables\\_Applications\\_and\\_Benefits\\_A\\_Review/links/5aae59500f7e9b4897bf4b11/Polyphenols-and-Flavonoids-in-Colombian-Fruit-and-Vegetables-Applications-and-Benefits-A-Review.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Juan_Carmona-Hernandez/publication/323756194_Polyphenols_and_Flavonoids_in_Colombian_Fruit_and_Vegetables_Applications_and_Benefits_A_Review/links/5aae59500f7e9b4897bf4b11/Polyphenols-and-Flavonoids-in-Colombian-Fruit-and-Vegetables-Applications-and-Benefits-A-Review.pdf)
4. Hazekampa A., Fishedick JT. Cannabis - from cultivar to chemovar. Drug Testing and Analysis [Internet]. 29 noviembre 2011 [citado 05 de mayo de 2018]. Disponible en: [https://bedrocan.com/wp-content/uploads/2012-cannabis-from-cultivar-to-chemovar\\_hazekamp.pdf](https://bedrocan.com/wp-content/uploads/2012-cannabis-from-cultivar-to-chemovar_hazekamp.pdf)
5. Velazco CA. Optimización del proceso de extracción de flavonoides de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. "chupasangre", Ayacucho 2015 [Tesis para optar el título profesional]. UNSCH. Ayacucho 2017.
6. Martinez S. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp [Internet]. 2002 [citado 11 de mayo de 2018];XVII(6)271-278. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
7. Azmir J., Zaidul ISM., Rahman MM., Sharif KM., Mohamed A., Sahena f., Jaurul MHA., Ghafoor K., Norulaini NAN., Omar AKM. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. Rev. Journal of Food Engineering [Internet]. 2013 [citado 11 de mayo de 2018];117(4), 910-925. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
8. Agarwal C., Máthé K., Hofmann T., Levente Csóka L. Extracción asistida por ultrasonido de cannabinoides de *Cannabis Sativa* L. Optimizada por la metodología de superficie de respuesta. Journal of Food Science [Internet]. Febrero 2018 [citado 15 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/1750-3841.14075>
9. Ali A., Lim XY., Chong CH., Mah SH., Chua BL. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from *Piper betle* using response surface methodology. LWT - Food Science and Technology [Internet]. 2018 [citado 23 de mayo de 2018];89,681–688. Disponible en: doi:10.1016/j.lwt.2017.11.033

10. Xi J., Yan L. Optimization of pressure-enhanced solid-liquid extraction of flavonoids from *Flos Sophorae* and evaluation of their antioxidant activity. *Separation and Purification Technology* [Internet]. 2017 [citado 23 de mayo de 2018];175,170–176. Disponible en: doi:10.1016/j.seppur.2016.10.013
11. Dahmounea F, Spigno G, Moussi K, Remini H, Cherbal A, Madani K. *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products* [Internet]. 2014 [citado 05 de marzo de 2018];61,31-40. Disponible en: <https://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014003926>
12. Dueñas JA. Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de uva variedad quebranta (Ica, Perú) empleando técnicas convencionales y extracción asistida por ultrasonido. [Tesis de maestría] San Miguel-Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú. Escuela de Posgrado; 2017.
13. Fassio A., Rodríguez M., Ceretta S. Cáñamo (*Cannabis sativa* L.). INIA. Uruguay; 2013.
14. Téllez J., Campos AC., Cepeda JF., Cote M., Cruz U., Jojoa LA., et al. Marihuana – Cannabis. Aspectos toxicológicos, clínicos, sociales y potenciales usos terapéuticos [Internet]. 2015 [citado 01 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/283748671>
15. Ángeles GE., Brindis F., Niizawa C., Ventura R. *Cannabis sativa* L., una planta singular. *Rev Mex Cienc Farm* [Internet]. 30 de junio de 2014 [citado 05 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57940028004.pdf>
16. Chandra S., Lata H., Elsohly M. *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology. Oxford. Springer International Publishing AG; 2017.
17. Wahby I. Aproximaciones biotecnológicas tendentes a la mejora del cáñamo (*Cannabis sativa* L.): obtención y cultivo de raíces transformadas, transformación genética y regeneración *in vitro*. [Tesis Doctoral]. Granada. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada; 2007.
18. Tettey J. Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis. UNDOC. Vol. 09. Nueva York; 2010.
19. Aguilar S., Gutiérrez V., Sánchez L., Nougier M. Políticas y prácticas sobre cannabis medicinal en el mundo. International Drug Policy Consortium [Internet]. Abril 2018 [citado 07 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.mucd.org.mx/wp-content/uploads/2018/05/Pol%C3%ADticas-y-pr%C3%A1cticas-sobre-cannabis-medicinal-en-el-mundo-2018.pdf>
20. Hazekamp A., Fishedick JT., Llano M., Lubbe A., Ruhaak RL. Chemistry of Cannabis. *Rev Elsevier* [Internet]. 2010 [citado 08 de junio de 2018]. Disponible en: <http://booksite.elsevier.com/brochures/conap2/PDFs/Vol3Chemistry-of-Cannabis.pdf>

21. Piazza M., Cortez C., Hajar G., Chang A., Condori L., Garrido P., et al. Instituto Nacional de Salud. Actualización de la Revisión y Síntesis de la Evidencia sobre Regulación del Uso Médico de cannabis. Unidad de Análisis y Generación de Evidencias (UNAGESP) [Internet]. 2017 [citado 08 de junio de 2018]. Serie Informe de Revisiones N° 01-2017. Disponible en: [http://web.ins.gob.pe/sites/default/files/Archivos/authenticated%2C%20administrator%2C%20editor/publicaciones/2018-07-11/01\\_SERIE\\_INFORME\\_DE\\_REVISIONES\\_N\\_01-2017\\_Actualizacion\\_de\\_la\\_Revision\\_y\\_Sintesis\\_de\\_la\\_Evidencia\\_sobre\\_Regulacio%CC%81n\\_del\\_Uso\\_Me%CC%81dico\\_del\\_Cannabis.pdf](http://web.ins.gob.pe/sites/default/files/Archivos/authenticated%2C%20administrator%2C%20editor/publicaciones/2018-07-11/01_SERIE_INFORME_DE_REVISIONES_N_01-2017_Actualizacion_de_la_Revision_y_Sintesis_de_la_Evidencia_sobre_Regulacio%CC%81n_del_Uso_Me%CC%81dico_del_Cannabis.pdf)
22. McPartland JM., Russo EB. Cannabis and Cannabis Extracts: Greater Than the Sum of Their Parts?. Co-published simultaneously in Journal of Cannabis Therapeutics. 2001;Vol.1,No.3/4,pp.119. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/228897917\\_Cannabis\\_and\\_cannabis\\_extracts\\_Greater\\_than\\_the\\_sum\\_of\\_their\\_parts](https://www.researchgate.net/publication/228897917_Cannabis_and_cannabis_extracts_Greater_than_the_sum_of_their_parts)
23. U.S. Food & Drug Administration, FDA. La FDA aprueba el primer medicamento compuesto por un ingrediente activo derivado de la marihuana para tratar algunos tipos de epilepsia poco comunes y severos. [Internet]. 25 de junio de 2018 [citado 11 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/ComunicadosdePrensa/ucm611724.htm>
24. Hazekamp D. Cannabis review (Leiden, The Netherlands), 2008 – 2009
25. Szymanski D. Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in Arabidopsis. Trends Plant Science. 2000.
26. Auriol D., Nalin R., Robe P., Lefevre F. Compuestos fenólicos con aplicaciones cosméticas y terapéuticas. Oficina española de patentes y marcas [Internet]. 2012 [citado 12 de junio de 2018]. Disponible en: <https://patentimages.storage.googleapis.com/9d/2f/1d/9b87b72374cf9f/ES2384275T3.pdf>
27. Roleira FMD., Varela CL., Costa SC., Tavares-da-Silva EJ. Phenolic Derivatives From Medicinal Herbs and Plant Extracts: Anticancer Effects and Synthetic Approaches to Modulate Biological Activity. Studies in Natural Products Chemistry [Internet]. 2018 [citado 12 de junio de 2018]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00004-1>
28. Neira A. Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de la orquídea comestible *prosthechea michuacana*. [Tesis pre-grado] México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politecnico Nacional; 2009.
29. Gimeno E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. QFFARM. Ámbito Farmacéutico nutrición [Internet] 2004. [citado 12 de junio de 2018];vol.23.Núm.6. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>
30. Horst MA., Lajolo FM. Biodisponibilidad de compuestos bioactivos de alimentos. 2 ed. Sao Paulo: Manole. En: Silvia Maria Franciscato Cozzolino. (Org.). Biodisponibilidad de Nutrientes; 2007.

31. Novza YA., Popova EM. Flavonoids: chemistry and biological activities. *Probl Environ Biotechnol* [Internet]. 7 de julio de 2016 [citado 17 de junio de 2018]. Disponible en: <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/10584/16387>
32. Raffa D., Maggio B., Raimondi MR., Plescia F., Daidone G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 21 de julio 2017 [citado 17 de junio de 2018];142,213-228. Disponible en: doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.034
33. Elsohly MA. *Marijuana and the Cannabinoids*. Forensic science and medicine. 2007.
34. Elorriaga J. Proyecto cultivo. Fundación CANNA [Revista de internet] España; 2013. Disponible en: <https://www.fundacion-canna.es/flavonoides>
35. Werz O., Seegers J., Schaible AM., Weinigel C., Barz D., Koeberle A. et al. Cannflavins from hemp sprouts, a novel cannabinoid-free hemp food product, target microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 and 5-lipoxygenase. *PharmaNutrition*; 2014;2(3),53-60. Disponible en: doi:10.1016/j.phanu.2014.05.001
36. Khoddami A., Wilkes MA., Roberts TH. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 19 de febrero de 2013;18(2), 2328-2375. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/2/2328/htm>
37. XU C.-C., WANG B., PU Y.-Q., TAO J.-S., ZHANG T. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*;2017,15(10),721–731. Disponible en: doi:10.1016/s1875-5364(17)30103-6
38. Panja P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science* [Internet]. 2017 [citado 23 de junio de 2018]. Disponible en: doi:10.1016/j.cofs.2017.11.012
39. Martínez J. Efecto del procesamiento en el contenido de compuestos fenólicos y las propiedades antioxidantes de diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Mexicano [Tesis pre-grado] Toluca-México: Facultad de Química. Universidad Autónoma del Estado de Mexico; 2013.
40. Toledo M. *Espectrofotometría UV/VIS fundamentos y aplicaciones*. Disponible en: [www.mt.com/UV-VIS](http://www.mt.com/UV-VIS)
41. Girbez., Jiménez. *Cuaderno de prácticas de radicales libres y antioxidantes dietarios*; 2010.
42. Moreno J. Extracción de compuestos antioxidantes del gel de Aloe vera. Optimización del proceso mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta. [Tesis pos-grado] Facultat de ciències. Universitat de Les Illers Balears; 2013.
43. Gutiérrez PH., Román S. *Análisis y diseño de experimentos*. 3ra ed. México DF: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana; 2012.
44. Montgomery DC. *Diseño y análisis de experimentos*. 8a ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2013.

45. Ilzarbe L., Tanco M., Viles E., Alvarez MJ. El diseño de experimentos como herramienta para la mejora de procesos. Aplicación de la metodología al caso de una catapulca. *Tecnura* Vol.10, núm.20, 2007, pp.127-138. Bogotá - Colombia: Universidad distrital Francisco José de Caldas.
46. Coleman DE, Montgomery DC. A Systematic Approach to Planning for a Designed Industrial Experiment. *Technometrics*. 1993, Vol. 35 (1).
47. Cevallos L. Optimización de extracción de antioxidantes de zarandaja (*Lablab purpureus* L.). [Tesis pre-grado]. Loja - Ecuador: Area Biología y Biomédica. Universidad Técnica Particular de Loja. La Universidad Católica de Loja; 2016.
48. Myers RH., Montgomery DC., Anderson-Cook CM. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. 4ª ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2016.
49. Rodriguez R. Los productos de *Cannabis sativa*: situación actual y perspectivas en medicina. *Salud mental* [Internet]. 2012 [citado 28 de junio de 2018]; 35:247-256. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/sm/v35n3/v35n3a9.pdf>
50. Ley N° 30681 de 17 de Noviembre, Ley que regula el uso medicinal y terapéutico del cannabis y sus derivados, (Diario Oficial El Peruano, Res. N° 026-2017-SGOPHU/GDU/MDPP de 17/11/17).
51. Martin S. Con histórica firma, presidente de Perú promulga ley de marihuana medicinal. *Panam Post* [Internet]. 16 de noviembre de 2017 [citado 28 de junio de 2018]. Disponible en: <https://es.panampost.com/sabrina-martin/2017/11/16/con-historica-firma-presidente-de-peru-promulga-ley-de-marihuana-medicinal/?cn-reloaded=1>
52. CNN Español. Ahora Perú busca aprobar la marihuana medicinal [Internet]. Febrero 2017 [citado 28 de junio de 2018]. Disponible en: <https://cnnespanol.cnn.com/2017/02/10/ahora-peru-busca-aprobar-la-marihuana-medicinal/>
53. Garcia MI. La despenalización del cannabis sativa y el derecho a la salud. [Tesis para optar el título profesional] Lima - Peru: Carrera de Derecho. Facultad de Derecho. Universidad de Lima; 2017.
54. Subedi L., Timalseña S., Duwadi P., Thapa R., Paudel A., Parajuli K. Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 2014; 34(5), 584–590. Disponible en: doi:10.1016/s0254-6272(15)30067-4
55. Palomino IR. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia [Tesis de maestría] Medellín - Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2009.
56. Hernández R., Fernández C., Baptista P. *Metodología de la investigación*. Edit. Mc Graw Hill. 6ta edición. México. 2014.
57. Oreopoulou A., Tsimogiannis D., Oreopoulou V. Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. *Polyphenols in Plants*;2019,243–259. Disponible en: doi:10.1016/b978-0-12-813768-0.00025-6

58. Jovanović AA., Đorđević VB., Zdunić GM., Pljevljakušić DS., Šavikin KP., Gođevac DM., Bugarski BM. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology*. 2017; 179,369–380. Disponible en: doi:10.1016/j.seppur.2017.01.055
59. Flores H., León C., Estarrón M., Orozco I. Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2016; vol. 15, No. 3, pp. 773-785. Disponible en:  
<http://www.redalyc.org/pdf/620/62048168009.pdf>
60. Wong JE., Muñiz DB., Martínez GCG., Belmares RE., Aguilar CN. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015; 22, 474–481. Disponible en:<https://scihub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417714001862>
61. Valadez L., Ortiz A., Ceballos G., Mendiola JA., Ibáñez E. Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2018; 131, 99–105. Disponible en:  
<https://scihub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844617304382>
62. Rodríguez S., Visentin A., Maestri D., Cocero MJ. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*. 2012;109(1),98–103. Disponible en:  
<https://scihub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877411005231>
63. Li C., Ge Y., Wan D., Hu J., Ying C., Wang L. Optimization of Extraction Condition and Quantification of Total Flavonoids in *Elaeagni Folium*. *Pharmacognosy Journal*. 2011; 3(26), 8–12. Disponible en: <https://scihub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0975357511801264>

## **IX. ANEXO**



## Anexo 2

Certificado de identificación botánica de *Cannabis sativa* L.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
"SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA"

### C E R T I F I C A

Que, la Bachiller. en Farmacia y Bioquímica, **Srta. Flor Analí, MÉNDEZ PÉREZ**,  
ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación  
de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	HAMAMELIDAE
ORDEN	:	URTICALES
FAMILIA	:	CANNABACEAE
GENERO	:	Cannabis
ESPECIE	:	<b><i>Cannabis sativa</i> L.</b>
N.V.	:	"marihuana"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para  
los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 11 de Setiembre del 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
*Elga. Laura Augustine Medina*  
JEFE

## Anexo 2



Constancia de adquisición de inflorescencias de *Cannabis sativa* L.



**EL Sr. COMANDANTE PNP JEFE DEL DEPARTAMENTO  
DE CRIMINALISTICA DE LA REGPOL AYACUCHO.**

**DEJA**

### **CONSTANCIA**

*Que la Srta. Flor Anali MENDEZ PEREZ bachiller en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga, realiza su Trabajo de Investigación Titulado "Optimización de la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de Cannabis sativa L. "Marihuana", Ayacucho 2018. En el Centro de desarrollo, análisis y control de calidad de medicamentos y fitomedicamentos "Laboratorio de control de calidad", del área académica de Farmacia y bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud. Este Departamento de Criminalística de la REGPOL - Ayacucho, Sección de **Química y Toxicología Forense**, a mi cargo provee la materia para el trabajo arriba descrito consistente en inflorescencias del **Cannabis sativa**, por lo que su tenencia es estrictamente para el trabajo de investigación arriba descrito.*

Se expide la presente constancia para las facilidades del caso a las autoridades correspondientes.

Avacucho. 13 de julio del

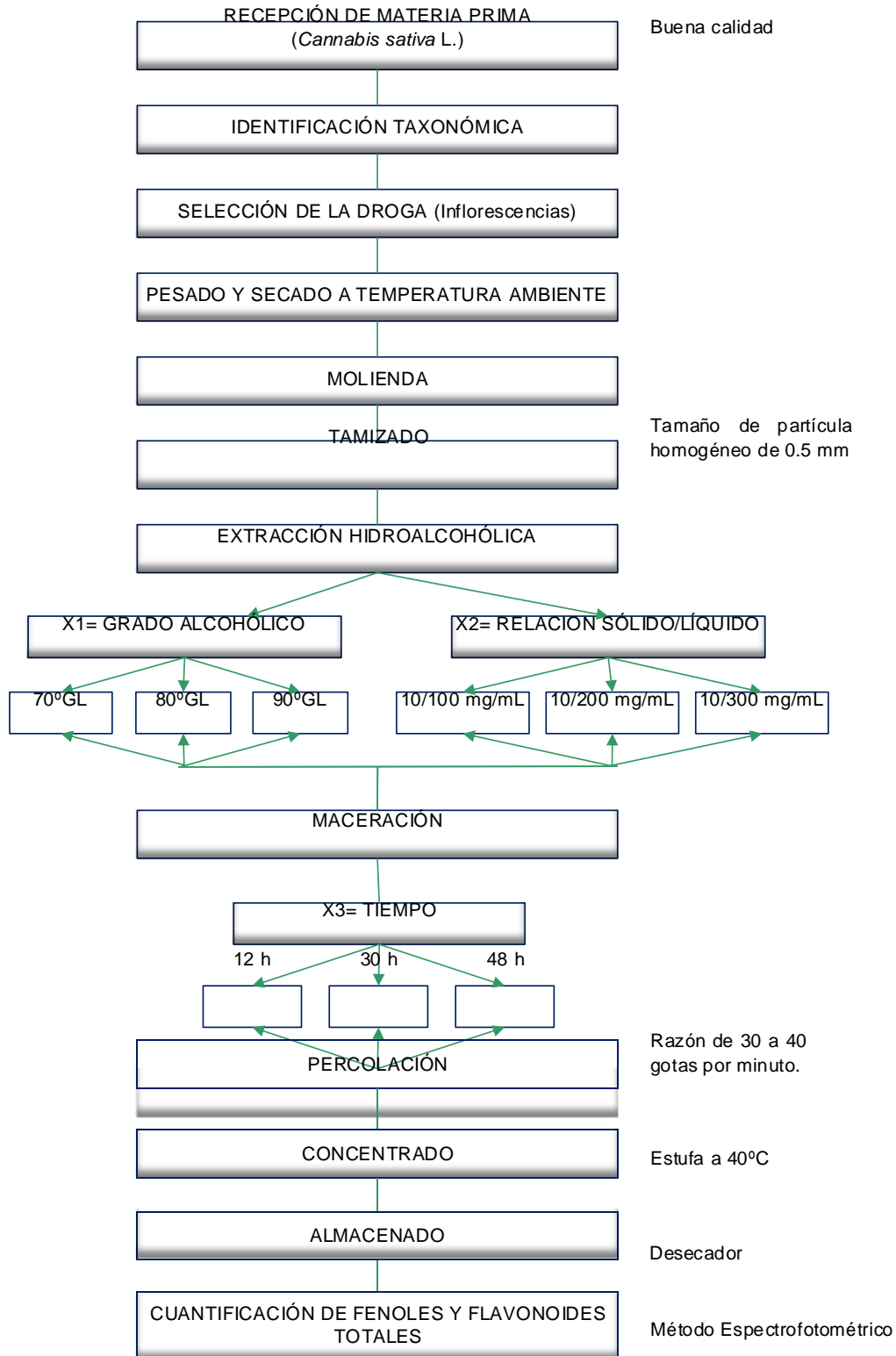


*Fredy R. Aguado Cuadros*  
05-294032 - A4  
**FREDY R. AGUADO CUADROS**  
COMANDANTE S. PNP  
JEFE DE LA OFICINA DE CRIMINALISTICA  
REGPOL-AYACUCHO

2018

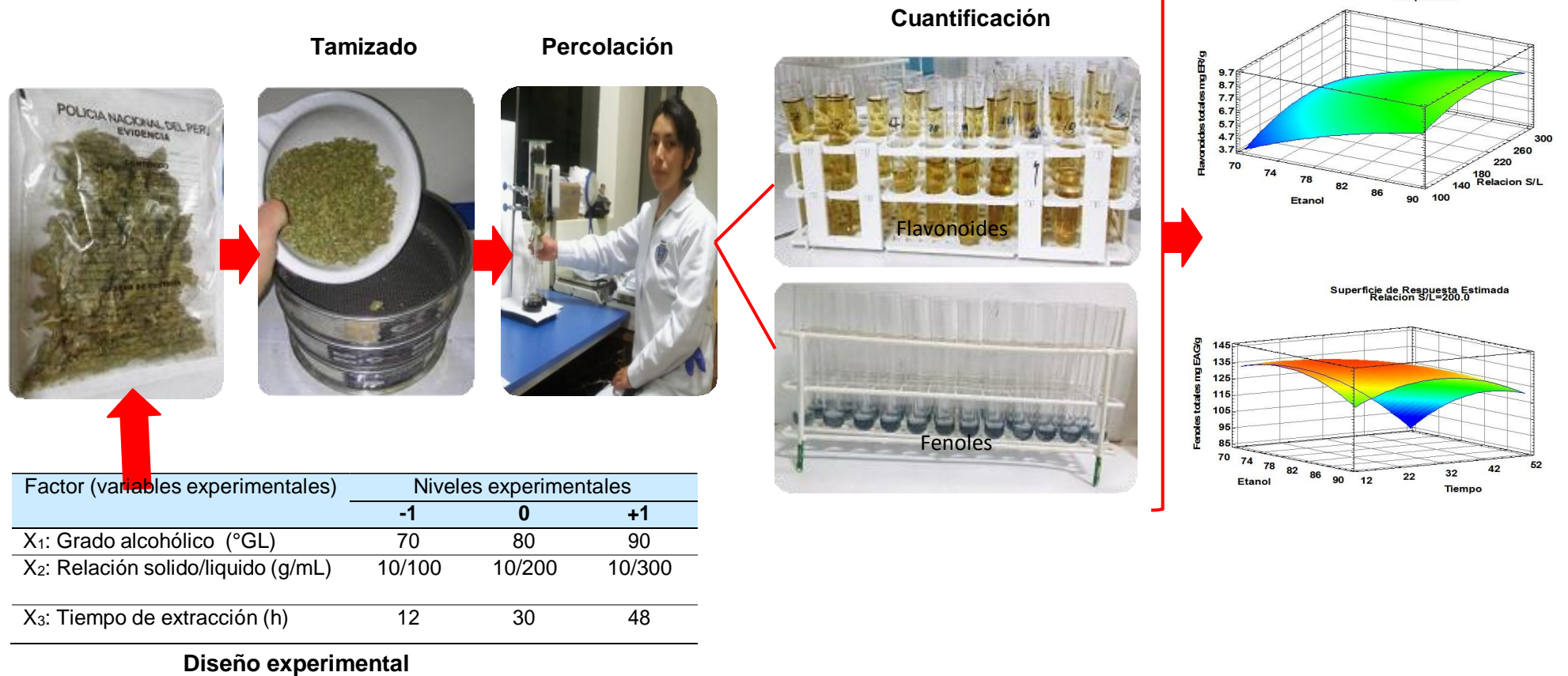
### Anexo 3

## Flujograma de las etapas de la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L.



## Anexo 4

Flujograma de las etapas de la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L.

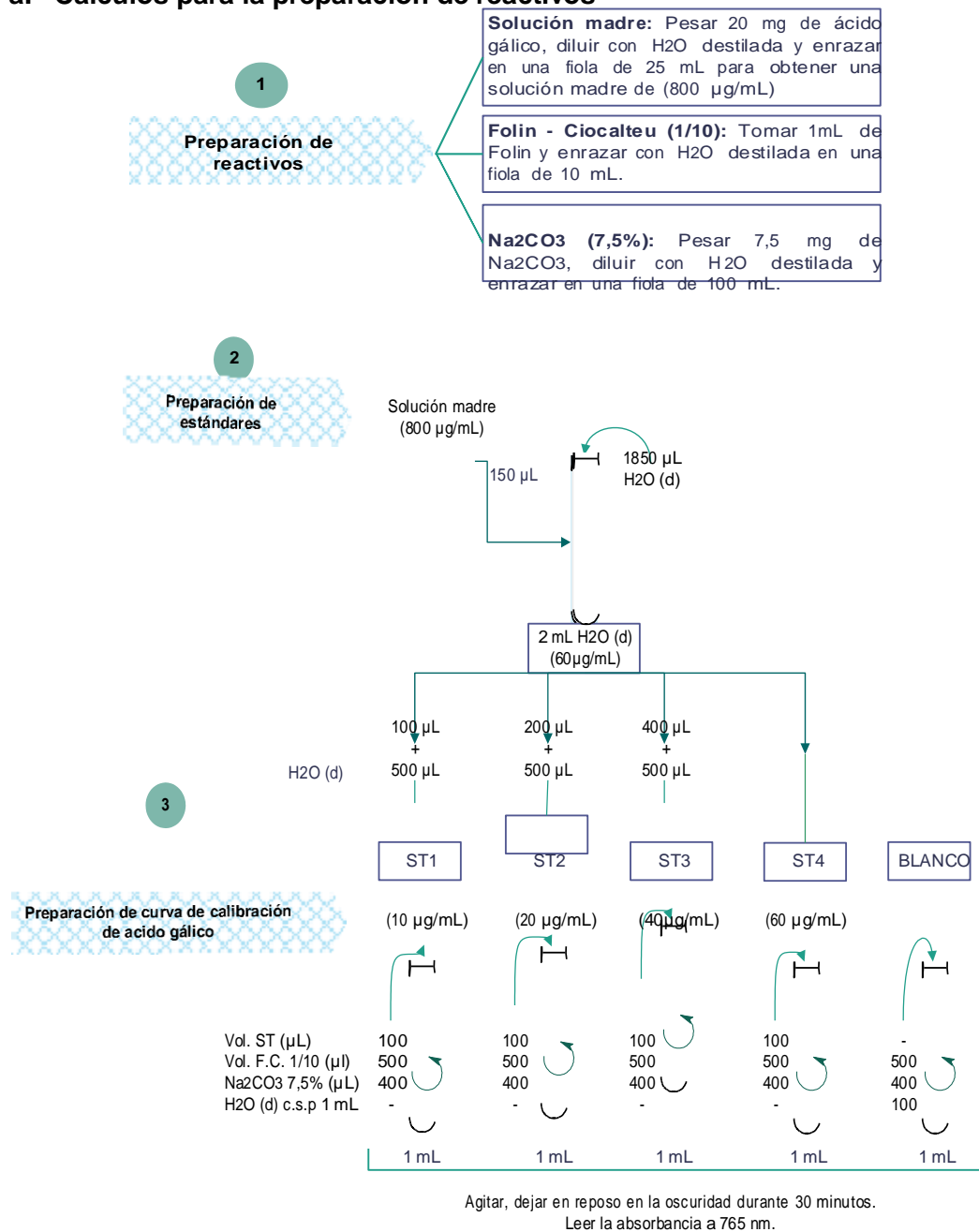




## Anexo 5

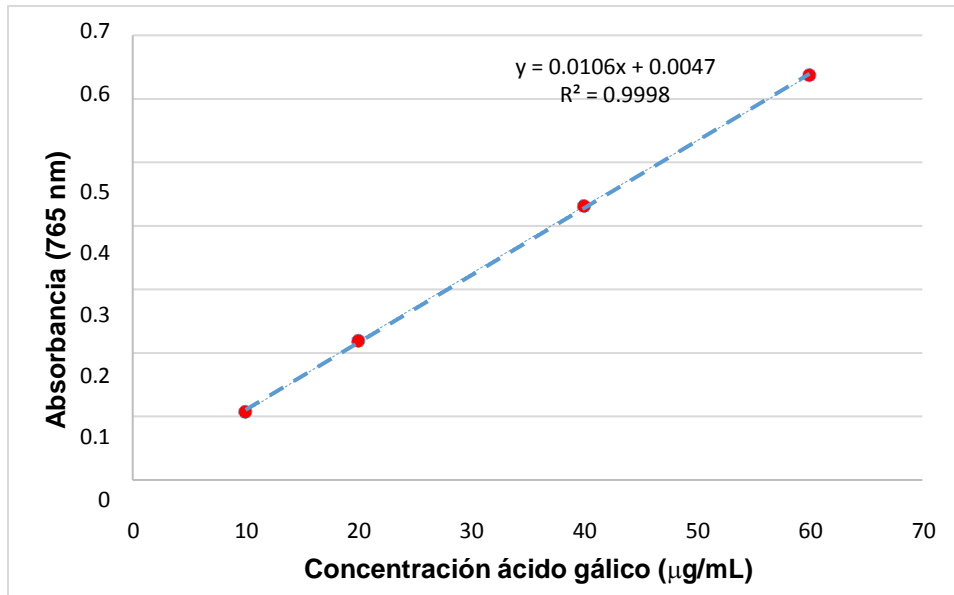
### Fenoles totales (Método Folin - Ciocalteu)

#### a. Cálculos para la preparación de reactivos

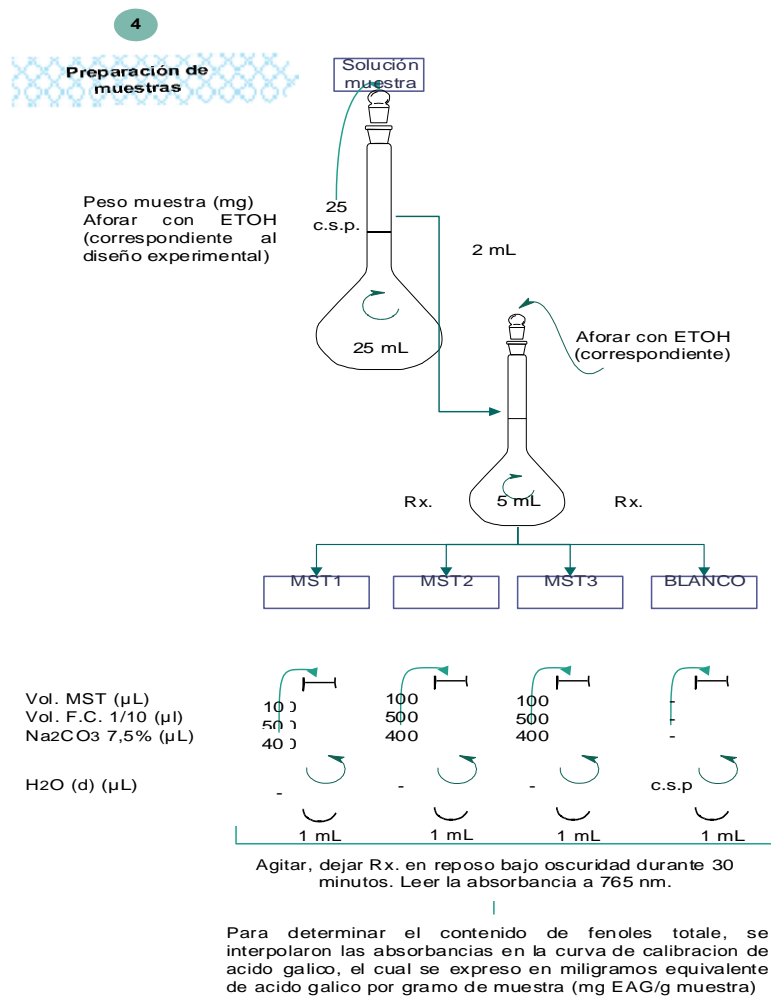


#### b. Curva de calibración

Concentración (µg/mL)	Absorbancia			Promedio absorbancia
	Repet. 1	Repet. 2	Repet. 3	
10	0,103	0,107	0,110	0,107
20	0,220	0,219	0,219	0,219
40	0,432	0,431	0,431	0,431
60	0,642	0,633	0,635	0,637



**Figura 25.** Curva de calibración por el método Folin - Ciocalteu en la determinación de fenoles totales.



**Figura 19.** Procedimiento para fenoles totales (Folin-Ciocalteu).

**Elaboración.** La autora.



**c. Datos de la cuantificación de fenoles totales**

DISEÑO EXPERIMENTAL BOX - BEHNKEN				W <sub>i</sub> - W <sub>f</sub> de droga en la extracción				
Tratamiento	Grado alcohólico (°GL)	Relación sólido/líquido (g/mL)	Tiempo (h)	W <sub>i</sub> (g) droga	W <sub>f</sub> (g) extracto (seco)	W (mg) dilución	Abs. Promedio	Conc. (mg EAG/g)
1	90	10/100	30	10	1,830	25,3	0,553	127,861
2	90	10/200	12	10	2,292	25,6	0,537	122,677
3	80	10/100	48	10	1,633	25,4	0,534	122,946
4	90	10/200	48	10	2,030	25,2	0,548	127,198
5	70	10/200	12	10	2,206	25,2	0,566	131,409
6	80	10/100	12	10	1,815	25,6	0,612	139,874
7	70	10/300	30	10	2,920	25,2	0,574	133,125
8	70	10/200	48	10	2,524	25,5	0,412	94,255
9	80	10/300	12	10	2,612	25,2	0,592	137,493
10	70	10/100	30	10	1,634	25,4	0,524	120,548
11	90	10/300	30	10	1,989	25,3	0,614	141,921
12	80	10/300	48	10	2,247	25,5	0,515	118,071
13	80	10/200	30	10	2,311	25,2	0,599	139,975
14	80	10/200	30	10	2,344	25,5	0,609	139,106
15	80	10/200	30	10	2,156	25,6	0,609	139,106

**d. Ejemplo de cálculos para determinar la concentración de fenoles totales expresado en miligramos equivalente de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g)**

- Primero determinar la concentración que esta expresada en (µg/mL) utilizando la ecuación de la recta de la curva de calibración y sustituir el valor de la absorbancia obtenida.

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Señal de la densidad óptica a 765 nm (absorbancia)

m = Pendiente de la recta

x = Concentración del ácido gálico µg/mL

b = Intersección de la recta en el eje de la ordenada

$$y = 0,0106x + 0,0047 \dots \dots \dots (Ecuación)$$

$$x = \frac{0,544 - 0,0047}{0,0106}$$

$$= 51,726 \mu\text{g}/\text{mL}$$

83

86

- Luego se determina la concentración expresada en (mg EAG/g)  
Se introducen todos los términos conocidos en la ecuación 2 y se resuelve la ecuación. Con factor de dilución (ejemplo del extracto del tratamiento N°1)

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$C2 = \frac{C1 * V1}{V2}$$

$$C2 = \frac{51,726 \mu\text{g/ml} * 5 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \dots\dots\dots (\text{Ec. } 2)$$

$$C2 = 258,632 \mu\text{g}$$

- Reemplazar el valor de la Ec. 2 en la Ec. 3 ..... (Ec. 3)

$$C3 = \frac{258,632 \mu\text{g} * 25 \text{ ml}}{2 \text{ ml}}$$

$$C3 = 3232,901 \mu\text{g}$$

$$3,233 \text{ mg} \dots\dots\dots 25,3 \text{ mg}$$

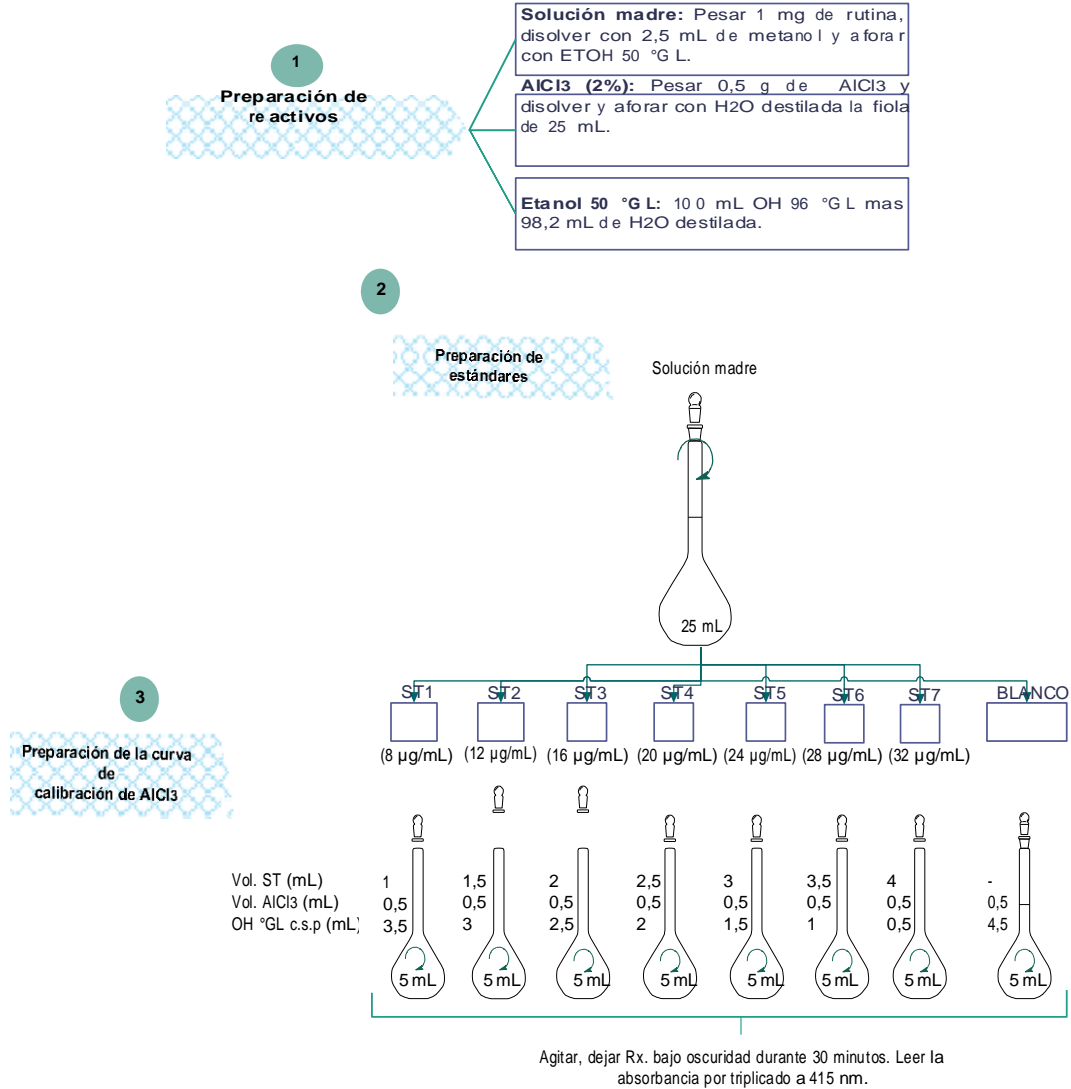
$$\dots\dots\dots 1000 \text{ mg}$$

$$\dots\dots\dots = 127,783 \text{ mg EAG/g}$$

## Anexo 6

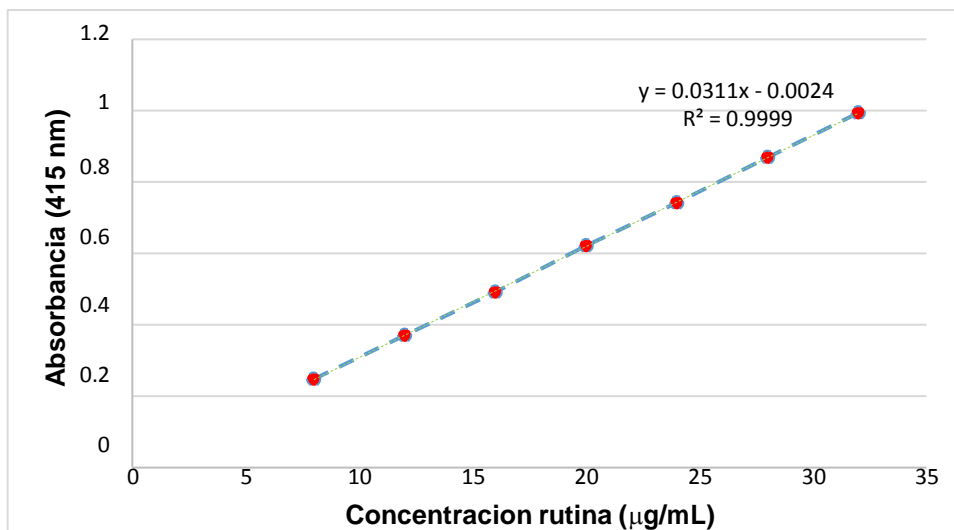
### Flavonoides totales (Método Cloruro de Aluminio)

#### a. Cálculos para la preparación de reactivos

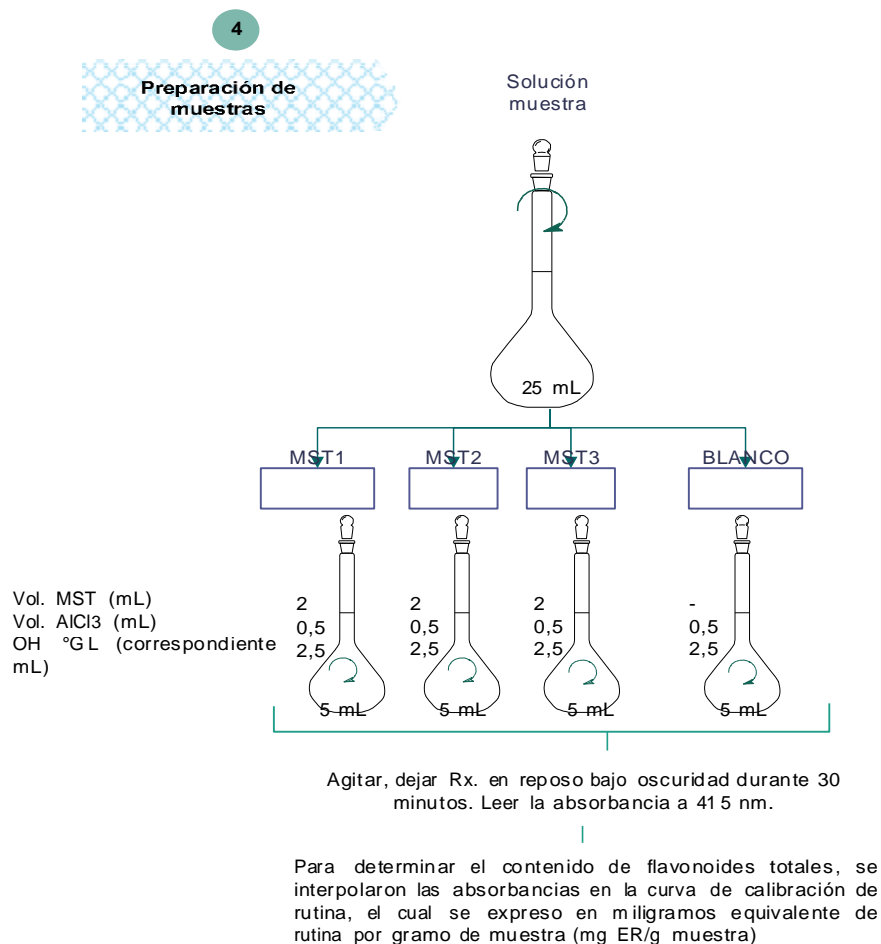


#### b. Curva de calibración

Concentración (µg/mL)	Absorbancia			Promedio absorbancia
	Repet. 1	Repet. 2	Repet. 3	
8	0,246	0,247	0,251	0,248
12	0,372	0,369	0,371	0,371
16	0,491	0,493	0,493	0,492
20	0,623	0,624	0,618	0,622
24	0,740	0,741	0,744	0,742
28	0,865	0,873	0,870	0,869
32	0,990	0,997	0,995	0,994



**Figura 26.** Curva de calibración para el método Cloruro de Aluminio en la determinación de flavonoides totales.



**Figura 20.** Procedimiento para flavonoides totales (Cloruro de aluminio).

**Elaboración.** La autora.



16,476  $\mu\text{g}/\text{mL}$  \_\_\_\_\_ 2 mL

$\mu\text{g}/\text{mL}$  \_\_\_\_\_ 25 mL

$$\diamond = 205,949 \mu\text{g}$$

$$0,206 \text{ mg} \quad \text{_____} \quad 25,3 \text{ mg}$$

$$X \quad \text{_____} \quad 1000 \text{ mg}$$

$$X = 8,140 \text{ mg ER/g}$$



## Anexo 7

### Análisis de Varianza del contenido de fenoles totales

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Etanol	202,417	1	202,417	6,64	<b>0,0496</b>
B:Relacion S/L	45,4629	1	45,4629	1,49	0,2765
C:Tiempo	596,16	1	596,16	19,55	<b>0,0069</b>
AA	331,459	1	331,459	10,87	<b>0,0215</b>
AB	0,60918	1	0,60918	0,02	0,8931
AC	434,222	1	434,222	14,24	<b>0,0130</b>
BB	5,82282	1	5,82282	0,19	0,6803
BC	1,46168	1	1,46168	0,05	0,8353
CC	423,045	1	423,045	13,87	<b>0,0136</b>
Error total	152,456	5	30,4912		
Total (corr.)	2160,99	14			

R-cuadrada = **92,9451** porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **80,2462** porciento

Error estándar del est. = 5,52189

Error absoluto medio = 2,53088

## Anexo 8

### Análisis de Varianza del contenido de flavonoides totales

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Etanol	22,9808	1	22,9808	76,06	<b>0,0003</b>
B:Relacion S/L	0,692076	1	0,692076	2,29	0,1906
C:Tiempo	1,33498	1	1,33498	4,42	0,0895
AA	0,706731	1	0,706731	2,34	0,1867
AB	0,190969	1	0,190969	0,63	0,4627
AC	0,174306	1	0,174306	0,58	0,4818
BB	3,44193	1	3,44193	11,39	<b>0,0198</b>
BC	0,613872	1	0,613872	2,03	0,2134
CC	0,606379	1	0,606379	2,01	0,2158
Error total	1,51076	5	0,302151		
Total (corr.)	31,7771	14			

R-cuadrada = **95,2458** porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **86,6882** porciento

Error estándar del est. = 0,549683

Error absoluto medio = 0,214633

## Anexo 9

### Matriz de consistencia

**Título:** Optimización de la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. "marihuana". Ayacucho 2018.

**Autor:** Flor A. Mendez Pérez

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Marco teórico	Metodología
¿Cuáles serán los niveles óptimos de grado alcohólico, relación sólido/líquido y tiempo de extracción para obtención del contenido de compuestos fenólicos de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. "marihuana"?	<p><b>General</b> Optimizar la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L.</p> <p><b>Específico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar el efecto de los factores independientes como el grado alcohólico, relación sólido/líquido, tiempo de extracción y sus interacciones influyen de manera significativa en la extracción de compuestos fenólicos totales de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L.</li> <li>Determinar las condiciones óptimas de los factores independientes para el mejor tratamiento en la obtención de compuestos fenólicos totales de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. "marihuana".</li> <li>Determinar el análisis de regresión para la predicción y optimización de la extracción de compuestos fenólicos de las inflorescencias de <i>Cannabis sativa</i> L. "marihuana".</li> </ul>	La relación óptima de los factores de extracción permite la mejor extracción de compuestos fenólicos.	<p><b>Independientes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Grado alcohólico</li> <li>Relación sólido:líquido</li> <li>Tiempo de extracción</li> </ul> <p><b>Indicadores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>°GL</li> <li>Gramo por mililitro (g/mL)</li> <li>Horas (h)</li> </ul> <p><b>Dependientes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fenoles totales</li> <li>Flavonoides totales</li> </ul> <p><b>Indicadores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Equivalente a ácido gálico (mg/g)</li> <li>Equivalente a rutina (mg/g)</li> </ul>	<p>Antecedentes <i>Cannabis sativa</i> L.</p> <p>Compuestos fenólicos</p> <p>Fenoles</p> <p>Flavonoides</p> <p>Flavonoides del género <i>Cannabis sativa</i></p> <p>Marco legal</p> <p>Diseño de experimento</p> <p>Metodología de superficie de respuesta</p> <p>Diseño Box - Behnken</p>	<p><b>Población:</b> Inflorescencia femenina de <i>Cannabis sativa</i> L. "marihuana" incautadas por los peritos del Departamento de Criminalística de la PNP - DIRANDRO Ayacucho, del distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, Departamento Ayacucho.</p> <p><b>Muestra:</b> La muestra consistió en inflorescencias secas de <i>Cannabis sativa</i> L., entregado por los peritos del Departamento de Criminalística de la PNP -REPGOL Ayacucho.</p> <p><b>Muestreo:</b> La técnica de muestreo fue no probabilístico en la cual se empleó la estrategia del muestreo aleatorio simple ya que se cuenta una población relativamente pequeña además con un listado de unidades. Como se trata de optimizar un proceso donde la variable de respuesta es cuantitativa (contenido de fenoles y flavonoides totales), el muestreo se realizó de tal modo que se garantice la mejor respuesta, por lo que se tuvo en consideración algunos criterios generales de inclusión y exclusión de la muestra.</p> <p><b>Diseño experimental:</b> Diseño de Box - Behnken</p> <p><b>Extracción de compuestos fenólicos totales</b> Por percolación</p> <p><b>Cuantificación de fenoles y flavonoides totales:</b> Método espectrofotométrico.</p> <p><b>Optimización y análisis de datos</b> Se empleó el software STATGRAPHICS centurion XVI.</p>

