



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN  
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

**Tema:** Desarrollo de un método para la extracción de cannabidiol (CBD) a partir de flores de *Cannabis sativa* L. en el Laboratorio Neofármaco del Ecuador CIA. LTDA.

---

Trabajo de Titulación, modalidad de Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previa a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**AUTOR:** Jazmine Estefania Sánchez Guevara

**TUTOR:** BQF. Irvin Ricardo Tubón Usca. PhD

**Ambato-Ecuador**

**Septiembre – 2023**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

BQF. Irvin Ricardo Tubón Usca. PhD

### **CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este trabajo de titulación bajo la modalidad de Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 24 de julio del 2023

BQF. Irvin Ricardo Tubón Usca. PhD

C.I: 1754784864

**TUTOR**

## **AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Jazmine Estefania Sánchez Guevara, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



Jazmine Estefania Sánchez Guevara

C.I.1804511036

**AUTORA**

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este trabajo de titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi trabajo de titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jasmine', with a stylized flourish extending to the right.

Jazmine Estefania Sánchez Guevara

C.I.1804511036

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Docentes Calificadores, aprueban el trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para la constancia firman

.....

Presidente del tribunal

.....

Mg. Daniel Alfonso Cabrera Valle

C.I. 1802560595

.....

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldás

C.I. 1802706596

Ambato, 22 de agosto del 2023

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Mirian y Santiago quienes son mi motor y pilares fundamentales en mi vida. A los que me han sabido enseñar que con esfuerzo y mucha constancia las metas se cumplen. Gracias por saber guiarme por buenos caminos hasta llegar a convertirme en la persona que soy.

A mi hermano Matías, mi amigo incondicional en todo momento, gracias por ser mi luz y brindarme mucha fortaleza en todo momento. Muchas gracias por llenarme de calidez y cariño con tus pequeñas acciones de corazón.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por tantas alegrías y bendiciones derramadas. A mi familia por su apoyo constante y palabras de aliento en todo momento.

A la Universidad Técnica de Ambato, mi alma mater, y en ella a docentes y amistades que formaron parte de mi formación profesional durante todos estos años.

Al Laboratorio Neofármaco del Ecuador, por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación y afianzar mis conocimientos en tan prestigiosa institución.

Al Dr. Carlitos Pazmiño y todos los analistas de Neofármaco, quienes con su experiencia y amplio conocimiento han sabido guiarme para llevar de la mejor forma mi proyecto de titulación.

Al Dr. Irvin Tubón, quien como tutor y docente ha sabido asesorarme y apoyarme adecuadamente en la realización de mi trabajo de titulación.

A mis amigos y a todos quienes han estado pendientes del avance de mi proyecto, motivándome constantemente para concluirlo de la mejor forma.

## INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
INDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
INDICE DE TABLAS .....	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN EJECUTIVO .....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO .....	1
1.1. Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1. Justificación.....	1
1.1.2. Información general del Laboratorio Neofármaco.....	3
1.1.3. Generalidades del <i>Cannabis sativa</i> L.....	3
1.1.3.1. Taxonomía .....	3
1.1.3.2. Morfología .....	4
1.1.3.3. Inflorescencias femeninas .....	6
1.1.3.4. Tipos de poda en inflorescencias femeninas.....	6
1.1.3.5. Normativas de control de calidad de inflorescencias.....	7
1.1.3.6. Cannabinoides.....	8
1.1.3.7. Cannabidiol y su aplicación terapéutica.....	8
1.1.3.8. Extracción de cannabidiol y normativa legal ecuatoriana .....	9
1.1.4. Métodos utilizados para la extracción de cannabidiol .....	10
1.1.4.1. Extracción con fluido supercrítico (SFE).....	10
1.1.4.2. Extracción asistida por microondas (MAE).....	11



1.1.4.3. Extracción etanolica por maceración .....	11
1.1.4.4. Procesos involucrados en la obtención del extracto de cannabis	12
1.1.4.5. Otros métodos de extracción.....	12
1.1.5. Validación de un método por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).....	13
1.1.5.1. Parámetros de verificación establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) .....	14
1.1.5.2. Linealidad .....	14
1.1.5.3. Precisión y exactitud .....	14
1.1.5.4. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) ..	15
1.1.5.5. Idoneidad del sistema (System suitability test).....	15
1.2. <i>Objetivos</i> .....	16
1.2.1. Objetivo general .....	16
1.2.2. Objetivos específicos .....	16
1.3. <i>Variables de investigación</i> .....	16
1.3.1. Variable independiente.....	16
1.3.2. Variable dependiente.....	16
<b>CAPITULO II.- METODOLOGÍA.....</b>	<b>17</b>
2.1. <i>Materiales, equipos y reactivos empleados</i> .....	17
2.1.1. Reactivos .....	17
2.1.2. Materiales.....	18
2.1.3. Equipos.....	19
2.2. <i>Métodos</i> .....	19
2.2.1. Determinación de los parámetros de calidad de <i>C. sativa</i> .....	19
2.2.1.1. Adquisición de la flor de <i>C. sativa</i> .....	20
2.2.1.2. Identificación de atributos organolépticos de la flor <i>C. sativa</i> ..	20
2.2.1.3. Ensayos fisicoquímicos para la identificación de tricomas .....	20
2.2.1.4. Ensayos fisicoquímicos para la determinación de humedad.....	21
2.2.2. Extracción de cannabidiol de dos tipos de flor de <i>C sativa</i> . .....	21
2.2.2.1. Preparación del material vegetal .....	22
2.2.2.2. Descarboxilación.....	22

2.2.2.3. Maceración.....	23
2.2.2.4. Filtración.....	23
2.2.2.5. Concentración de los extractos .....	24
2.2.3. Evaluación de los extractos empleando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	24
2.2.3.1. Preparación de muestras.....	24
2.2.3.2. Preparación del estándar de cannabiol (CBD) a 0,05 mg/ml.....	25
2.2.3.3. Preparación del estándar de Uracilo o blanco .....	25
2.2.3.4. Validación del método y adecuabilidad del sistema .....	25
2.2.3.5. Parámetros de linealidad .....	26
2.2.3.6. Precisión (repetibilidad del sistema).....	27
2.2.3.7. Límite de detección y límite de cuantificación .....	27
2.2.3.8. Idoneidad del sistema.....	28
2.2.3.9. Cuantificación de CBD en el extracto.....	28
2.2.3.10. Análisis estadísticos .....	29
<b>CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
3.1. <i>Análisis y discusión de los resultados</i> .....	30
3.1.1. Caracterización de flores en base a consideraciones de la farmacopea de los Estados Unidos (USP).....	30
3.1.2. Parámetros fisicoquímicos de las flores .....	32
3.1.3. Evaluación de los rendimientos de extracción de dos tipos de flores de <i>C. sativa</i> .....	33
3.1.4. Linealidad del sistema y criterios de aceptación.....	36
3.1.5. Precisión (repetibilidad del sistema) .....	37
3.1.6. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....	38
3.1.7. Idoneidad del sistema .....	40
3.1.8. Evaluación de factores (tiempo de maceración, tipo de flor y temperatura) en la cuantificación de CBD .....	41
3.2. <i>Verificación de la hipótesis</i> .....	44
<b>CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>45</b>
4.1. Conclusiones.....	45

4.2. Recomendaciones .....	46
<b>MATERIALES DE REFERENCIAS.....</b>	<b>47</b>
<i>Referencias bibliográficas.....</i>	<i>47</i>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>53</b>
Anexo A. Macerados de <i>C. sativa</i> durante 24 días.....	53
Anexo B. Resultados obtenidos de rendimientos de extracción empleando un método de maceración .....	54
Anexo C. Resultados obtenidos de la linealidad del sistema del estándar de CBD.....	55
Anexo D. Curva de calibración de la linealidad del sistema .....	56
Anexo E. Cromatograma del estándar de cannabidiol .....	57
.....	57
Anexo F. Prueba ANOVA empleada para cuantificación de CBD.....	58
Anexo G. Prueba de Tukey establecida para la concentración de CBD. ...	59
Anexo H. Licencia de procesamiento de <i>C. sativa</i> en el Laboratorio Neofármaco .....	60

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del <i>Cannabis sativa</i> L.....	4
<b>Tabla 2.</b> Otros métodos de extracción utilizados para la extracción de cannabidiol	13
<b>Tabla 3.</b> Reactivos empleados para la extracción de cannabidiol. ....	17
<b>Tabla 4.</b> Materiales empleados para la extracción de cannabidiol.....	18
<b>Tabla 5.</b> Equipos empleados para la extracción de cannabidiol.....	19
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de operación que se emplearán en el proyecto de investigación .....	26
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de linealidad del sistema para el estándar de cannabidiol.....	26
<b>Tabla 8.</b> Diseño experimental utilizado en el proyecto de investigación.....	29
<b>Tabla 9.</b> Resultados obtenidos de la caracterización de las flores de <i>cannabis</i> en base a consideraciones USP. ....	30
<b>Tabla 10.</b> Resultados obtenidos de la determinación de parámetros fisicoquímicos de las flores en base a consideraciones USP.....	32
<b>Tabla 11.</b> Criterios de aceptación obtenidos de la linealidad del sistema del estándar de cannabidiol .....	36
<b>Tabla 12.</b> Criterios de aceptación obtenidos de la repetibilidad del sistema empleando un estándar de cannabidiol .....	38
<b>Tabla 13.</b> Resultados obtenidos del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del cannabidiol.....	39
<b>Tabla 14.</b> Criterios de aceptación obtenidos de la idoneidad del sistema (System Situability).....	40
<b>Tabla 15.</b> Cantidad de CBD obtenida en el extracto mediante el equipo HPLC .....	41
<b>Tabla 16.</b> Macerados de etanol a diferentes condiciones material vegetal: solvente (1:6) durante 24 días.....	53
<b>Tabla 17.</b> Rendimiento de extracción obtenidos para los extractos etanolicos a diferentes condiciones.....	54
<b>Tabla 18.</b> Resultados obtenidos de la linealidad del sistema del estándar de cannabidiol.....	55
<b>Tabla 19.</b> Resultados obtenidos de la prueba ANOVA para la concentración de CBD.....	58
<b>Tabla 20.</b> Resultados obtenidos de la prueba de Tukey .....	59

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología de la planta de <i>C. sativa</i> .....	5
<b>Figura 2.</b> Podas en inflorescencias femeninas .....	7
<b>Figura 3.</b> Estructura química del cannabidiol y características farmacológicas. ....	9
<b>Figura 4.</b> Procesos involucrados en la extracción de CBD.....	12
<b>Figura 5.</b> Visualización de diferentes tricomas en lente 10 x .....	21
<b>Figura 6.</b> Esquema del proceso de extracción de cannabidiol (CBD) .....	22
<b>Figura 7.</b> Tipos de podas en inflorescencias femeninas de <i>C. sativa</i> .....	31
<b>Figura 8.</b> Microscopia óptica de <i>C. sativa</i> , 10X.....	33
<b>Figura 9.</b> Gráfica del comportamiento de extracción para dos tipos de flores de cannabis empleando un método de maceración exhaustiva. ....	34
<b>Figura 10.</b> Gráfica del rendimiento total para dos tipos de flores de cannabis empleando un método de maceración exhaustiva.....	35
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas de muestras de CBD en extractos etanolicos. ....	43
<b>Figura 12.</b> Curva de calibración del método .....	56
<b>Figura 13.</b> Cromatograma del estándar de CBD. ....	57

## RESUMEN EJECUTIVO

El desarrollo de nuevos productos farmacéuticos en laboratorios sugiere el riguroso control de calidad de estos, especialmente de matrices vegetales como el *Cannabis sativa* L. El presente proyecto desarrollo un método para extracción de cannabidiol (CBD) a partir de dos tipos de flores (trimiada y no trimiada). Para lo cual se evaluó los diferentes tipos de flores en base a sus características organolépticas, fisicoquímicas, rendimiento y cantidad de CBD considerando parámetros de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP).

Ambos tipos de flores presentaron adecuadas características organolépticas (color, aroma), y fisicoquímicas (humedad, variedad de tricomas). Sin embargo, la flor no trimiada presento un mejor rendimiento de extracción de 38,761 por ciento bajo condiciones de descarboxilación y congelación por maceración empleando 25 gramos de material vegetal y 165 mililitros de etanol durante 24 días. Además, la validación por HPLC mostro una correcta linealidad, precisión (repetibilidad), límite de detección y cuantificación e idoneidad del estándar de CBD. Así mismo el ANOVA mostro similar cantidad de CBD en el extracto con 2,101 y 2,056 gramos al emplearse la flor no trimiada bajo temperaturas de – 10 y 25 grados centígrados respectivamente.

Los resultados respaldan la idoneidad del método empleando ambos tipos de flores. Sin embargo, para obtener mayor rendimiento y cantidad de CBD resulta ideal el empleo de la flor no trimiada considerando temperaturas más bajas de extracción, así como mayores tiempos y temperaturas de descarboxilación. Finalmente, el método puede ser incluido dentro de análisis de control de calidad en el Laboratorio Neofármaco.

**Palabras clave:** Farmacia, *C. sativa*, cannabidiol, control de calidad, extracción de CBD, validación de métodos, HPLC, Laboratorio Neofármaco

## ABSTRACT

The development of new pharmaceutical products in laboratories suggests the rigorous quality control of these, especially of plant matrices such as *Cannabis sativa* L. The present project developed a method for the extraction of cannabidiol (CBD) from two types of flowers (untrimmed and trimmed). For which the different types of flowers were evaluated based on their organoleptic and physicochemical characteristics, yield and amount of CBD considering parameters of the United States Pharmacopoeia (USP).

Both types of flowers presented adequate organoleptic features (color, aroma) and physicochemical (humidity, variety of trichomes) characteristics. However, the untrimmed flower presented a better extraction yield of 38.761 percent under decarboxylation and freezing by maceration using 25 grams of plant material and 165 milliliters of ethanol for 24 days. In addition, HPLC validation showed correct linearity, precision (repeatability), limit of detection and quantification and suitability of the CBD standard. Likewise, ANOVA showed similar amount of CBD in the extract with 2,101 and 2,056 grams when the untrimmed flower was used under temperatures of -10 and 25 degrees Celsius respectively.

The results support the suitability of the method using both types of flowers. However, to obtain higher yield and quantity of CBD it is ideal to use the untrimmed flower considering lower extraction temperatures, as well as longer decarboxylation times and temperatures. Finally, the method can be included in the quality control analysis in the Neofármaco Laboratory.

**Keywords:** pharmaceutical, *C. sativa*, cannabidiol, quality control, CBD extraction, method validation, HPLC, Neofármaco Laboratory

## CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes investigativos

#### 1.1.1. Justificación

Ecuador es reconocido mundialmente por su riqueza y variedad de flora y fauna, caracterizándose por albergar una gran biodiversidad. Específicamente, sus plantas brindan material vegetal con propiedades medicinales, el cual es ampliamente aceptado en la producción de medicamentos y fármacos. La integración de fármacos naturales en el mercado farmacéutico requiere de técnicas adecuadas que aseguren su producción controlada. Por lo tanto, es de suma importancia que los laboratorios pioneros y productores de fármacos estén comprometidos con garantizar la inocuidad de estos productos bajo normativas estandarizadas, especialmente aquellos que contienen principios poco explorados, como el cannabidiol (CBD) (Zhou et al., 2022).

El uso de *Cannabis sativa* L. para fines medicinales y terapéuticos es legal siempre y cuando se realice una adecuada identificación morfológica y cuantificación de sus principales derivados fitocannabinoides (ARCOSA, 2021a). De hecho, algunos de los principales cannabinoides como el CBD, son usados para tratar dolores crónicos y agudos (Maayah et al., 2020). Siendo éste el componente mayoritario del cannabis y de naturaleza no psicoactiva. A pesar de esto, hay pocos estudios clínicos que respalden su uso terapéutico y científico debido al riguroso marco legal y la falta de un marco conceptual médico, así como un obligatorio seguimiento de control de calidad que incluye la adquisición de la materia prima hasta el desarrollo del producto final (EMCDDA, 2018).



Actualmente, el control de calidad de los fitoproductos como el CBD es fundamental y se requieren métodos analíticos confiables para cumplir con esta tarea. Además, constituye una exigencia desde el punto de vista regulatorio incorporar metodologías emitidas por los principales agentes reguladores como son los Institutos Nacionales de Salud (NIH), y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) (**MAG, 2022**). Dichos institutos garantizan la integridad e inocuidad de la calidad de la materia prima bajo la selección de un método analítico adecuado. Para esto se consideran factores como la disponibilidad de equipamiento, el tiempo requerido para el análisis, así como los reactivos y materiales empleados en un laboratorio farmacéutico (**Ministerio de salud pública, 2021**).

Por lo tanto, en los laboratorios farmacéuticos, las normas de regulación deben incluir ensayos para la caracterización e identificación organoléptica y fisicoquímica de la flor, así como la cuantificación de sus principales fito cannabinoides como el CBD (**USP, 2022**). Para lograr esto, es necesario considerar un método de extracción y considerar las características genéticas de la flor, las condiciones adecuadas de poda y cultivo (**Uziel et al., 2020**). Indicando que, si no se cuida estos factores, la calidad del material vegetal puede verse afectado durante todas sus etapas de análisis, lo que repercutirá en la calidad y uniformidad del extracto final (**Russo & Marcu, 2017**).

Para garantizar la calidad del extracto vegetal se utilizarán metodologías de la USP americana y del Laboratorio Neofármaco para crear una adecuada caracterización e identificación de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. y relacionarla con la concentración de cannabidiol obtenida para uso terapéutico (**Sarma et al., 2020**). Esto servirá de base al Laboratorio Neofármaco para la elaboración de una guía que permita la estandarización del proceso de manufactura del cannabis desde la caracterización macroscópica hasta la elaboración del extracto y cuantificación de CBD por métodos cromatográficos (**Križman, 2019**). Dentro de dichos análisis cromatográficos se incluirán cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en fase reversa para cuantificar la cantidad de CBD en extractos obtenidos de dos tipos (trimiado y no trimiado) de *C. sativa*. Y de esta manera se buscará demostrar que la metodología de extracción desarrollada es apropiada para ejecutarse dentro de análisis rutinarios en Laboratorio.

### **1.1.2. Información general del Laboratorio Neofármaco**

El Laboratorio Neofármaco es una importante empresa farmacéutica del centro del Ecuador que se caracteriza por ofrecer medicamentos y cosméticos para el cuidado de la salud de los ecuatorianos. Enfocados en la innovación los productos ofertados por Neofármaco se caracterizan por estar adecuadamente formulados siguiendo los más rigurosos lineamientos de calidad e inocuidad. Es así como el desarrollo de nuevos fármacos presupone la incorporación de un adecuado seguimiento de los procesos e insumos durante todo el ciclo de vida del producto. Por lo tanto, la adecuada estandarización de los nuevos productos bajo personal especializado y comprometido con la venta y el servicio es esencial para asegurar su éxito (**Barros, 2021**).

### **1.1.3. Generalidades del *Cannabis sativa* L.**

#### **1.1.3.1. Taxonomía**

*C. sativa*, es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Cannabaceae género *Cannabis* que se clasifica en varias subespecies entre las más importantes se encuentra a *C. sativa* subesp. *sativa*, *C. sativa* subsp. *indica* y *C. sativa* subsp. *ruderalis*. Sin embargo, dado sus características químicas y morfológicas, se empleará el nombre de *Cannabis sativa* L., para identificar a todas las subespecies (**Hartsel et al., 2016**). De forma general la planta de cannabis ha sido clasificada de la siguiente manera.

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

<b>Categoría</b>	<b>Nomenclatura botánica</b>
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Espermatofita
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Hamamelididae
Orden	Urticales
Familia	Cannabaceae
Genero	<i>Cannabis</i>
Especie	<i>Cannabis sativa</i> L.

**Fuente:** (United Nations Office on Drugs and Crime., 2020).

### **1.1.3.2.Morfología**

*C. sativa* es una planta anual que crece hasta 4 m de alto, y en algunos casos, puede alcanzar una altura de 1 a 3 m. Por su parte la longitud de las ramas, al igual que la altura de la planta, dependerá de factores ambientales y genéticos, así como del método de cultivo. En cuanto a las hojas estas son palmadas y estipuladas y se encuentran sobre pecíolos de hasta 7 cm de largo. Cada hoja se compone de entre 3 a 9 folíolos angostos, de ápice agudo, con márgenes serrados y tricomas glandulares y no glandulares. Finalmente, las inflorescencias de la flor masculina son estaminadas más grandes, pero menos resistentes que las flores femeninas o pistiladas (**United Nations Office on Drugs and Crime., 2020**). Los aspectos morfológicos generales de las plantas de cannabis se observan en la figura 1.



**Figura 1.** Morfología de la planta de *C. sativa*.

Visualización de la estructura completa de la planta: 1 Flor macho; 2 y 3, saco de polen; 4 polen; 5 flor hembra con bráctea; 6 y 7, semilla en bráctea; 8 semilla emergiendo de bráctea; 9 y 10 semilla sin bráctea; 11 y 12 semilla recortada. Adaptado de Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis, por United Nations Office on Drugs and Crime., (2020).

### **1.1.3.3. Inflorescencias femeninas**

La inflorescencia del *C. sativa*; es un racimo altamente ramificado que se caracteriza por un crecimiento monopodial, con meristema apical persistente e inflorescencias axilares indeterminadas de órdenes superiores (**Spitzer-Rimon et al., 2019**). La estructura de la inflorescencia femenina del cannabis se describe como “flores pistiladas desarrolladas de dos en dos en las axilas de las hojas y representaran las primeras ramitas de la rama axilar secundaria. Además, las inflorescencias pistiladas son pequeñas, y de aproximadamente 1 a 5 cm de largo y ancho, con brácteas ligeramente salientes que encierran las semillas y órganos de la planta (**World Health Organization., 1998b**).

### **1.1.3.4. Tipos de poda en inflorescencias femeninas**

Al extraer las inflorescencias de la planta, se realizan cortes delicados o podas. Esto permite descartar una gran cantidad de hojas que recubren las inflorescencias. Dichas inflorescencias contienen grandes cantidades de cannabinoides. La calidad y el resultado final de la planta dependerán del tipo de poda que se lleven a cabo ya que se busca eliminar la máxima cantidad de hojas con un mínimo daño en los tricomas de la superficie de las flores (**Hartsel et al., 2016**).

Existen dos formas predominantes de poda. Por un lado, la poda antes del secado o recorte húmedo en el cual se eliminan las hojas grandes y pequeñas del peciolo empleando un delicado movimiento con las tijeras. Esto permite una mayor circulación del aire alrededor de los cogollos mientras se secan y evita la aparición de moho y toxinas.

Por otro lado, la poda antes del secado o recorte en seco, en el cual se cortará la planta y se dejará secar durante varios días antes de cortar las inflorescencias. Esta última técnica promueve un secado más lento y uniforme, sin embargo, su tiempo es el triple que una poda en húmedo (**Sridhar et al., 2022**).

En algunos casos se opta por cortar pequeñas partes de las hojas y brácteas (trimiado recortado) lo que afecta la calidad de la inflorescencia. Sin embargo, esta técnica es más rápida y requiere menor trabajo en comparación con la poda de hojas. También se opta por realizar minuciosos cortes en las hojas para quitarlas completamente del peciolo o no recortarlas y quedarse con hojas subtendidas también se opta por recortar mínimamente las brácteas (no trimiadas) figura 2.



**Figura 2.** Podas en inflorescencias femeninas

Diferentes tipos de podas en flores (a) Flor trimiada, (b) Flor no trimiada. Adaptado de Supporting Information Cannabis Inflorescence for Medical Purposes por World Health Organization., 1998.

#### **1.1.3.5. Normativas de control de calidad de inflorescencias**

La inflorescencia de cannabis femenina es muy útil en terapia, por lo que es importante caracterizarle con criterios de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Dado que el cannabis es una matriz heterogénea, se requieren procedimientos de muestreo y un conjunto de pruebas analíticas y criterios de aceptación para definir la identidad, y el contenido de sus principales constituyentes cannabinoides (**Sarma et al., 2020**).

De esta forma las pruebas analíticas realizadas para uso medicinal deben evidenciar un control adecuado de que no se observen signos visibles de contaminación. Por lo que el examen macroscópico es útil para detectar material extraño, mientras que la

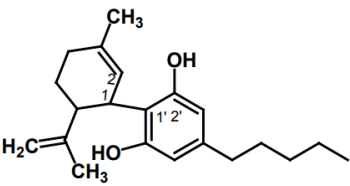
microscopia permite identificar los tricomas multicelulares que portan las resinas cannabinoicas de interés terapéutico (**World Health Organization., 1998a**).

#### **1.1.3.6.Cannabinoides**

El cannabis posee compuestos químicos completos como terpenoides azúcares, alcaloides y principalmente cannabinoides, siendo estos últimos derivados de la alquilación de un alquil resorcinol con una unidad monoterpénica. El contenido de cannabinoides dependerá de factores bióticos que incluyen el genotipo de la planta, condiciones de crecimiento como la luz, temperatura, fotoperiodo y nutrientes. Las concentraciones más altas de los fitocannabinoides se encuentran de menor concentración en tallos, seguido de hojas y finalmente en los tricomas de las inflorescencias. Principalmente en los tricomas glandulares de la mayoría de las flores o inflorescencias femeninas y en poca presencia en flores masculinas. Los fitocannabinoides mejor caracterizados son el tetrahidrocannabinol THC, y el cannabidiol (CBD) obtenidos de la descarboxilación o calentamiento del ácido tetrahidrocannabinico (THCA) y ácido cannabidiolico (CBDA) respectivamente (**Maayah et al., 2020**).

#### **1.1.3.7.Cannabidiol y su aplicación terapéutica**

El Cannabidiol (CBD) es el principal componente no psicoactivo que se encuentran en grandes cantidades en el cannabis convirtiéndose en el segundo tipo de cannabinoide más abundante y muestra concentraciones más altas que el THC (**Russo & Marcu, 2017**). En comparación con el THC, el CBD tiene efectos no psicoactivos, una gran ventaja para las aplicaciones clínicas y tratamientos terapéuticos recurrentes (**Crocq, 2022**). Se observa la estructura química del cannabis en la figura 3.

<p>Cannabidiol CBD</p>  <p>Principales características farmacológicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ansiolítico</li> <li>- Antipsicótico</li> <li>- Analgésico</li> <li>- Anti-inflamatorio</li> <li>- Antiespasmódico</li> </ul>	<p>CAS: 13956-29-1</p> <p>Fórmula empírica: C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub></p> <p>Peso molecular: 314,46 g/mol</p> <p>Punto de fusión: 66-67 °C</p> <p>log P: 5,79 (octanol/agua)</p>
	<p>Solubilidad:</p> <p>Agua: insoluble</p> <p>Etanol: soluble</p> <p>Cloroformo: soluble</p> <p>Hexano: soluble</p>

**Figura 3.** Estructura química del cannabidiol y características farmacológicas.

Estructura CBD con anillo de ciclohexeno, anillo fenólico, una cadena lateral pentilo y componentes químicos farmacológicos. Adaptado de Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis, por United Nations Office on Drugs and Crime., 2020.

En los últimos años el CBD ha destacado por su potencial terapéutico, sus acciones sedantes, antiinflamatorias, anticonvulsivas y antipsicóticas que están mediados por el aumento del efecto de la dopamina y la norepinefrina en el organismo. Además, se han informado numerosos efectos en el corazón, ya que protege contra la disfunción cardíaca, la fibrosis, el estrés oxidativo. Su incorporación prolongada resulta útil para diversas patologías, trastornos cutáneos y cosméticos como el eccema, la psoriasis, el prurito y ciertas afecciones inflamatorias (**Baswan et al., 2020**).

En concentraciones estandarizadas, ya sea en la incorporación de aceites de CBD, este fitocannabinoide ayuda a activar el receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, lo que le confiere un efecto antidepresivo que previene la actividad neuronal excesiva, por lo tanto, calma y disminuye la ansiedad, reduce el dolor, así como reduce la inflamación, regula la percepción sensorial, memoria y función cognitiva (**Shannon & Opila-Lehman, 2016**).

### 1.1.3.8.Extracción de cannabidiol y normativa legal ecuatoriana

La extracción de cannabidiol es de gran interés para la industria del cáñamo ya que este cuenta con un bajo contenido de THC componente psicoactivo con una concentración menor al 0,2 % en el cultivo. Resulta ideal incorporar los extractos de CBD en formas farmacéuticas medicinales como tinturas orales, concentrados de



aceites y dulces. Sin embargo, requieren cada vez más pureza y cumplimiento de parámetros específicos. Por lo tanto, en el Ecuador actualmente se establecen licencias de uso del cannabis cuando se desee cultivar o procesar dicho material vegetal. Sin embargo, deberá poseer una concentración preferente de THC inferior al 1% del peso seco en las inflorescencias femeninas o pistiladas. **(Ministerio de salud pública, 2021)**. De igual forma se establece que los productos a base de cannabis no psicoactivo deberán ser contralados y regulados para ser incorporados como componentes para el producto final y puedan ser incorporados a la venta **(ARCOSA, 2021b)**.

#### **1.1.4. Métodos utilizados para la extracción de cannabidiol**

La elección de un método de extracción debe permitir preservar el aroma, sabor, así como la pureza del principio activo y la inocuidad de los disolventes y reactivos empleados. Claramente la inocuidad de los reactivos garantizará un producto óptimo para consumo. La eficacia de extracción dependerá además de parámetros como la temperatura y tiempo de extracción, y una adecuada proporción de solventes. Los diferentes métodos de extracción van desde métodos más nuevos como extracción por fluidos supercríticos (SFE) hasta métodos clásicos que incluyen maceración dinámica (MD), extracción asistida por ultrasonido (UAE), y por microondas (MAE) **(Szalata et al., 2022)**.

##### **1.1.4.1.Extracción con fluido supercrítico (SFE)**

Es una técnica ampliamente utilizada para la extracción de cannabinoides no psicoactivos con el mejor rendimiento de extracción. Sin embargo, su elevado costo y su uso conlleva una alta complejidad y experticia de manipulación dentro de la industria farmacéutica. Su máximo rendimiento evidenciado es de  $38,5 \pm 0,8$  mg/g de CBD utilizando un sistema Jasco SFE/SFC que se incorporó en el horno de columna y se sometió a extracción utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente A y etanol como solvente B, a 25°C **(Lewis-Bakker et al., (2019)**. así mismo el detector PDA se ajustó a 254 nm y el regulador de contrapresión se ajustó a 12 MPa. Dentro de este análisis la muestra experimentó un pretratamiento de descarboxilación de 150 °C por 10 min.

Por el contrario, antes del calentamiento se obtuvieron resultados de  $5,08 \pm 0,1$  mg/g de CBD, lo que deduce la importancia de un pretratamiento térmico previo.

#### **1.1.4.2.Extracción asistida por microondas (MAE)**

Es una técnica ideal gracias a la elevada temperatura que se alcanza para el proceso de descarboxilación del CBDA en CBD. Su utilidad radica en un tiempo de extracción menor a otros procesos y con mayor extracción de CBD. Sin embargo, radica en una mayor extracción para cannabinoides como el THC y THCA. El porcentaje de rendimiento más alto evidenciado por **De Vita et al., (2020)** es  $4,2 \pm 0,1$  mg/g de CBD utilizando un microondas (2,45 GHz, 400 W) con biomasa en polvo de cannabis en viales de microondas con etanol (10–12 ml) y una barra de agitación. En este procedimiento es importante mantener en agitación a temperatura ambiente (TA) durante 30 segundos a 900 rpm, seguida de irradiación con microondas para mantener una temperatura de 120 °C a 170 °C durante 20 a 45 minutos.

#### **1.1.4.3.Extracción etanolica por maceración**

Es una técnica simple e ideal para la máxima extracción de cannabinoides no psicoactivos dentro de un laboratorio farmacéutico gracias al coste mínimo de equipos y reactivos. Su extracción considera inclusive hasta 3 extracciones repetidas empleando etanol como solvente. La maceración es ideal al emplear las inflorescencias de cáñamo como lo demuestran **Brighenti et al., (2017)** al emplear 0,25 g de cannabis con 10 ml de etanol como disolvente de extracción a temperatura ambiente durante 45 min, bajo agitación magnética, obteniéndose un contenido de  $2,9 \pm 0,1$  mg/g de CBD. siempre y cuando se considere un tiempo largo de maceración y etanol como solvente.

#### 1.1.4.4. Procesos involucrados en la obtención del extracto de cannabis

Una vez determinado las metodologías de extracción se debe optar por procesos unitarios para optimizar la extracción de CBD detallados en la figura 4.



**Figura 4.** Procesos involucrados en la extracción de CBD

Procesos unitarios empleados en la extracción de CBD. Adaptado de *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, por Monton et al., 2019.

#### 1.1.4.5. Otros métodos de extracción

Existen una variedad de métodos de extracción. Así mismo, los porcentajes variaran en dependencia de los solventes y equipos empleados, así como los tiempos y condiciones de extracción. Entre los mencionados en la literatura se destacan los siguientes métodos

**Tabla 2.** Otros métodos de extracción utilizados para la extracción de cannabidiol

<b>Método</b>	<b>Parámetros y rendimiento de extracción</b>	<b>Autor</b>
Extracción con tween 20	En el experimento con tween 20, los valores de CBD total eran hasta 2 veces inferiores al contenido de referencia, obteniéndose 2 mg/ml con 5ml de tween al 2 % en H2O y 5 ml de RTb	<b>(De Vita et al., 2019)</b>
Extracción con aceite de oliva	Se emplea la extracción empleando aceite de oliva por 0, 60, y 120 min en donde la mayor concentración se obtiene a los 120 min con 2,73 mg/ml	<b>(Citti et al., 2016)</b>
Extracción soxhlet	Empleando una muestra de 2 g se extrae empleando el equipo de soxhlet durante 3h con 75 ml de hexano o metanol frio y a temperatura ambiente obteniéndose un rendimiento considerable	<b>(Al Ubeed et al., 2022)</b>

#### **1.1.5. Validación de un método por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)**

El desarrollo de nuevos procedimientos o metodologías de verificación de un nuevo material vegetal como el Cannabis debe cumplir con parámetros establecidos por entidades reguladoras como La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y La Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH). Esto determinará si un procedimiento es adecuado para presentarse en un laboratorio de investigación y su aplicación al control de calidad **(Nikam et al., 2019)**.

### **1.1.5.1. Parámetros de verificación establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP)**

Para determinar cannabinoides especialmente CBD se ha empleado diferentes métodos, que incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detector de matriz de diodos (UV/DAD) y un detector de espectrometría de masas. Sin embargo, para obtener un perfil completo de cannabinoides ya sea en formas ácidas o neutras y evitar posibles cambios en la temperatura de análisis se emplea HPLC. Esta técnica ha permitido la caracterización e identificación del CBD bajo la validación de métodos para el control de calidad de productos farmacéuticos. Estos parámetros se consideran linealidad, sensibilidad, precisión y límite de cuantificación y detección como esenciales (**Fiallos, 2018**).

### **1.1.5.2. Linealidad**

Capacidad del método para indicar proporcionalidad entre la concentración del analito en la muestra establecido y el área pico respuesta AUC dentro de un intervalo establecido. Se construye a partir de una curva de calibración de cinco niveles en donde la evaluación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), debe ser superior a 0,999 utilizando un procedimiento adecuado (**Hernandez, 2007**).

### **1.1.5.3. Precisión y exactitud**

Es la capacidad de variabilidad o grado dispersión del método entre una serie de medidas tomadas a partir de una misma muestra homogénea. La precisión y exactitud se evalúan en cuatro niveles en un solo día bajo las mismas condiciones operativas. Un parámetro de la precisión incluye la repetibilidad en donde se expresa como el coeficiente de varianza (RSD), y la exactitud se expresa como el porcentaje de la media calculada a la concentración nominal (**Sun et al., 2021**).

#### **1.1.5.4.Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)**

El límite de detección (LOD) representa la mínima cantidad de analito que se puede detectar y se estima en función de una relación señal/ruido de 3:1 respectivamente. Y las soluciones estándar de todos los analitos deben diluirse adecuadamente a los niveles de estos valores estimados. Por otro lado, el límite de cuantificación (LOQ) representa la mínima cantidad de analito cuantificable dentro de una adecuada precisión y exactitud, se estima en referencia a una relación señal/ruido de 10:1 (**Citti et al., 2016**).

#### **1.1.5.5.Idoneidad del sistema (System suitability test)**

Es un conjunto de ensayos que permite comprobar y validar el método desarrollado evaluando parámetros como el sistema que incluye analistas, reactivos, equipos e instrumentos. Dentro de los parámetros fundamentales de evaluación se destaca precisión del sistema (system suitability), RSD según USP: factor de asimetría y eficiencia o número de platos teóricos (**AEFI, 2020**).

## **1.2.Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

- Desarrollar un método para la extracción de cannabidiol (CBD) a partir de flores de *Cannabis sativa* L. en el Laboratorio Neofármaco del Ecuador CIA. LTDA.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Determinar los parámetros de calidad de las flores de *Cannabis sativa* L. a partir de sus atributos organolépticos y ensayos fisicoquímicos.
- Extraer cannabidiol de dos tipos de flor de *Cannabis sativa* L. empleando un método de maceración bajo diferentes condiciones.
- Evaluar los extractos obtenidos a partir de la cuantificación del contenido de cannabidiol mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

## **1.3.Variables de investigación**

### **1.3.1. Variable independiente**

- Tipo de flor de *Cannabis sativa* L, tiempo y modo de extracción, relación material vegetal/disolvente y temperatura de extracción.

### **1.3.2. Variable dependiente**

- Contenido de cannabidiol (CBD) en los extractos etanolicos.

## CAPITULO II.- METODOLOGÍA

### 2.1. Materiales, equipos y reactivos empleados

A continuación, se detalla la siguiente tabla de materiales, equipos y reactivos empleados para el desarrollo del proyecto

#### 2.1.1. Reactivos

**Tabla 3.** Reactivos empleados para la extracción de cannabidiol.

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Agua destilada	5 L
Agua grado HPLC	2 L
Acetonitrilo grado HPLC	2 L
Metanol grado análisis	2 L
Etanol 96%	5 L
Estándar de cannabidiol CBD	1 frasco
Estándar de uracilo	1 frasco



### 2.1.2. Materiales

**Tabla 4.** Materiales empleados para la extracción de cannabidiol.

<b>Material vegetal</b>	
flor de <i>Cannabis sativa</i> L. trimiada	100 g
flor de <i>Cannabis sativa</i> L. no trimiada	100 g
<b>Material de laboratorio</b>	
Vaso de precipitado 250 mL	4
Vaso de precipitado 500 mL	4
Vaso de precipitado 1000 mL	3
Filtros de 0.22 $\mu$ m de PVDF	14
Probeta 200 mL	2
Balón de aforo 10 mL	14
Pipeta volumétrica 1 mL	2
Pipeta volumétrica 10 mL	1
Tubo de ensayo 200 mL	4
Cubre y porta objetos	2
Jeringas	14
Viales para HPLC de 2 mL	14
Mangueras	4
Tubos para muestras	14
Mortero y pistilo	2
Varilla de agitación	1
Caja de papel aluminio	1
Papel filtro de membrana de 0,4 $\mu$ m	1
Papel filtro	2
matraz kitasato	1
Pipeta electronica 100 – 1000 $\mu$ L	1
Embudo de Büchner	1
Termómetro	1
Balon de destilación 50 ml	14
Botellas boeco	4
Desecador	1

### 2.1.3. Equipos

**Tabla 5.** Equipos empleados para la extracción de cannabidiol.

<b>Equipos</b>	<b>Cantidad</b>
pH-metro	1
Balanza analítica	1
Conductimetro METTLER TOLEDO	1
Estufa	1
Rotavapor ISOLAB	1
Microscopio binocular OLYMPUS con camara	1
Bomba de vacio BOECO	1
cromatoforo liquido de alta eficiencia HPLC VWR Hitachi Chromaster.	1
Refrigerador	1
Equipo de filtración por membrana de 1000 ml	1
Equipo de sonicación	1
Analizador de humedad METTLER TOLEDO	1

## 2.2.Métodos

### 2.2.1. Determinación de los parámetros de calidad de *C. sativa*

Para la identificación de material vegetal de ambos tipos de flor de cannabis se considerará la metodología interna del Instructivo Analítico de flor de Cannabis no psicoactivo del Laboratorio Neofármaco (IA-CC-370) y la Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito y normativas de la USP y UNODC (**United Nations Office on Drugs and Crime., 2020**).

### **2.2.1.1. Adquisición de la flor de *C. sativa*.**

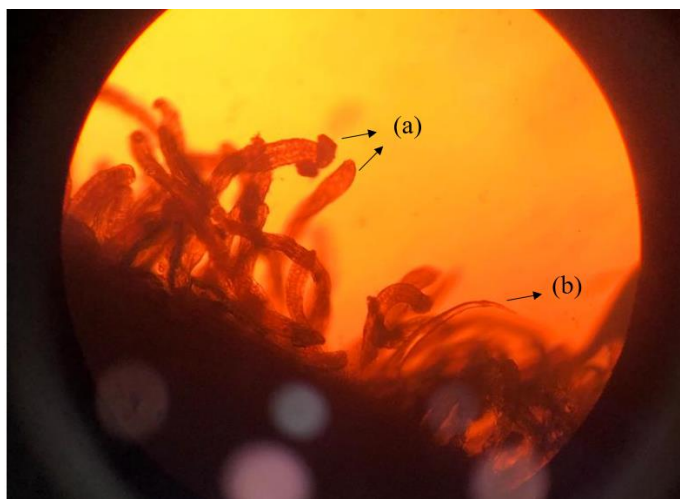
El material vegetal fue solicitado del área de bodega de materia prima del Laboratorio Neofármaco del Ecuador, del cual se tomó 100 gramos de cogollos o inflorescencias de *Cannabis sativa* L. del tipo 1 (no trimiada) y 100 gramos de cogollos del tipo 2 (trimiada). El material vegetal se guardó en bolsas ziploc respectivamente rotuladas en refrigeración para su posterior análisis (**United Nations Office on Drugs and Crime., 2020**).

### **2.2.1.2. Identificación de atributos organolépticos de la flor *C. sativa***

Se realizó una descripción inicial para la cual se tomó la inflorescencia trimiada y no trimiada de *C. sativa* y se observó la presencia o ausencia de hojas. Posterior se observó el color a partir de una inspección visual del material vegetal para ambos tipos de flor. Seguido se hizo una inspección sensorial para determinar el olor característico del material vegetal para ambos tipos de cannabis (**Sarma et al., 2020; World Health Organization., 1998b**).

### **2.2.1.3. Ensayos fisicoquímicos para la identificación de tricomas**

Se tomó 1 mg de flor de *C. sativa* y se realizó un corte transversal de las brácteas, hojas y tallos. A continuación, se suspendió la muestra con agua destilada y se observó la muestra en un microscopio binocular OLYMPUS usando el lente objetivo 10 x y 40 x, finalmente se identificó los siguientes tipos de tricomas: glandulares como bulbo, sistólicos como garra y no sistólicos como cristales cilíndricos como se observa en la figura 5 (**Laboratorio Neofármaco, 2021; Sarma et al., 2020**).



**Figura 5.** Visualización de diferentes tricomas en lente 10 x

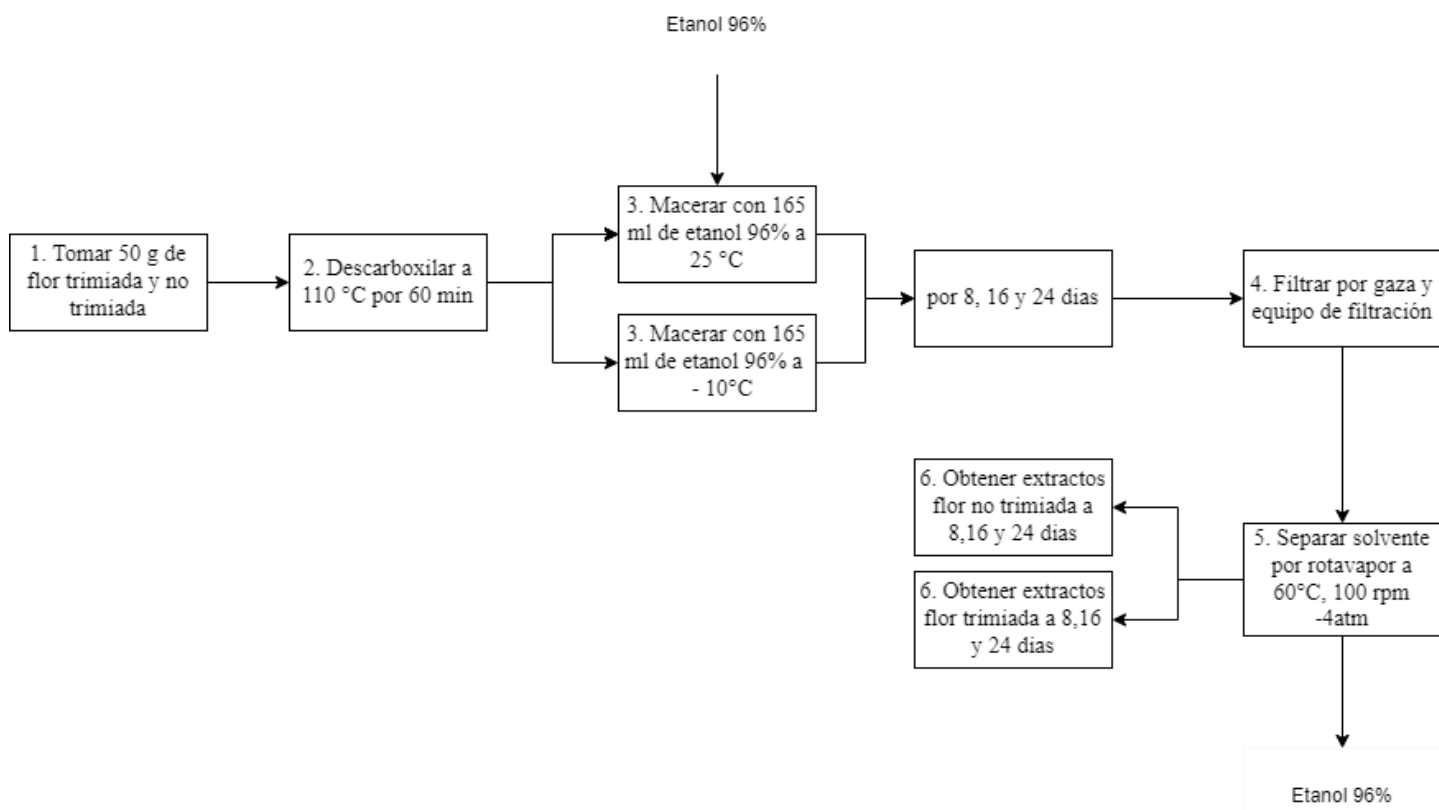
Presencia de diferentes tricomas en las brácteas de *C. sativa*. (a) tricomas glandulares, (b) tricomas no sistólicos.

#### **2.2.1.4. Ensayos fisicoquímicos para la determinación de humedad**

Se pesó 1 g de flor de cannabis no psicoactivo de ambos tipos de cannabis. Posteriormente se colocó en el analizador de humedad METTLER TOLEDO y se esperó hasta la obtención del valor informativo denotado con color azul en la pantalla principal (**Laboratorio Neofármaco, 2022**).

#### **2.2.2. Extracción de cannabidiol de dos tipos de flor de *C sativa*.**

Para la extracción de cannabidiol se siguió el siguiente diagrama, basado en las metodologías analíticas empleadas en el capítulo 565 “extractos botánicos” desarrollado por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) (**USP, 2022**).



**Figura 6.** Esquema del proceso de extracción de cannabidiol (CBD)

### 2.2.2.1.Preparación del material vegetal

Se pesó 50 gramos de inflorescencias de *C. sativa*. no trimiado y trimiado. Posterior se trituró en dos morteros ambos tipos de cannabis y se guardó en fundas ziploc debidamente rotuladas (USP, 2022).

### 2.2.2.2.Descarboxilación

Se colocó 50 gramos del material vegetal del no trimiado y trimiado previamente triturado de ambas especies en una bandeja de papel Kraft y se sometió a descarboxilación en una estufa a 110 °C por 60 minutos. Una vez descarboxilado el material vegetal se separó 25 gramos del tipo 1 y tipo 2 y se conservó en bolsas a temperatura ambiente. A su vez, se guardó 25 gramos del material restante tipo 1 y 2

en diferentes bolsas ziploc y se sometió a congelación a -10 °C (**Lewis-Bakker et al., 2019b**).

#### **2.2.2.3. Maceración**

Se tomó 25 gramos de flor trimiada y no trimiada previamente descarboxilados de la bolsa conservada a temperatura ambiente y se colocó en vasos de precipitación de 500 ml con 165 ml de etanol al 96% en una relación 6:1 (solvente: material vegetal) macerándose a temperatura ambiente por 8 días. A su vez, se tomó 25 gramos restantes del material vegetal tipo 1 y 2 de la bolsa sometida a congelación a -10 °C de ambas especies y se colocó en vasos de precipitación de 500 ml con 165 ml de etanol al 96% en una proporción 6:1 macerándose a congelación a -10 °C por 8 días. El procedimiento previamente descrito se realizó para ambas especies bajo temperatura ambiente y congelación macerándose exhaustivamente 2 veces más como se indica en la (figura 6), es decir se maceró con 165 ml de etanol al 96% en una proporción 1/6 cada 8 días hasta llegar al día 24 (**USP, 2022b**).

#### **2.2.2.4. Filtración**

Una vez transcurridos los primeros 8 días de la primera maceración se filtró los extractos de ambas especies sometidas a congelación y temperatura ambiente con gaza. Una vez más se filtró los extractos empleando un equipo de filtración compuesto de embudo Büchner recubierto por papel filtro N°4 y un Kitasato a presión negativa hasta la obtención de un extracto sin trazas de material vegetal. De igual forma se filtró los extractos para las dos maceraciones restantes obtenidas en los días 16 y 24 (**Nuapia et al., 2020**).

### 2.2.2.5. Concentración de los extractos

Los extractos previamente filtrados se colocaron en un balón de destilación de 50 ml al cual se pesó previamente, posterior se concentró los extractos en un rotavapor a 60 °C por 100 rpm conectado a una bomba peristáltica a presión de -4 atm. Se peso el balón con el extracto. Finalmente, se recogió el recuperado del balón y se guardó en frascos ámbar y a refrigeración 4 °C (**United Nations Office on Drugs and Crime., 2020**). De igual forma se realizó la evaporación del solvente para las 2 maceraciones restantes y se midió el rendimiento de extracción empleando la ecuación 1

$$R = \frac{pf-pi}{pi} * 100 \quad (1)$$

**Donde:**

**R:** Porcentaje de rendimiento

**pf:** peso final después de obtener el extracto

**pi:** peso inicial

(Laboratorio Neofármaco, 2022)

### 2.2.3. Evaluación de los extractos empleando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La preparación de las muestras, estándares y validación de la metodología desarrollada se basó en las propuestas realizadas por el Laboratorio Neofármaco y UNODC (**Laboratorio Neofármaco, 2022**) (**United Nations Office on Drugs and Crime., 2020**).

#### 2.2.3.1. Preparación de muestras

Los extractos recuperados del rotavapor se colocaron en tubos de ensayo y se aforaron a 18 ml con etanol al 96%. Posterior se tomaron alícuotas de 0,1ml y 1 ml. La solución final se filtró con filtro jeringa de 0.22 micrones de PVDF y se colocó en viales de HPLC de 2 ml para posterior análisis (**Laboratorio Neofármaco, 2022**).

#### **2.2.3.2. Preparación del estándar de cannabiol (CBD) a 0,05 mg/ml**

Se pesó en una balanza analítica, 100 mg  $\pm$  0.1 mg de estándar de CBD blanco al 99% de pureza. Se transfirió la muestra pesada a un balón volumétrico de 10 ml, y se agregó metanol. A continuación, se tomaron alícuotas de 0.1 ml y 0.5 ml a un balón volumétrico de 10 ml y se aforó con metanol grado análisis. De la solución final se filtró con filtro jeringa de 0.22  $\mu$ m de PVDF y se colocó en viales de HPLC de 2ml para posterior análisis (**Križman, 2019**).

#### **2.2.3.3. Preparación del estándar de Uracilo o blanco**

Se transfirió 1ml del estándar de referencia de uracilo a un balón volumétrico de 10 ml, y se agregó metanol grado análisis. De la solución anterior se tomó 2 ml de estándar y se filtró con jeringa de 0.22  $\mu$ m de PVDF y colocó en viales de HPLC de 2ml (**Laboratorio Neofármaco, 2021**).

#### **2.2.3.4. Validación del método y adecuabilidad del sistema**

Para realizar la verificación del método de cuantificación de cannabidiol mediante HPLC se tomó parámetros como la linealidad, precisión, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), y se consideró las condiciones establecidas en la tabla 6.



**Tabla 6.** Condiciones de operación que se emplearán en el proyecto de investigación

<b>Condiciones de operación</b>	
Fase Estacionaria:	Columna LiChrospher ®100 Rp-8 250 mm x 4,4 mm y 5 µm de partícula
Fase Móvil:	(Acetonitrilo: Agua) / (80:20) isocrática
Flujo:	1 ml /min
Detector:	Matriz de fotodiodos (PDA) 220 nm y 240 nm
Volumen:	Muestra y estándar: 10 µl
Temperatura:	30 ° C
Tiempo de retención	8 minutos

### 2.2.3.5. Parámetros de linealidad

Se prepararon soluciones a 5 niveles (intervalos del 50%, 75%, 100%, 125%, 150%) del estándar blanco de CBD y posterior se aforo con metanol como se establece en la Tabla 7. Se obtuvo como respuesta picos (áreas) del cannabidiol para poder realizar una curva de calibración. Con esta información se determinó la ecuación de la recta y parámetros acordes a los criterios de aceptación.

**Tabla 7.** Condiciones de linealidad del sistema para el estándar de cannabidiol

<b>Linealidad del sistema</b>				
<b>Estándar</b>	<b>Diluciones</b>		<b>[ ]</b>	<b>[ ]</b>
	<b>Alícuota (ml)</b>	<b>Aforo (ml)</b>	<b>(mg/ml)</b>	<b>(%)</b>
Estándar cannabidiol (Concentración 0.05 mg/ml)	0,50	10	0.0250	50
	0,75	10	0.0375	75
	1,00	10	0.0500	100
	1,25	10	0.0625	125
	1,50	10	0.0750	150

### 2.2.3.6. Precisión (repetibilidad del sistema)

Se evaluó la precisión del sistema cromatográfico bajo la inyección sextuplicada del estándar de CBD a una concentración del 100% (0,05 mg/ml). Posterior se determinó los promedios del área cromatográfica y la concentración, así como de la desviación estándar para posterior cálculo del coeficiente de variación CV empleándose la ecuación 2.

$$CV = \frac{\text{Desviación estandar relativa}}{\text{promedio}} * 100 \quad (2)$$

(Laboratorio Neofarmaco, 2022)

### 2.2.3.7. Límite de detección y límite de cuantificación

Se prepararon soluciones a 5 niveles (intervalos del 50%, 75%, 100%, 125%, 150%) del estándar blanco de CBD para obtener como respuesta picos (áreas) del cannabidiol y concentración de CBD. Posterior se realizó una curva de calibración con los datos obtenidos y se determinó la desviación estándar y la pendiente. Utilizando las fórmulas 3 y 4 se obtuvo de forma visual los límites de detección y cuantificación respectivos para el CBD.

$$LOD = \frac{3.3 * S_{bl}}{S'} \quad (3)$$

**Donde:**

$S_{bl}$ : Desviación estándar para la curva de calibración o el error estándar del intercepto

$S'$ : Pendiente

$$LOQ = \frac{10 * S_{bl}}{S'} \quad (4)$$

**Donde:**

$S_{bl}$ : Desviación estándar para la curva de calibración o el error estándar del intercepto

$S'$ : Pendiente

(Laboratorio Neofarmaco, 2022)

### 2.2.3.8. Idoneidad del sistema

Se empleo el Software Clarity homologado al equipo HPLC y se inyecto por sextuplicado el estándar de CBD al 100% (0,05 mg/ml), considerándose un RSD < 2% para la evaluación de los siguientes parámetros USP: factor de capacidad, número de platos teóricos y factor de asimetría.

(Laboratorio Neofármaco, 2022)

### 2.2.3.9. Cuantificación de CBD en el extracto

La cuantificación de CBD mediante HPLC se realizó empleando la siguiente fórmula

$$M = \frac{\frac{AUC(m) * C_p}{AUC(p)} * FD}{1000} \quad (5)$$

**Donde:**

**M:** Masa de CBD en gramos

**C<sub>p</sub>:** Concentración del patrón (SR) expresada en mg/ml.

**AUC (m):** Área bajo la curva obtenida para la muestra.

**AUC (p):** Área bajo la curva obtenida para el patrón (SR).

**FD:** factor de dilución

(Laboratorio Neofármaco, 2021)

### 2.2.3.10. Análisis estadísticos

Para la cuantificación de CBD se incluyó un diseño experimental considerando los factores: tiempo, tipo de flor y la temperatura de maceración con un ANOVA multifactorial empleando el programa statgraphics al 95% de confianza

**Tabla 8.** Diseño experimental utilizado en el proyecto de investigación

	Especie trimiada		Especie no trimiada	
	Temperaturas de maceración (° C)			
tiempo				
maceración	25	-10	25	-10
(días)				
8				
16				
24				

**Fuente:** Autoría propia.

A su vez se empleará la prueba estadística de Tukey para comparación de diferentes grupos significativos de medias a partir de la cantidad de CBD obtenida.

## CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Análisis y discusión de los resultados

#### 3.1.1. Caracterización de flores en base a consideraciones de la farmacopea de los Estados Unidos (USP)

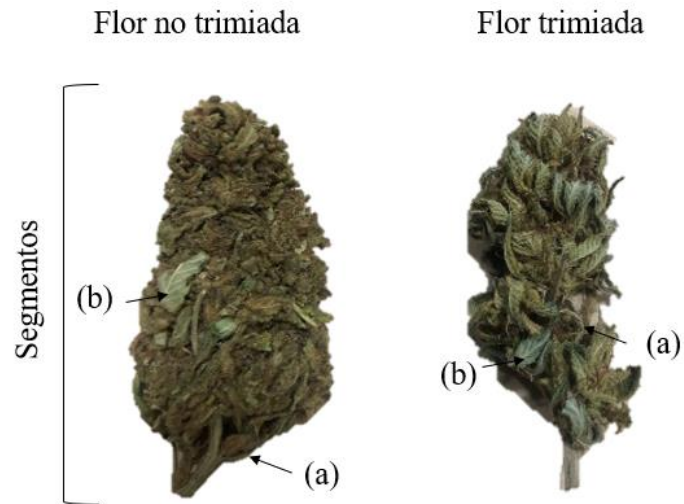
La caracterización sensorial y visual fue evaluada para ambos tipos de flores (trimiada y no trimiada) y se tomó en consideración los parámetros establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Se presentan los resultados en la tabla 9.

**Tabla 9.** Resultados obtenidos de la caracterización de las flores de *cannabis* en base a consideraciones USP.

Atributos organolépticos	Flor trimiada	Flor no trimiada	Consideración USP
Descripción	Cogollo recortado predominante en hojas, pocas brácteas	Cogollo no recortado abundante en brácteas, pocas hojas	Cumple
Color	Verde claro	Verde claro y marrón	
Aroma	Especiado fuerte y dulce	Especiado fuerte y dulce	

Los parámetros evaluados para dos tipos de flores de *cannabis* cumplen con las normativas establecidas para la USP. De esta forma los tipos trimiada y no trimiada difieren principalmente en la cantidad de hojas y brácteas presentes en los segmentos

de las inflorescencias, siendo este último predominante en flores no trimiadas. Esto en dependencia de la elección del cultivador a la hora de recortar los cogollos, y pequeñas porciones de las hojas y peciolo figura 7.



**Figura 7.** Tipos de podas en inflorescencias femeninas de *C. sativa*.

Observación de segmentos pistilados verdosos en diferentes tipos de flores con variables cantidades de hojas, tallos, brácteas y bractéolas. (a) brácteas, (b) hojas.

Ambas flores presentaron una coloración verdosa y marrón uniforme sin presencias de coloraciones negras o grises (indicadores de hongos). Si bien el color está determinado por la cepa de origen, este dependerá de los métodos de cosecha, cultivo y curado. A su vez estudios establecidos por **Jin et al., (2021)** indican que el color verde más claro será indicador de un cultivo dominante en CBD. Esto se correlaciona con estudios establecidos por **Hartsel, (2016)**, en donde se indica una categorización del olor para las flores de cannabis, mencionando que aquellas flores predominantes en CBD poseen un aroma más fuerte y dulce debido a la presencia de compuestos terpenoides. Sin embargo, aquellos que poseen aromas potencialmente más fuertes y terrosos contendrán mayores cantidades de THC, lo que fue descartado para este estudio.

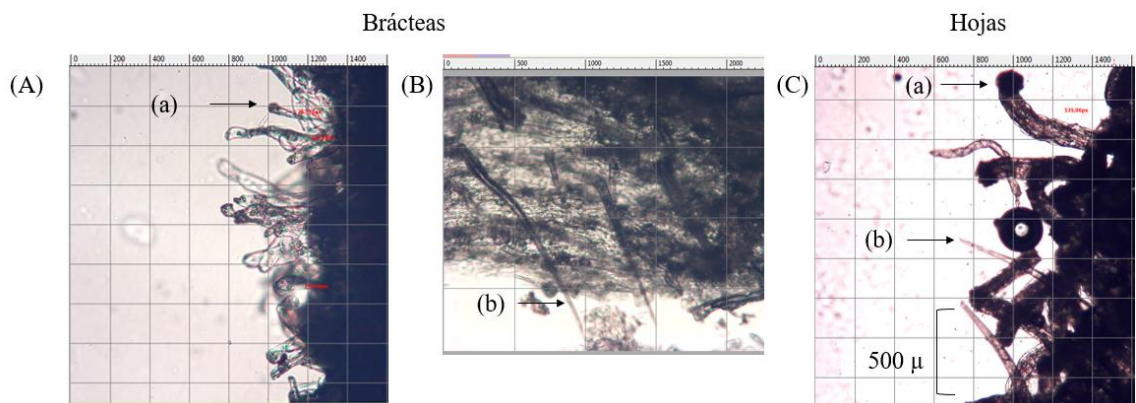
### 3.1.2. Parámetros fisicoquímicos de las flores

La caracterización fisicoquímica fue evaluada para ambos tipos de flores (trimiada y no trimiada) y se tomó en consideración los parámetros establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Se presentan los resultados en la tabla 10.

**Tabla 10.** Resultados obtenidos de la determinación de parámetros fisicoquímicos de las flores en base a consideraciones USP

Ensayos fisicoquímicos	Flor trimiada	Flor no trimiada	Consideración USP
Humedad %	14	14	
Tricomas glandulares	presente	presente	Cumple
Tricomas no glandulares cistólicos	presente	presente	

De esta forma se obtuvo una humedad de 14% a 105 °C en ambos tipos de flores, dichos valor corresponden a los establecidos por **Suntaxi, (2021)** en el cual la humedad oscila entre 10%-15% en plantas que se secan durante días hasta que las hojas estén quebradizas. Esto permitió que el proceso de secado detenga la degradación de los cannabinoides de interés y mejore la tasa de transferencia de masa entre el solvente y la muestra a la hora de su extracción.



**Figura 8.** Microscopia óptica de *C. sativa*, 10X

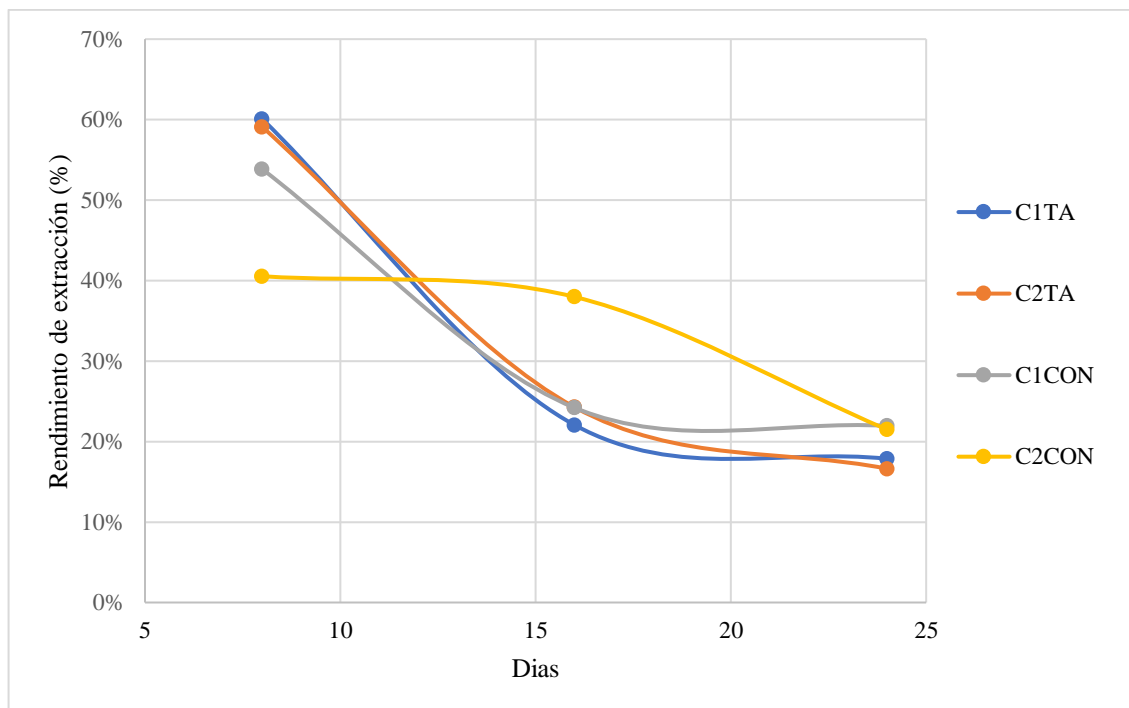
(A) Presencia de diferentes tipos de tricomas glandulares (a) en parte superficial de las brácteas; (B) Presencia de tricomas no glandulares (b) en la parte inferior de las brácteas; (C) Presencia de tricomas no glandulares y glandulares (a,b) en las hojas de la flor no trimiada.

Por otro lado, la presencia de tricomas varió significativamente. De esta forma aquellas flores no trimiadas con mayor cantidad de brácteas contendrá más tricomas y cannabinoides en la parte superficial o inferior de las mismas (figura 8). Por su parte, en las hojas se observó menor cantidad de tricomas de un tamaño aprox de 500  $\mu\text{m}$  al igual que en los tallos. No obstante, estudios realizados por **United Nations Office on Drugs and Crime., (2020)** establecieron que la presencia simultanea de los tricomas no glandulares, sistólicos y glandulares sésiles a lo largo de la superficie superior e inferior de las hojas y brácteas son características únicas y representativas de *C. sativa*.

### 3.1.3. Evaluación de los rendimientos de extracción de dos tipos de flores de *C. sativa*

Durante las 3 maceraciones consecutivas se midió el comportamiento de extracción, obteniéndose los resultados denotados en la figura 9





**Figura 9.** Gráfica del comportamiento de extracción para dos tipos de flores de cannabis empleando un método de maceración exhaustiva.

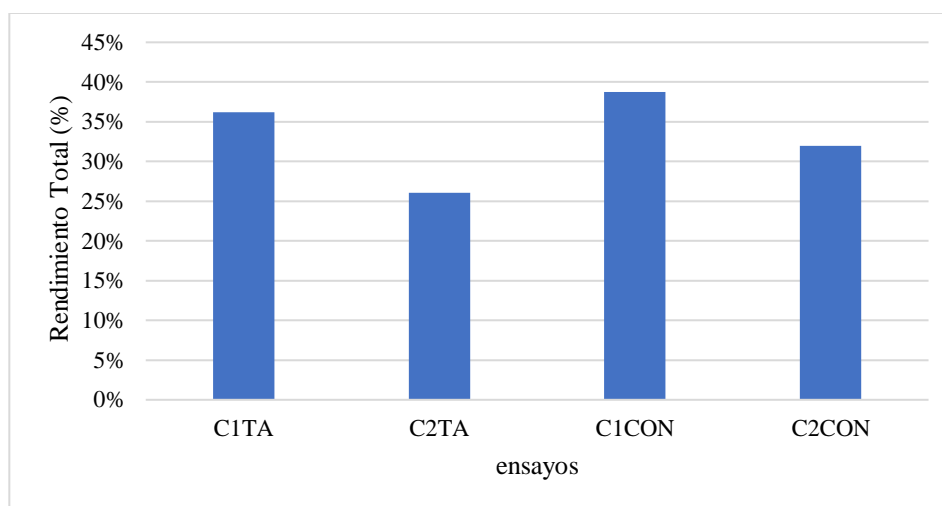
Comportamiento de extracción durante 24 días en: C1TA: Flor no trimiada a 25 °C; C2TA: Flor trimiada a 25 °C; C1CON: Flor no trimiada a -10 °C y C2CON: Flor trimiada a -10 °C.

El proceso de extracción realizado por un lapso de 8 a 24 días empleando 25 gramos de *C. sativa* mostro una disminución de rendimiento a medida que aumentan los días, y el número de maceraciones. Es decir, al día 24 se obtuvo la mitad de rendimiento que al día 8. Según **Ibáñez, (2021)** el cannabidiol se disuelve cada vez que se añade un disolvente nuevo dado la alta solubilidad del cannabidiol por el etanol, por lo tanto, se deja una menor cantidad del mismo en cada nueva maceración.

Al considerar el proceso de extracción durante 8 días empleando material vegetal: etanol (6:1) se obtuvo un rendimiento similar 60,096 % y 59,110 % entre flor no trimiada y trimiada a temperatura ambiente (C1TA y C2TA) respectivamente. Sin embargo, con el tiempo el rendimiento de ambos ensayos disminuye considerablemente. El comportamiento de extracción por 24 días mostró que las flores no trimiadas a congelación (C1CON) proporcionaron un mayor rendimiento de 21,946 % a comparación de los demás ensayos. Esto debido a una mayor presencia de tricomas en las flores, así como una menor temperatura de extracción -10°C, según **Paipa & Ruda, (2022)** durante la congelación existe una modificación ventajosa de

extracción dada una mayor solubilidad del etanol hacia una amplia variedad de compuestos cannabinoides y terpenoides.

Además, se evaluó el rendimiento conjunto de las tres maceraciones por cada condición de extracción obteniéndose los siguientes resultados (figura 10).



**Figura 10.** Gráfica del rendimiento total para dos tipos de flores de cannabis empleando un método de maceración exhaustiva

Diagrama de barras con rendimiento total de extracción en: C1TA: Flor no trimiada a 25 °C; C2TA: Flor trimiada a 25 °C; C1CON: Flor no trimiada a -10 °C y C2CON: Flor trimiada a -10 °C.

El rendimiento de extracción conjunto de 3 maceraciones durante 24 días mostro un valor de 38,761% para la flor no trimiada a congelación (C1CON). Este resultado es superior al rendimiento de 36,196 % proporcionado por la flor no trimiada a temperatura ambiente (C1TA). A diferencia del empleo de flores trimiadas que presentaron rendimientos del 26 % y 32% a temperatura ambiente y congelación respectivamente. Demostrando así que el proceso exhaustivo empleando 25 gramos de *C. sativa* extrae compuestos cannabinoides hasta por 24 días en flores con mayor contenido de tricomas (flores no trimiadas) (**Prospiant, 2021**)..

Los resultados obtenidos de las tres maceraciones conjuntas superan a los establecidos por **Alba & Minchala, (2022)**; **Suntaxi, (2021)** con rendimientos de 13,070% y 8,870% respectivamente. En donde se emplearon procesos de extracción con etanol y extracción por fluido supercrítico CO<sub>2</sub> respectivamente.

Considerando que los rendimientos dependieron en gran parte del solvente, así como la temperatura de extracción **Attard et al., (2018)** establecieron que los extractos deben someterse a temperaturas de extracción más bajas, ya que el CBD muestra una mayor solubilidad a estas temperaturas y se logra menor extracción de compuestos secundarios como clorofilas, triglicéridos y ceras.

### 3.1.4. Linealidad del sistema y criterios de aceptación

La validación del método incluyó los principales parámetros establecidos por La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), así como parámetros de La Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH). Para la linealidad se establecieron criterios de aceptación denotados en la tabla 11.

**Tabla 11.** Criterios de aceptación obtenidos de la linealidad del sistema del estándar de cannabidiol

Parámetros	Criterios de aceptación	Resultado	Decisión
Coefficiente de correlación	$R^2 \geq 0,999$	0,999	
Pendiente	Correlación lineal significativa $b \neq 0$	9192,34	
Intercepto u ordenada origen	Comprobación que la recta pasa por el origen	-3,462	Cumple
Regresión lineal	La regresión es estadísticamente representativa, la pendiente es distinta de 0	$AUC = -3,462 + 9192,34 * \text{cantidad}$	

Una vez obtenidos los criterios de aceptación para la linealidad se analizó la curva de calibración de cinco puntos a partir de la concentración del 0,05 mg/ml (Anexo C). En donde se presentó valores muy cercanos y poco dispersos en un rango de concentraciones de 0,025 a 0,0750 mg/ml del principio activo.

Acorde a los criterios AEFI se obtuvo valores dentro de rango para el coeficiente de correlación de varianzas para el estándar de CBD con un valor de 0,999238, indicando que el método es lineal además de que se obtuvo una relación proporcional entre variables  $x$  (concentración de CBD) y variable  $y$  (área del pico respuesta AUC).

A continuación, los valores analizados para la regresión lineal (Anexo D) demuestran la relación entre las variables de estudio al ser estadísticamente representativas y lineales obteniéndose una pendiente 9192,33. Además, la sensibilidad del método fue proporcional a una mayor pendiente es decir la relación del método frente a posibles cambios que se presenten en la concentración del analito.

Por otro lado, se obtuvo un intercepto de -3,46264 indicando la posibilidad de un error sistemático al no pasar por el origen y ser diferente de cero.

Los valores obtenidos de la linealidad se asemejan a estudios establecidos por **Deville et al., (2020)** que a diferencia de este estudio emplearon una curva patrón de seis concentraciones (0,125 - 5,000 %) a partir del estándar de 12,5 mg/ml, obteniéndose un  $R^2 \geq 0,999$ . Indicando una adecuada linealidad para el sistema empleando una mayor cantidad de intervalos de trabajo.

### **3.1.5. Precisión (repetibilidad del sistema)**

Para la precisión del método se evaluó la repetibilidad del sistema bajo el análisis sextuplicado del estándar de CBD a 0,05 mg/ml, mediante el equipo HPLC considerando las mismas condiciones operativas. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 12

**Tabla 12.** Criterios de aceptación obtenidos de la repetibilidad del sistema empleando un estándar de cannabidiol

<b>Muestras</b>	<b>Cantidad (mg)</b>	<b>Respuesta AUC (mV.s)</b>	<b>Decisión</b>
1	0,050	407,509	
2	0,050	407,984	
3	0,050	407,814	
4	0,050	407,529	
5	0,050	407,914	Cumple
6	0,050	407,344	
Promedio	0,050	407,682	
Desviación relativa	0,000	0,257	
CV ≤ 2%	0,000	0,063	

Para la repetibilidad del sistema se obtuvo un coeficiente de variación de 0,063 para el área cromatográfica AUC. Este valor es inferior al 2% aceptable en el laboratorio Neofármaco, lo que demuestra que el método cumple con los criterios establecidos para el sistema y no existe variabilidad en las condiciones cromatográficas.

Los resultados obtenidos muestran un valor más preciso al obtenido por **Analakkattillam et al., (2022)**, en el cual se obtuvo un coeficiente de variación de 0,230 para la repetibilidad del sistema, esto debido a una gran variabilidad del área de la curva respuesta (AUC) al emplear una concentración de 10 µg/ml del estándar de CBD. Esto es de esperarse por el sesgo que se presenta durante todo el proceso de la validación.

### **3.1.6. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)**

De los resultados previos de la regresión simple evaluada para la linealidad se consideró los valores estadísticos del error estándar del intercepto, así como la pendiente, obteniéndose los resultados presentados en la tabla 13.

**Tabla 13.** Resultados obtenidos del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del cannabidiol

<b>Muestras</b>	<b>Cantidad (mg)</b>	<b>Respuesta AUC (mV.s)</b>	<b>Decisión</b>
1	0,025	253,116	
2	0,0375	334,144	
3	0,050	449,469	
4	0,0625	570,664	
5	0,075	691,377	
Pendiente	9192,34	9192,34	Cumple
Promedio	0,050	459,754	
Error estándar del intercepto	10,997	10,997	
LOD	0,000	0,004	
LOQ	0,010	0,012	

Se obtuvo valores de 0,004 mg/ml y 0,012 mg/ml para la mínima concentración instrumental detectable (LOD) y mínima concentración instrumental cuantificable (LOQ) respectivamente. Dichos parámetros se encuentran dentro de las relaciones previamente establecidas en referencia a una relación señal/ruido de 10:1 para LOQ y señal/ruido de 3:1 para el LOD (**Citti et al., 2016a**).

Además, en base a los cálculos realizados el método fue sensible y se relaciona con los establecidos por **Guerra, (2018)** para el CBD con valores de 0,005 mg/ml y de 0,014 mg/ml para el LOD y LOQ respectivamente. No obstante, resulta ideal demostrar que a dichos valores se puedan detectar el analito de forma experimental empleando HPLC para detección de dichas concentraciones. Esto con el fin de obtener una mayor interpretación estadística de los datos.

### 3.1.7. Idoneidad del sistema

De la inyección de los estándares por sextuplicado se evaluaron los parámetros empleando el software clarity obteniéndose los siguientes resultados de la tabla 14.

**Tabla 14.** Criterios de aceptación obtenidos de la idoneidad del sistema (System Situability)

Parámetros	Criterios de aceptación	Valor promedio para el CBD	%RSD	Decisión
Factor de capacidad	Tiempo de retención (min)	2,610	0,070	Cumple
Número de platos teóricos	$n > 1000$	1665,811	0,850	
Factor de asimetría	asimetría	2,014	1,270	

La idoneidad mostró un adecuado estado del sistema cromatográfico considerando criterios USP al mostrar un coeficiente de variación menor a 2% para cada parámetro. De esta forma el tiempo de retención para el CBD fue de 2,610 min en dependencia de la fase móvil, ya que el empleo de compuestos polares como acetonitrilo y agua (80:20) en fase reversa permitió la elución del CBD en menor tiempo dado su mayor solubilidad por la fase móvil. Así mismo el empleo de una Columna LiChrospher®100 Rp-8 250 mm x 4,4 mm y 5 µm de partícula de menor longitud permitió la elución del CBD en un menor tiempo. Los valores obtenidos concuerdan con los establecidos por **Sandiego Villaverde, (2020)** para identificación de cannabinoides en un menor tiempo y mayor eficiencia de análisis.

Por otro lado, la obtención de platos teóricos de 1665,811 indico una gran eficacia de la columna y su adecuado poder separativo, ya que se observó bandas de elución acordes a lo establecido para la idoneidad del sistema. De igual forma el factor asimétrico indico una señal precisa de detección desde el inicio del pico hasta el final con una formación característica en forma gaussiana para los seis picos cromatográficos con una simetría de 2,014, y un CV de 1,270%. Resultados similares a los establecidos por **Zivovinovic et al., (2018)**, al presentar un % CV de 1,2 empleando una columna Kinetex XB-C18 con agua y acetonitrilo.

**3.1.8. Evaluación de factores (tiempo de maceración, tipo de flor y temperatura) en la cuantificación de CBD**

La cuantificación de CBD, empleó una prueba estadística ANOVA que determinó la incidencia de los factores tiempo de maceración, tipo de flor y temperatura, en su concentración final. Para lo cual se empleó maceraciones de flores trimiadas y no trimiadas a – 10 °C y a 25 °C. La cantidad de CBD obtenida se muestra en la tabla 15.

**Tabla 15.** Cantidad de CBD obtenida en el extracto mediante el equipo HPLC

<b>Tipo de flor</b>	<b>Tiempo de maceraciones (días)</b>	<b>Temperatura de extracción</b>	<b>Cantidad de CBD en el extracto (g)</b>
Flor no trimiada	8	25	1,209 ±0,040 <sup>A</sup>
	16		0,464 ±0,003 <sup>A</sup>
	24		0,383 ±0,001 <sup>A</sup>
	Total: 2,056		
	8	-10	1,226 ±0,049 <sup>A</sup>
	16		0,505 ±0,003 <sup>A</sup>
24	0,334 ±0,000 <sup>A</sup>		
Total: 2,101			
Flor trimiada	8	25	0,718 ±0,058 <sup>B</sup>
	16		0,235 ±0,000 <sup>B</sup>
	24		0,087 ±0,002 <sup>B</sup>
	Total: 1,040		
	8	-10	0,772 ±0,009 <sup>B</sup>
	16		0,230 ±0,000 <sup>B</sup>
24	0,140 ±0,000 <sup>B</sup>		
Total: 1,142			



*Nota* se presenta la cantidad de CBD (g). Los valores representan la desviación estándar respecto a la media. Los superíndices con letras mayúsculas (A, B) corresponden a los niveles de significancia según la prueba de Tukey.

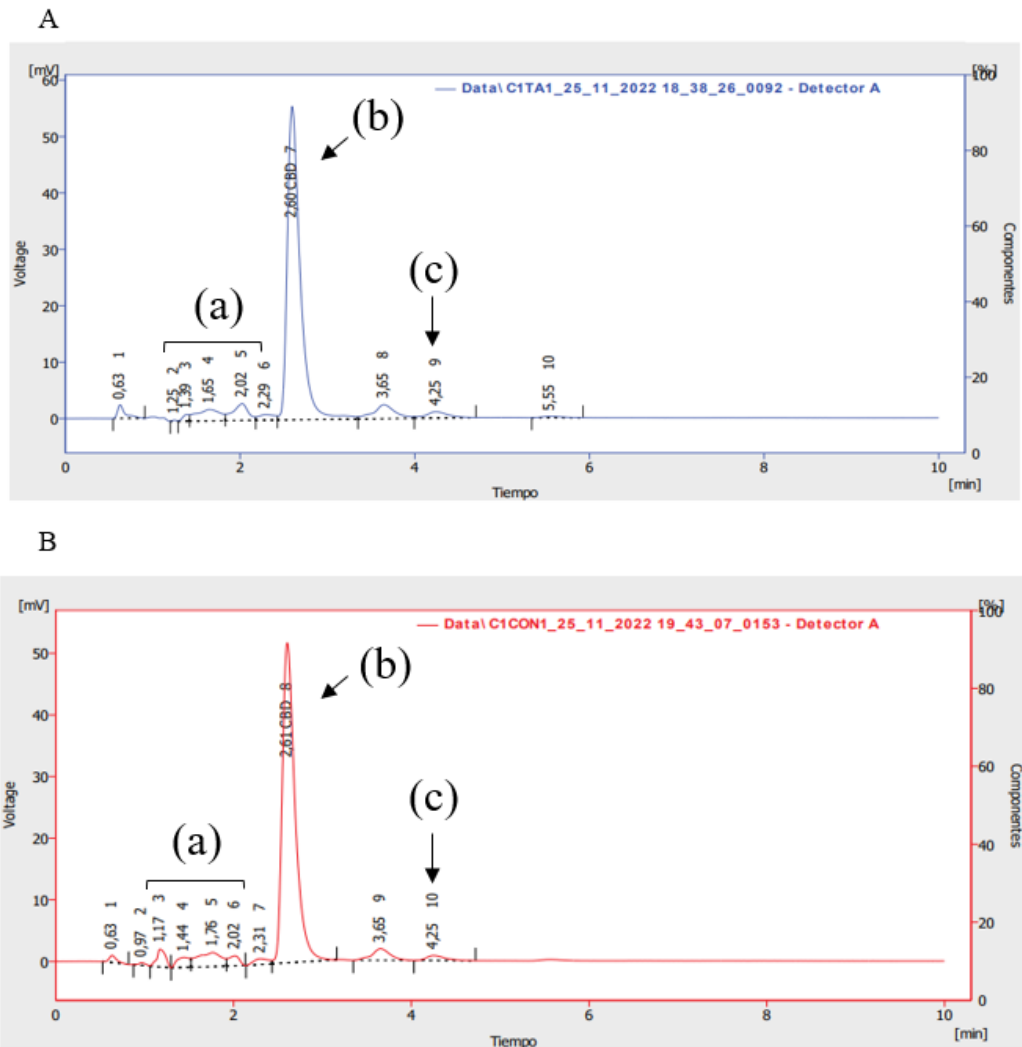
La maceración con etanol a demostrado ser una técnica sencilla, y de bajo rendimiento en cuanto a la extracción de CBD. Sin embargo, su uso extendido hasta por 24 días facilitó la obtención de mayores cantidades de CBD. De esta manera al complementarlo con procesos de congelación y etanol al 96% como solvente se obtuvo una mayor extracción de cannabinoides de interés.

Una vez realizado el análisis de varianzas de medias ANOVA (Anexo E, F) se evidencio que la cantidad de CBD es dependiente del tipo de flor ( $P < 0.05$ ). Esto se complementa con la prueba de Tukey en la cual se obtuvo dos niveles de significancia para el tipo de flor no trimiada (A) y flor trimiada (B) ya sea a congelación o a temperatura ambiente.

La cuantificación de CBD a los 8 días de extracción mostro valores similares de  $1,209 \pm 0,040$  g y  $1,198 \pm 0,049$  g para las flores no trimiadas a temperatura ambiente y congelación respectivamente. A su vez, la cantidad de CBD para ambas especies disminuyo considerablemente en el tiempo ya que la máxima cantidad de CBD se extrae en la primera maceración y disminuye en la segunda y tercera maceración al agregar nuevo solvente en cada maceración. Por lo que resulto ideal considerar la cantidad total de CBD durante los 24 días mostrando una cantidad similar de CBD de 2,101g y 2,056 g para la flor no trimiada a congelación y temperatura ambiente respectivamente.

Para ambos casos la cantidad de CBD obtenida fue superior a la establecida por **Brighenti et al., (2017)** de  $2,9 \pm 0,1$  mg/g de CBD empleando un método de maceración dinámica con 10 ml de etanol y 0,25 g de cannabis por 45 min.

Al obtenerse similar cantidad de CBD, se evaluó los cromatogramas de la (figura 11 y Anexo E), obtenidos para la flor no trimiada a temperatura ambiente y congelación, para analizar si se dio la adecuada transformación de los cannabinoides ácidos a neutros.



**Figura 11.** Cromatogramas de muestras de CBD en extractos etanolicos.

(A) Cromatograma de la muestra a temperatura ambiente de CBD a 280 nm, con una concentración de 0,05 mg/ml; tiempo de retención corresponde a 2,60 min. (B) Cromatograma de la muestra a congelación de CBD a 280 nm, con una concentración de 0,05 mg/ml; tiempo de retención corresponde a 2,60 min. (a) ácidos cannabinoicos; (b) CBD; (c) THC.

Los picos obtenidos en el apartado a correspondiente al proceso de congelación indicaron una mayor presencia de ácidos cannabinoicos que no muestran una correcta asimetría y resolución. Alrededor de 6 picos mostrados en este apartado evidenciaron que ocurrió una deficiente transformación de compuestos ácidos (CBDA, THCA) en sus homólogos neutros como el CBD y THC. El pico 4 y 5 en la figura A y B respectivamente, corresponden a la presencia de CBDA que obtuvo un AUC superior en el proceso de congelación, demostrando que bajo un adecuado rango de descarboxilación se pudo obtener una mayor cantidad de CBD. En base a esto

**Casiraghi et al., (2022)** sugirieron considerar un mayor rango de variación de temperaturas (110°C-140°C) y tiempos de descarboxilación (30 min – 150 min) ya sea en el extracto o sobre el material vegetal para una transformación completa del CBDA en CBD.

A comparación de este estudio. **Patel et al., (2017)** emplearon una columna C18 (3,0 × 75 mm DI x 2,7 µm tamaño de partícula) y una fase móvil con acetato de amonio 25 mM ajustado a pH 4,75 con ácido acético para una mejor observación de todos los picos de los cannabinoides ácidos a partir de un tiempo de retención de 5,54 min. Esto resulta ideal para elucidar completamente todos los compuestos cannabinoides existentes.

Así mismo, los estudios de **López-Olmos et al., (2022)** consideraron una temperatura de extracción menor entre 5 °C y - 80 °C durante el proceso de maceración para obtención de una mayor solubilidad del etanol por el CBD y menor retención de terpenos, ceras, grasas y clorofilas que interfieren en el proceso de extracción por maceración. Considerando todo lo anterior el proceso de congelación y descarboxilación en la flor no trimiada en rangos adecuados sugirió una máxima extracción de CBD.

### **3.2.Verificación de la hipótesis**

A partir de los datos obtenidos el tipo de flor afecta la cantidad de cannabidiol, por lo tanto, existe una relación estadísticamente significativa entre la flor no trimiada y trimiada. La flor no trimiada a congelación de -10°C presento una mayor cantidad de tricomas en sus brácteas por ende su cantidad de CBD fue superior a la flor trimiada, esto fue evidente después del proceso de maceración empleando 25 gramos de *C. sativa* con 165 ml de etanol al 96% durante 24 días.

## CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1.Conclusiones

- Se desarrolló un método de extracción de CBD empleando dos tipos de flores de *C. sativa* basadas en la forma de poda bajo el cumplimiento de parámetros de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Ambas flores presentaron adecuadas características fisicoquímicas (humedad, tricomas) y características organolépticas (color, aroma). Sin embargo, las flores no trimiadas con mayor cantidad brácteas y por ende de tricomas presentaron un mayor rendimiento de extracción y similar cantidad de CBD posterior a 3 maceraciones realizadas empleando 25 g de material vegetal y 165 ml de etanol al 96% (1: 6) a temperaturas de -10 °C y 25 °C durante 24 días
- Las características organolépticas para la flor trimiada y no trimiada cumplieron con parámetros USP. Ambas presentaron variables cantidades de hojas y brácteas en sus segmentos. Además, se caracterizaron por un color verde uniforme con tintes marrones y representativos de un cultivo predominante de CBD al igual que un olor dulce, espaciado y fuerte el cual es proporcional a los terpenoides que incluyeron en su estructura química. Con respecto a parámetros fisicoquímicos ambas flores cumplieron con una humedad del 14% así como presencia de tricomas glandulares, y no glandulares en la parte superior e inferior de las brácteas y hojas.
- El comportamiento de extracción de la flor no trimiada disminuyó considerablemente después de 24 días de someterse a congelación, sin embargo, durante ese tiempo la flor obtuvo un porcentaje del 21,946 % indicando que aun fue posible la extracción de CBD de *C. sativa*. De igual forma el rendimiento de extracción total de este tipo mostro un rendimiento considerable de 38,761 % empleando una relación material vegetal y solvente (1: 6). Esto debido a que se alcanza la máxima disolución de los tricomas en el solvente de etanol sometido a congelación dada la máxima polaridad y afinidad del solvente por compuestos cannabinoides y terpenos.

- Se validó el método de extracción de CBD por HPLC demostrando una correcta linealidad, precisión (repetibilidad), límite de cuantificación y detección e idoneidad en cuanto al cumplimiento de parámetros USP con valores dentro de rango para el estándar de CBD. Una vez validado el método se procedió a la cuantificación de CBD, en donde la prueba estadística ANOVA mostró similar cantidad de CBD en la flor no trimiada con valores de 2,101 g y 2,056 g bajo congelación y temperatura ambiente respectivamente durante 24 días de maceración. Sin embargo, el uso del tipo no trimiado a congelación resulto ideal al considerar un mayor rango de temperaturas de descarboxilación y maceración durante su extracción.

#### **4.2.Recomendaciones**

- Caracterizar los diferentes segmentos (brácteas, tallos y hojas) de *C. sativa* empleando microscopía electrónica de barrido (SEM) para lograr una mejor visualización y caracterización del tamaño de los diferentes tipos de tricomas.
- Hacer un seguimiento de la planta en cuanto a mayor control de los parámetros de calidad incluyendo las condiciones de cultivo, secado post- cosecha, análisis de microorganismos patógenos y aflatoxinas en las flores y en el extracto.
- Modificar las condiciones de extracción estableciendo mayores rangos de temperatura y tiempos considerando procesos de winterización, congelación criogénica y filtración con carbón activado adecuados para una mayor obtención y pureza del cannabidiol en el extracto.
- Realizar una validación completa del método considerando parámetros como la robustez, selectividad y exactitud del estándar de CBD de modo que se pueda evaluar y ampliar las condiciones operativas del equipo HPLC.

## MATERIALES DE REFERENCIAS

### Referencias bibliográficas

- AEFI. (2020). *Validación de Métodos Analíticos, generalidades, materias primas y especialidades farmacéuticas.*
- Al Ubeed, H. M. S., Bhuyan, D. J., Alsherbiny, M. A., Basu, A., & Vuong, Q. V. (2022). A Comprehensive Review on the Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Cannabis. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 604, 27(3), 604. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27030604>
- Alba, M., & Minchala, L. (2022). *Extracción de aceite esencial de Cannabis sativa L. utilizando dos técnicas de laboratorio, determinando el método más eficiente.*
- Analakkattillam, S., Langsi, V. K., Hanrahan, J. P., & Moore, E. (2022). Analytical method validation for assay determination of cannabidiol and tetrahydrocannabinol in hemp oil infused products by RP-HPLC. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13737-6>
- ARCSA. (2021a). regulación y control productos consumo humano que contenga cannabis. *agencia nacional de regulación, control y vigilancia sanitaria.* [www.lexis.com.ec](http://www.lexis.com.ec)
- ARCSA. (2021b). Regulación y control productos consumo humano que contengan cannabis. *agencia nacional de regulación, control y vigilancia sanitaria.* [www.lexis.com.ec](http://www.lexis.com.ec)
- Attard, T. M., Bainier, C., Reinaud, M., Lanot, A., McQueen-Mason, S. J., & Hunt, A. J. (2018). Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and Cannabidiol (CBD) from hemp wastes. *Industrial Crops and Products*, 112, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.045>
- Barros, L. (2021). *Calificación de diseño, instalación, operación y desempeño del sistema de generación, almacenamiento y distribución de aire comprimido en el laboratorio Neorfármaco del Ecuador Neorfármaco Cía. Ltda.*
- Baswan, S. M., Klosner, A. E., Glynn, K., Rajgopal, A., Malik, K., Yim, S., & Stern, N. (2020). *Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) for Skin Health and Disorders.* <https://doi.org/10.2147/CCID.S286411>

- Brighenti, V., Pellati, F., Steinbach, M., Maran, D., & Benvenuti, S. (2017). Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *143*, 228–236. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.05.049>
- Casiraghi, A., Gentile, A., Selmin, F., Gennari, C. G. M., Casagni, E., Roda, G., Pallotti, G., Rovellini, P., & Minghetti, P. (2022). Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from *Cannabis Sativa* for Medicinal Purpose. *Pharmaceutics* *2022*, Vol. 14, Page 2718, *14*(12), 2718. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14122718>
- Citti, C., Ciccarella, G., Braghiroli, D., Parenti, C., Vandelli, M. A., & Cannazza, G. (2016a). Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *128*, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.033>
- Crocq, M. A. (2022). History of cannabis and the endocannabinoid system. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/Mcrocq>, *22*(3), 223–228. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/MCROCQ>
- De Vita, D., Madia, V. N., Tudino, V., Saccoliti, F., De Leo, A., Messori, A., Roscilli, P., Botto, A., Pindinello, I., Santilli, G., Scipione, L., Costi, R., & Di Santo, R. (2020). Comparison of different methods for the extraction of cannabinoids from cannabis. *Natural Product Research*, *34*(20), 2952–2958. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1601194>
- Deville, M., Dubois, N., Denooz, R., & Charlier, C. (2020). Validation of an UHPLC/DAD method for the determination of cannabinoids in seized materials: Analysis of 213 samples sold in Belgian CBD shops. *Forensic Science International*, *310*. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110234>
- EMCDDA. (2018). *Uso médico del cannabis y los cannabinoides*.
- Fiallos, M. (2018). *Desarrollo y validación del método analítico para la determinación del marcador fitoquímico del extracto de *aristeguetia glutinosa lam*, utilizado en el producto ñatico*.
- Guerra, C. (2018). *Validación de un método analítico por cromatografía gaseosa para la cuantificación de cannabinoides*.

- Hartsel, J. A., Eades, J., Hickory, B., & Makriyannis, A. (2016). Cannabis sativa and Hemp. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, 735–754. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X>
- Hernandez, I. (2007). *Validación de un método analítico por HPLC para la cuantificación de RA 8 BS en una forma farmacéutica.*
- Ibáñez, P. (2021). *Estudio para la determinación de cannabidiol (CBD). Aplicación a su determinación en plantas de cannabis.*
- Jin, D., Henry, P., Shan, J., & Chen, J. (2021). Identification of phenotypic characteristics in three chemotype categories in the genus cannabis. *HortScience*, 56(4), 481–490. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15607-20>
- Križman, M. (2019b). A simplified approach for isocratic HPLC analysis of cannabinoids by fine tuning chromatographic selectivity. *European Food Research and Technology* 2019 246:2, 246(2), 315–322. <https://doi.org/10.1007/S00217-019-03344-7>
- Laboratorio Neofármaco. (2021). *IA-CC-082-004 Metodología Analítica del extracto concentrado de matico.*
- Laboratorio Neofármaco. (2022). *IA-CC-082-004 Metodología Analítica del extracto de matico.*
- Lewis-Bakker, M. M., Yang, Y., Vyawahare, R., & Kotra, L. P. (2019b). Extractions of Medical Cannabis Cultivars and the Role of Decarboxylation in Optimal Receptor Responses. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 4(3), 183–194. <https://doi.org/10.1089/CAN.2018.0067>
- López-Olmos, C., García-Valverde, M. T., Hidalgo, J., Ferrerio-Vera, C., & Sánchez de Medina, V. (2022). Comprehensive comparison of industrial cannabinoid extraction techniques: Evaluation of the most relevant patents and studies at pilot scale. *Frontiers in Natural Products*, 1. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2022.1043147>
- Maayah, Z. H., Takahara, S., Ferdaoussi, M., & Dyck, J. R. B. (2020). The molecular mechanisms that underpin the biological benefits of full-spectrum cannabis extract in the treatment of neuropathic pain and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1866(7). <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165771>
- MAG. (2022). *Acuerdo ministerial 141.* <https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/2020/12/Acuerdo-Ministerial-No.-141.-Tarifario-Canamo.pdf>



- Ministerio de salud pública. (2021). *Reglamento para el uso terapéutico del cannabis medicinal*. 15. [www.lexis.com.ec](http://www.lexis.com.ec)
- Monton, C., Madaka, F., Settharaksa, S., Wunnakup, T., Suksaeree, J., & Songsak, T. (2019). Optimal condition of cannabis maceration to obtain the high cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol content. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(3). <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190676>
- Nikam, N., Maru, A., Jadhav, A., Malpure, P., & Professor, A. (2019). International Journal of Trend in Scientific Research and Development (IJTSRD) Analytical Method Development and Validation of Metformin Hydrochloride by using RP-HPLC with ICH Guidelines the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0). In *International Journal of Trend in Scientific Research and Development (ijtsrd)* (Issue 3). <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>
- Nuapia, Y., Tutu, H., Chimuka, L., & Cukrowska, E. (2020). Selective extraction of cannabinoid compounds from cannabis seed using pressurized hot water extraction. *Molecules*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25061335>
- Paipa, C., & Ruda, N. (2022). *Modelamiento y simulación del proceso de extracción de cannabinoides con CO2 supercrítico como solvente y etanol como co-solvente mediante el uso herramientas de cómputo*.
- Patel, B., Wene, D., & Fan, Z. (Tina). (2017). Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.021>
- Prospiant. (2021). *5 razones por las que el etanol es ideal para la extracción de cannabis*.
- Russo, E. B., & Marcu, J. (2017). Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 80, 67–134. <https://doi.org/10.1016/BS.APHA.2017.03.004>
- Sandiego Villaverde, P. (2020). *Técnicas de extracción y caracterización de cannabinoides a partir de la planta de cannabis sativa L.* <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/154558>
- Sarma, N. D., Waye, A., Elsohly, M. A., Brown, P. N., Elzinga, S., Johnson, H. E., Marles, R. J., Melanson, J. E., Russo, E., Deyton, L., Hudalla, C., Vrdoljak, G. A., Wurzer, J. H., Khan, I. A., Kim, N. C., & Giancaspro, G. I. (2020b). Cannabis Inflorescence for Medical

Purposes: USP Considerations for Quality Attributes. *Journal of Natural Products*, 83(4), 1334–1351. [https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.9B01200/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NP9B01200\\_M005.GIF](https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.9B01200/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NP9B01200_M005.GIF)

Shannon, S., & Opila-Lehman, J. (2016). Effectiveness of Cannabidiol Oil for Pediatric Anxiety and Insomnia as Part of Posttraumatic Stress Disorder: A Case Report. *The Permanente Journal*, 20(4), 108–111. <https://doi.org/10.7812/TPP/16-005>

Spitzer-Rimon, B., Duchin, S., Bernstein, N., & Kamenetsky, R. (2019). Architecture and Florogenesis in Female Cannabis sativa Plants. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00350>

Sridhar, K., Usmani, Z., Xia, X., Chandra Das, P., Roger Vista, A., Tabil, L. G., & Baik, O.-D. (2022). Postharvest Operations of Cannabis and Their Effect on Cannabinoid Content: A Review. *Bioengineering* 2022, Vol. 9, Page 364, 9(8), 364. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING9080364>

Sun, D. M., Song, L., Wang, H. Y., Yu, C. C., Chu, Q., Lan, T., & Zhang, W. B. (2021). Establishment of Detection Methods for Five Cannabinoids in Hemp Cosmetics Based on HPLC. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 37(12), 1821–1824. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.21P158>

Suntaxi, S. (2021). *Obtención de aceite de cannabidiol a partir de flor de cannabis no psicoactivo para uso medicina.*

Szalata, M., Dreger, M., Zielińska, A., Banach, J., Szalata, M., & Wielgus, K. (2022). Simple Extraction of Cannabinoids from Female Inflorescences of Hemp (Cannabis sativa L.). *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 5868, 27(18), 5868. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27185868>

United Nations Office on Drugs and Crime. (2020). *Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis : manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes.*

USP. (2022a). *General Chapters: <565> BOTANICAL EXTRACTS.* [http://www.uspbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0\\_c565.html](http://www.uspbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0_c565.html)

Uziel, A., Gelfand, A., Amsalem, K., Berman, P., Lewitus, G. M., Meiri, D., & Lewitus, D. Y. (2020). Full-Spectrum Cannabis Extract Microdepots Support Controlled Release of Multiple Phytocannabinoids for Extended Therapeutic Effect. *ACS Applied Materials*

and *Interfaces*, 12(21), 23707–23716.  
[https://doi.org/10.1021/ACSAMI.0C04435/SUPPL\\_FILE/AM0C04435\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACSAMI.0C04435/SUPPL_FILE/AM0C04435_SI_001.PDF)

World Health Organization. (1998a). *Quality control methods for medicinal plant materials*.  
World Health Organization.

World Health Organization. (1998b). *Supporting Information Cannabis Inflorescence for  
Medical Purposes-USP Considerations for Quality Attributes*.



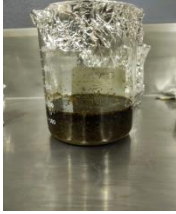









Zhou, Z., Paine, M. F., Spindle, T. R., Huang, S., & Zhang, L. (2022). Cannabis for Medical  
Use: Clinical Pharmacology Perspectives on Scientific and Regulatory Challenges.  
*Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 111(4), 732–735.  
<https://doi.org/10.1002/cpt.2470>

Zivovinovic, S., Alder, R., Allenspach, M. D., & Steuer, C. (2018). Determination of  
cannabinoids in *Cannabis sativa* L. samples for recreational, medical, and forensic  
purposes by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of  
Analytical Science and Technology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0159-8>

## ANEXOS

### Anexo A. Macerados de *C. sativa* durante 24 días

**Tabla 16.** Macerados de etanol a diferentes condiciones material vegetal: solvente (1:6) durante 24 días

Ensayo	(8 Días)	(16 Días)	(24 Días)
cannabis 2, trimiado a 25 °C			
Cannabis 1 no trimiado a 25 °C			
Cannabis 1 no trimiado a -10 °C			
Cannabis 2 trimiado a -10 °C			

**Anexo B.** Resultados obtenidos de rendimientos de extracción empleando un método de maceración

**Tabla 17.** Rendimiento de extracción obtenidos para los extractos etanolicos a diferentes condiciones

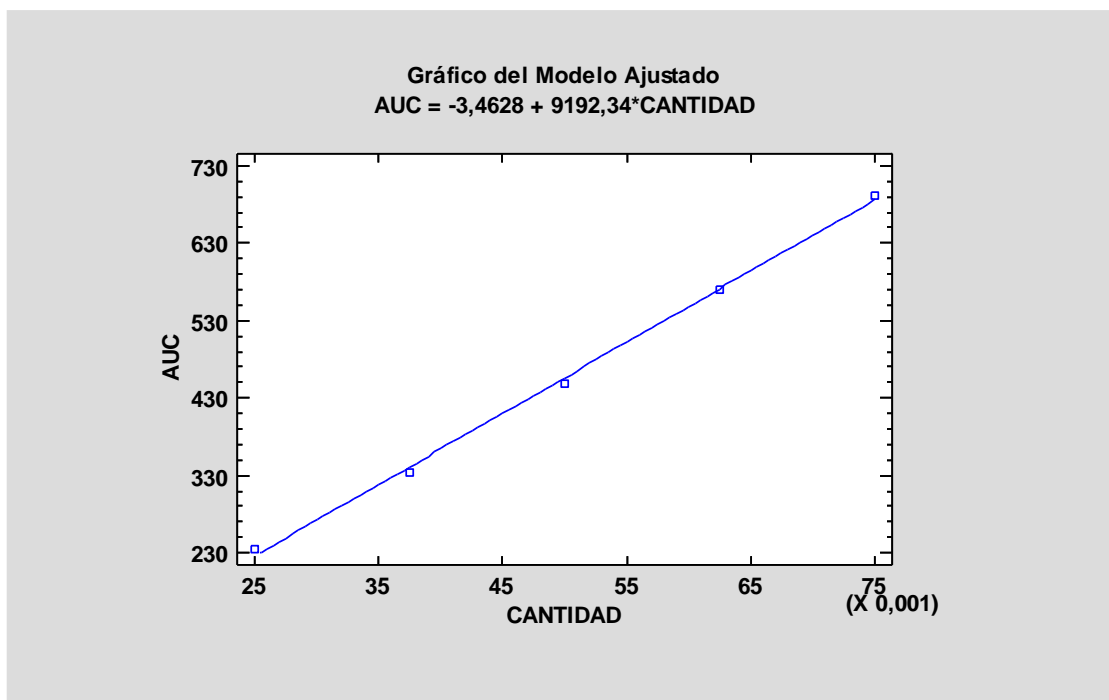
<b>Muestra</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
flor no trimiada Temperatura ambiente (C1TA)	127,48	352,19	36,196%
flor trimiada Temperatura ambiente (C2TA)	78,92	302,71	26,071%
flor no trimiada congelación (C1CON)	144,08	371,71	38,761%
flor trimiada congelación (C2CON)	104,68	327,56	31,958%

**Anexo C.** Resultados obtenidos de la linealidad del sistema del estándar de CBD

**Tabla 18.** Resultados obtenidos de la linealidad del sistema del estándar de cannabidiol

<b>Ensayo</b>	<b>(Concentración %)</b>	<b>(AUC)</b>
1	50	253,116
2	75	334,144
3	100	449,469
4	125	570,664
5	150	691,377

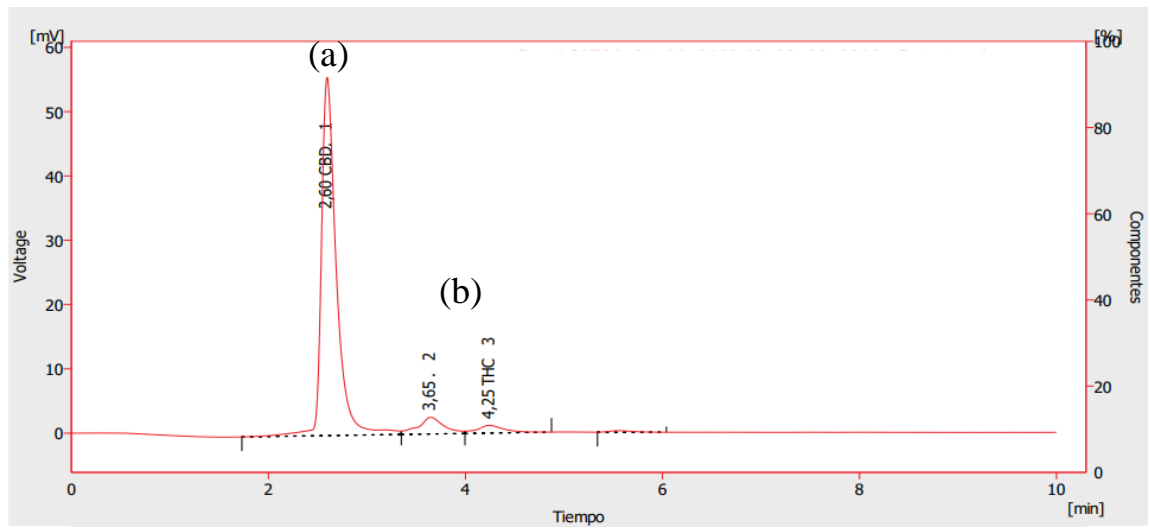
**Anexo D.** Curva de calibración de la linealidad del sistema



**Figura 12.** Curva de calibración del método

Curva calibración obtenido en función del área total de las señales cromatográficas (AUC) frente a la concentración del patrón CBD (mg/ml) construida a partir de una regresión lineal.

## Anexo E. Cromatograma del estándar de cannabidiol



**Figura 13.** Cromatograma del estándar de CBD.

Cromatograma del estándar de CBD a 280 nm, con una concentración de 0,05 mg/ml; tiempo de retención corresponde a 2,60 min. (a) CBD; (b) THC.



**Anexo F.** Prueba ANOVA empleada para cuantificación de CBD.

**Tabla 19.** Resultados obtenidos de la prueba ANOVA para la concentración de CBD

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Efectos principales</b>					
<b>A:Tipo de flor</b>	0,00329238	1	0,00329238	6,72	<b>0,0143</b>
<b>B:Temperatura</b>	7,51046E-8	1	7,51046E-8	0,00	0,9902
<b>C:Tiempo de maceración</b>	0,00000732361	2	0,0000036618	0,01	0,9926
<b>Interacciones</b>					
<b>AB</b>	0,0000381947	1	0,0000381947	0,08	0,7819
<b>AC</b>	0,0000134914	2	0,0000067457	0,01	0,9863
<b>BC</b>	0,00000972495	2	0,00000486247	0,01	0,9901
<b>ABC</b>	0,00000647598	2	0,00000323799	0,01	0,9934
<b>Residuos</b>	0,0156849	32	0,000490154		
<b>Total(corregido)</b>	0,0192983	43			

*Nota* Se aplico un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativ La tabla ANOVA descompone la variabilidad de CONCENTRACIÓN en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se midio eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que A: tipo de flor tiene un valor-P menor que 0,05, este tiene un efecto estadísticamente significativo sobre CONCENTRACIÓN con un 95,0% de nivel de confianza.

**Anexo G.** Prueba de Tukey establecida para la concentración de CBD.

**Tabla 20.** Resultados obtenidos de la prueba de Tukey

---

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD


---

<b>TIPO DE FLOR</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
<b>2</b>	18	0,0202312	0,00473744	X
<b>1</b>	26	0,0384239	0,00405948	X
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>	
<b>1-2</b>	*	0,0181927	0,0126192	

---

*Nota* Se aplico un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. Hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes.

Anexo H. Licencia de procesamiento de *C. sativa* en el Laboratorio Neofármaco

 Ministerio de Agricultura  
y Ganadería

El Ministerio de Agricultura y Ganadería, mediante la Subsecretaría de Producción Agrícola, otorga la Licencia de Cannabis No Psicoactivo tipo:

**LICENCIA PARA EL PROCESAMIENTO DE CANNABIS NO PSICOACTIVO O CÁÑAMO Y PRODUCCIÓN DE DERIVADOS DE CANNABIS NO PSICOACTIVO O CÁÑAMO. (LICENCIA 5)**

Razón Social:	LABORATORIO NEO FARMACO DEL ECUADOR NEOFARMACO CIA. LTDA. RUC: 1891736270001
Dirección:	AV. ATAHUALPA Y NOBOA Y CAAMAÑO, AMBATO, TUNGURAHUA.
Actividades permitidas:	PRODUCIR, ENAJENAR, VENDER, COMERCIALIZAR O DISTRIBUIR DERIVADOS DE CANNABIS NO PSICOACTIVO O CÁÑAMO.
Inmueble autorizado:	INSTALACIONES PARA EL PROCESAMIENTO - 2668 m2
Dirección del Inmueble:	LABORATORIO NEOFAR, AV. ATAHUALPA Y NOBOA Y CAAMAÑO, AMBATO, TUNGURAHUA.
Coordenadas UTM:	X=763706,35 ; Y=9859276,41
Fecha de emisión:	06/01/2022
Vigencia:	10 AÑOS
Número de Licencia:	LPD50015

Conforme a lo establecido en el Acuerdo Ministerial No. 105, de fecha 19 de Octubre de 2020, la licenciataria deberá:

Pagar la tasa de mantenimiento anual que fije la Autoridad Agraria Nacional, durante todos los años que esté vigente su Licencia. Esta tasa anual se pagará dentro del plazo de 30 días desde la fecha de emisión de la Licencia otorgada. (ART. 33)


Solicitar la renovación de sus Licencias, con noventa (90) días de anticipación a la fecha de vencimiento de las mismas y mediante la presentación de la solicitud de renovación correspondiente. (ART 35)

Cualquier modificación a la información y documentación que sirvió para el otorgamiento de la respectiva Licencia, así como cualquier cambio de la actividad o la Licenciataria, deberá notificarse a la Autoridad Agraria Nacional dentro del término de 30 días desde que surta efecto la modificación. (ART 36)

Se deberá obtener una nueva Licencia en el caso de Cambio de lugar de cultivo o producción o Cambio de tipo del cultivo. (ART37)

La Autoridad Agraria Nacional podrá suspender o revocar una Licencia o negar su renovación, previa notificación a la Licenciataria en caso de que la Autoridad Agraria Nacional llegue a comprobar lo establecido en el mencionado artículo. (ART 38)

Guayaquil, 05 de enero del 2022

  
RODOLFO EDUARDO  
GAVILANES ALAVA  
Ing. Rodolfo Gavilanes Alava  
SUBSECRETARIO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
Dirección: Av. Francisco de Orellana y Justino Cornejo, Edificio El Líbano - Teléfono 06-2593331 ext. 5737-47, Piso - Guayaquil-Ecuador

