

3 INFLUENCIA DEL TIEMPO Y LA CONCENTRACIÓN DEL SOLVENTE EN LA PRODUCCIÓN DE EXTRACTO DE CALÉNDULA (CALÉNDULA OFFICINALIS).

INFLUENCE OF TIME AND SOLVENT CONCENTRATION ON THE PRODUCTION OF CALENDULA (CALÉNDULA OFFICINALIS) EXTRACT.

Juliza Estefany Cifuentes Obando¹, Lourdes Araceli Granja Alvear^{1,2}, Julio Amilcar Pineda-Insuasti³
Camilo Alejandro Pineda-Soto⁴,

¹Instituto Superior Tecnológico 17 de Julio, Urcuqui, Ecuador

²Escuela de Ciencias Químicas e Ingeniería. Universidad de Tecnología Experimental Yachay Tech

³Centro Ecuatoriano de Biotecnología, Ibarra, Ecuador

⁴BIOECOLÓGICOS. www.bioecologicos.com, Ibarra, Ecuador

Autor para correspondencia: cifuentesobandojuliza@gmail.com

Recibido: 15/11/2022

Aceptado: 01/12/2022

RESUMEN

Existe limitado conocimiento en el campo del extracto de Caléndula, por lo cual se propone realizar esta investigación con el fin de optimizar el proceso de extracción de Caléndula spp. Esto mediante una extracción hidroalcohólica a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de maceración que permitan determinar los factores y variables clave para una mayor cantidad de SDT en el extracto. Se determina el modelo matemático que permite optimizar el proceso con las variables de tiempo de maceración y concentración de la disolución.

Palabras clave: Luteína, Sólido-Líquido, modelo matemático.

INTRODUCCIÓN

Calendula officinalis es conocida como una planta de jardín común que es utilizada con fines medicinales en países de Europa, China, Estados Unidos e India. De acuerdo con Muley et al. (2009) *Calendula officinalis* pertenece a la familia *Asteraceae*. Además, la Wound Healing Society ha identificado a *C. officinalis* como poseedora de grandes beneficios para el cuidado de heridas durante la última década y en estudios farmacológicos (Muley et al., 2009; Singer & Clark, 1999).

ABSTRACT

There is limited knowledge in the field of Calendula extract, which is why it is proposed to carry out this research to optimize the extraction process of Calendula spp. This through a hydroalcoholic extraction at different concentrations and different maceration times that allow determining the key factors and variables for a greater amount of SDT in the extract. The mathematical model that allows optimizing the process with the variables of maceration time and concentration of the solution is determined.

Keywords: Lutein, Solid-Liquid, mathematical model.

Por otro lado, se ha utilizado *C. officinalis* para diferentes usos como la ictericia, la purificación de la sangre y como antiespasmódico (Muley et al., 2009). Sus grandes flores anaranjadas y las hojas de la planta se pueden usar en infusión, tintura y extracto para diferentes usos, incluidos el cuidado piel y el cabello (Leach, 2008; the Wound Healing Society 13 *Calendula officinalis* extract for wound healing Givol et al., 2019)

Se ha encontrado en la literatura que *C. officinalis* posee diversos metabolitos secundarios con diferentes propiedades farmacológicas que contribuyen a su uso medicinal. Los principales reportados son triterpenoides, flavonoides, cumarinas, quinonas, aceite volátil, carotenoides y aminoácidos (Muley et al., 2009).

En particular, se reporta que los triterpenoides son un compuesto antiinflamatorio en la planta (Leach, 2008), así como un efecto estimulante de fibroblastos (Fronza et al., 2009). Este efecto se atribuye a la evidencia que apoya en efecto inhibitorio de 5-lipoxigenasa, ciclooxigenasa-2 y C3-convertasa (Dzubak et al., 2006; Kapil & Sharma, 1995). Además, Middleton et al. (2000) afirma que la 5-lipoxigenasa es esencial para la producción de leucotrienos. La ciclooxigenasa-2 es un importante contribuyente para la producción de prostaglandinas durante la inflamación, y la C3-convertasa es esencial en la vía clásica del complemento. Otro de los grupos clave de los metabolitos secundarios con propiedades antiedematosas y antioxidantes son los flavonoides. Estos También se ha demostrado que inhiben las enzimas lipoxigenasas, así como las propiedades de inhibición de los mastocitos (Middleton et al., 2000).

En esta misma línea, se ha encontrado que el extracto de *C. officinalis* contiene muchos tipos de flavonoides (Arora et al., 2013; Dinda et al., 2016), triterpenoides (Buzzi & Freitas, 2016; Nicolaus et al., 2014) así como polifenoles (Fonseca et al., 2010). Además, los estudios in vitro con extracto de alcohol de caléndula han demostrado efectos biológicos adicionales. Estos efectos incluyen un aumento en la proliferación y migración de fibroblastos humanos (Dinda et al., 2015, 2016; Fonseca et al., 2010; Fronza et al., 2009; Nicolaus et al., 2014) y queratinocitos (Nicolaus et al., 2014) cultivados en cultivos, aumento de la angiogénesis observada en el modelo de membrana corioalantoidea (Parente et al., 2011, 2012) y disminución de la actividad de la colagenasa (Nicolaus et al., 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se investigó a escala de laboratorio la producción de un extracto a partir de *Caléndula* spp. El trabajo experimental se realizó en el Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente (CEBA), localizado en la ciudad de Ibarra, Ecuador a 2200 metros sobre el nivel del mar y con una temperatura promedio de 18 °C.

Material genético

Como materia prima se utilizó *Caléndula* seca spp. de la empresa Aromas & Especies de la ciudad de Quito, Provincia de Pichincha.



Figura 1. Muestra de Caléndula.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se ha creado un diseño factorial multinivel que consiste en 12 corridas. El diseño deberá ser ejecutado en 3 bloques. El orden de los experimentos ha sido completamente aleatorizado. Esto aportará protección contra el efecto de variables ocultas.

Diseño Base

Número de factores experimentales: 2

Número de bloques: 3

Número de respuestas: 1

Número de corridas: 12
 Grados de libertad para el error: 6
 Aleatorizar: Sí

Tabla 1. Factores del diseño experimental

Factores	Bajo	Alto	Niveles	Unidades
Tiempo	12,0	24,0	2	(h)
Concentración	12,0	25,0	2	(%)

Tabla 2. Variable dependiente

Respuestas	Unidades
SDT	(ppt)

Se estableció como unidad experimental una muestra de 10 g de Caléndula seca y molida; como factores de estudio se definieron el tiempo de agitación y la concentración del solvente. Se establecieron como parámetros de operación el tamaño de partícula de 0,5 mm, pH de 7,2 y la velocidad de agitación de 100 rpm y presión atmosférica (101,3 KPa). La variable de respuesta seleccionada fue la productividad del proceso de extracción por maceración dinámica, medida como Sólidos Disueltos totales (SDT) en ppt. Como factores de ruido se verifica la cantidad de luz y la temperatura ambiente. Se utilizó el software estadístico STATGRAPHICS, para crear un diseño experimental factorial estándar 2², con tres replicas, completamente aleatorio, con un total de 12 tratamientos.

Procedimiento

La muestra de Caléndula fue pulverizada en una licuadora industrial de marca MONTERO-LAR-15PMB, la muestra de materia prima se tamizó en tamaño de 0,5 mm. Como solvente se utilizó una solución de agua con alcohol etílico neutro rectificado, en concentración de 12 y 25 %. Se llenaron las jarras de vidrio de 250 ml con 10 g de muestra de Caléndula y 100 ml de solución hidroalcohólica y posteriormente se procedió a realizar la maceración dinámica, en un equipo agitador de marca BIODIVERSITY. Luego de la maceración dinámica, las muestras se filtraron través de un papel de filtro de celulosa gruesa de 0,3 micras con la ayuda de una bomba de vacío marca QUALITY QVP-500, a cada muestra

filtrada se le midió los SDT con un equipo marca HANNA.



Figura 2. Proceso de maceración de Caléndula.



Figura 3. Formulación de la disolución.



Figura 4. Licuado y homogenización.



Figura 5. Disoluciones de diferente concentración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se presenta la muestra de Caléndula utilizada en el experimento, su composición química promedio En relación con su composición se determinó (Grancza L, 1987; Marczal G, 1987) la presencia de pedunculatina, a y b ionona, oxido-transcariofileno, carvona, cariofileno, 2 cardinolos, geranil acetona, b-ionona-5,6-epóxido, dihidroactinidiolido, oplopanona, g-mouroleno, a -cardineno, guaiol y torryol. Por su parte Chushenhko V. (1988) detectó la presencia de polisacáridos solubles en agua, sustancias pectídicas y hemicelulosas en 14,75; 9,67 y 5,92 % en base seca (bs).



Figura 6. Disolución de caléndula.

En la tabla 3, se presenta la matriz de resultados experimentales, como se puede apreciar se logra un mínimo de SDT de 0,79 ppt y un máximo de SDT de 1,39 ppt, cuando se trabaja con una maceración dinámica de 24 horas y una concentración del solvente del 25% y de 24 horas y una concentración del solvente del 12% respectivamente.

Tabla 3. Matriz de Resultados Experimentales

N	Bloque	Tiempo (h)	Concentración (%)	SDT (ppt)
1	1	12	12	1,22
2	1	24	12	1,33
3	1	24	25	0,79
4	1	12	25	0,89
5	2	24	12	1,39
6	2	12	25	0,82
7	2	24	25	0,73
8	2	12	12	1,24
9	3	24	12	1,3
10	3	24	25	0,8
11	3	12	12	1,32
12	3	12	25	0,85

Fuente: Elaborada por el autor

Análisis de Varianza para SDT

En la tabla 2 se presenta el ANOVA el cual particiona la variabilidad de SDT en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 4. Análisis De Varianza para SDT

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tiempo	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
B: Concentración	0,710533	1	0,710533	302,00	0,0000
AB bloques	0,0192	1	0,0192	8,16	0,0289
Error total	0,00101667	2	0,000508333	0,22	0,8117
	0,0141167	6	0,00235278		
Total (corr.)	0,744867	11			

Fuente: Elaborada por el autor

La ecuación de regresión del modelo empírico ajustado a los datos de SDT es la siguiente:

$$SDT = 1,40769 + 0,0189744 * Tiempo + 0,0189744 * Concentración + 0,00102564 * Tiempo * Concentración$$

Optimización de la respuesta

En la tabla 5 se muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza los valores de SDT sobre la región indicada.

Meta: maximizar SDT

Valor óptimo = 1,34

Tabla 5. Optimización de la respuesta

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Tiempo	12,0	24,0	24,0
Concentración	12,0	25,0	12,0

Fuente: Elaborada por el autor

En la figura 8 se presenta el Diagrama de Pareto Estandarizada para SDT, como se puede observar, tanto la concentración como la correlación tiempo-concentración son significativos, por lo cual dichos factores deben conservarse en el modelo matemático empírico.

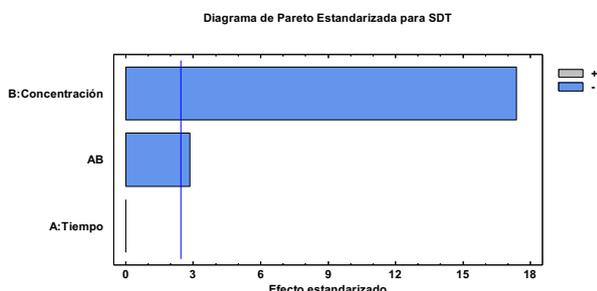


Figura 8. Diagrama de Pareto Estandarizada para SDT

En la figura 9 se presenta la Superficie de Respuesta Estimada para SDT, en la cual se puede observar que el punto máximo logrado de SDT equivalente a 1,34 ppt se da con las condiciones de tiempo = 24 h y concentración = 12%.

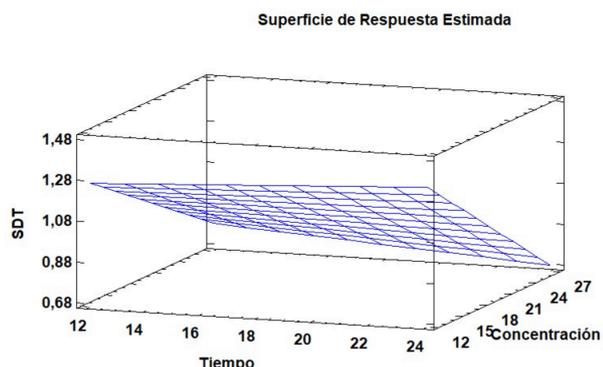


Figura 9. Superficie de Respuesta Estimada

CONCLUSIONES

Los extractos de *C. officinalis* y en particular los de sus flores poseen un amplio espectro de acciones farmacológicas, como antibacteriana, antiinflamatoria y cicatrizante, de ahí la gran importancia de la Calendula en la cosmetología. Además, la Calendula posee un extenso número de familias químicas, entre las cuales sobresalen los carotenoides, los flavonoides, triterpenos, saponinas, ácidos fenólicos, taninos, coumarinas, polisacáridos, sustancias pectínicas y hemicelulosas.

En esta investigación se destaca la capacidad de disolución de la caléndula en distintas concentraciones alcohólicas, en donde se puede concluir que la disolución más óptima entorno a las condiciones de este experimento se brinda en base a una maceración de 24 horas y una concentración de 12% de alcohol. De esto se puede concluir que a mayor tiempo de maceración se obtiene disolución con mayor cantidad de SDT, siempre y cuando se mantenga una concentración alcohólica baja.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente, y al Instituto Superior Tecnológico - 17 de Julio por la cooperación en la realización de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arora, Rani, & Sharma. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus calendula. *Pharmacog- Nosy* , 7, 179–185.
2. Buzzi, & Freitas. (2016). Therapeutic effectiveness of a Calen- dula officinalis extract in venous leg ulcer healing. *Wound Care* , 25, 732–754.
3. Chushenhko V. (1988). Carbohydrates from the inluorescence of C. officinalis. *Khim Prir Soedin*, 4–6.
4. Dinda, Dasgupta, Singh, Bhattacharyya, & Karmakar. (2015). PI3K-mediated proliferation of fibroblasts by Calendula off- icinalis tincture: implication in wound healing. *Phytother Res* , 607–619.
5. Dinda, Mazumdar, Das, Ganguly, Dasgupta, & Dutta. (2016). The water fraction of Calendula officinalis hydroethanol extract stimulates in vitro and in vivo prolifera- tion of dermal fibroblasts in wound healing. *Phytother Res* , 30, 169–186.
6. Dzubak, Hajduch, Vydra, Hustova, Kvasnica, & Biedermann. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat Prod Rep* , 23, 394–411.
7. Fonseca, Catini, Vicentini, Nomizo, Gerlach, & Fonseca. (2010). Protective effect of Calendula officinalis extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secre- tion. . *Ethnopharmacol* , 127, 596–601.
8. Fronza, Heinzmann, Hamburger, Laufer, & Merfort. (2009). Determination of the wound healing effect of calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J Ethnopharmacol*, 463–480.
9. Gracza L. (1987). Oxygen-containing terpene from Calendula officinalis. *Planta Med* .
10. Kapil, & Sharma. (1995). Effect of oleanolic acid on complement in adjuvant-and carrageenan- induced inflammation in rats. *Pharm Pharmacol* , 585–598.
11. Leach. (2008). Calendula officinalis and wound healing. *A Compendium Clin Res Practice*, 236–243.
12. Marczał G. (1987). Data on the essential oil content and composition of C. officinalis . *Herba Hung*, 26, 2–3.
13. Middleton, Kandaswami, & Theoharides. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. . *Pharmacol Rev*, 52, 673–751.
14. Muley, Khadabadi, & Banarase. (2009). Phytochemical constitu- ents and pharmacological activities of Calendula officinalis Linn (Asteraceae). *Trop J Pharmaceut Res* , 455–465.
15. Nicolaus, Junghanns, Murillo, & Merfort. (2014). Triterpene alcohols from Calendula officinalis L. flowers and in vitro studies on their wound healing activity. *Planta Med* , 80.
16. Parente, Andrade, Brito, Moura, Miguel, & Lino-Júnior. (2011). Angiogenic activity of Calendula officinalis flowers L. in rats. *Acta Cirurgica Brasileira* , 26, 19–24.
17. Parente, Lino, Tresvenzol, & Vinaud. (2012). Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of Calendula officinalis L. growing in Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medi- Cine*, 375–671.
18. Singer, & Clark. (1999). *Cutaneous wound healing* (New England J Med).
19. the Wound Healing Society 13 Calendula officinalis extract for wound healing Givol et al. (2019). *Final report on the safety assessment of Calendula officinalis extract and Calendula officinalis*.