



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

EXTRACCIÓN DE CANNABINOIDES CON ASISTENCIA ACÚSTICA A PARTIR DE LA PLANTA CANNABIS SATIVA L. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Pablo Sandiego Villaverde

Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Química

(Especialidad en Química y Tecnologías Alimentarias)

Centro de Estudios de Postgrado

Año Académico 2020-21

EXTRACCIÓN DE CANNABINOIDES CON ASISTENCIA ACÚSTICA A PARTIR DE LA PLANTA CANNABIS SATIVA L. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Pablo Santiago Villaverde

Trabajo de Fin de Máster

Centro de Estudios de Postgrado

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2020-21

Palabras clave del trabajo:

Cannabis, extracción asistida por ultrasonidos, cannabinoides, tetrahidrocannabinol, cannabidiol, cannabinol, metodología de superficie de respuesta, optimización

Nombre Tutor del Trabajo: Antoni Femenia Marroig

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Antoni Femenia, el apoyo y ayuda prestados en todo momento y la confianza otorgada para realizar este trabajo. Además, deseo extender mi agradecimiento a las doctoras Valeria Eim, Carmen Rosselló y Susana Simal por los conocimientos adquiridos en las diferentes asignaturas a lo largo del máster.

Agradecer también a la empresa Natural Healthy Cannabis Corporation SL por el suministro de muestras de *Cannabis sativa* L. para poder llevar a cabo este trabajo.

Además, quiero dar las gracias a todos mis compañeros del Grupo de Ingeniería Agroalimentaria de la Universidad de las Illes Balears, especialmente a Cristina, por la ayuda proporcionada en todo momento.

Por otra parte, me gustaría agradecer el apoyo ofrecido por Trinidad de los servicios científicotécnicos, imprescindible para resolver cualquier problema que pudiera surgir a la hora de usar el equipo de cromatografía de gases.

A nivel personal, agradecer a mi madre su apoyo incondicional, por aguantarme en los momentos de nervios y estrés, teniendo siempre las palabras adecuadas para levantar el ánimo, y a mi hermano mayor Carlos, que pese a padecer TEA y tener muy limitada su capacidad para expresarse, siento de igual manera que estamos el uno para el otro para apoyarnos en todo momento. Agradecer también al resto de mi familia, especialmente a mi tío Jaime, sus consejos y su apoyo han sido constantes estos últimos años.

Gracias a mis amigos, por los ánimos en momentos de dudas y agobio y por todas las risas que siempre ayudan a distraerse y despejar la mente.

Finalmente, quiero hacer una mención especial a mi tío Pepe Sandiego, una persona única que siempre estuvo pendiente de mis estudios, apoyando desde Valencia con su eterna sonrisa las diferentes decisiones que he ido tomando en los últimos años. Gracias por todo, siempre te tendré presente en mi vida.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	6
Índice de tablas.....	7
Lista de abreviaturas.....	8
Resumen	9
Abstract.....	10
1. Introducción	11
1.1 <i>Cannabis sativa</i> L.	11
1.1.1 Origen y propagación	12
1.1.2 Compuestos químicos presentes en <i>Cannabis sativa</i> L.	12
1.1.2.1 Cannabinoides	13
1.1.2.2 Componentes no cannabinoides.....	17
1.1.3 Cultivo, procesado y almacenamiento.....	17
1.1.4 Taxonomía del <i>Cannabis sativa</i> L.	18
1.1.5 Legislación del cannabis	19
1.1.6 Propiedades farmacológicas del <i>Cannabis sativa</i> L.	20
1.2 Extracción sólido-líquido.....	20
1.2.1 Efecto de la temperatura, tiempo y ratio soluto:disolvente	21
1.2.2 Extracción de compuestos bioactivos. Cannabinoides	21
1.2.3 Ultrasonidos de potencia. Uso en la extracción de cannabinoides.....	22
1.3 Metodología de superficie de respuesta	22
1.3.1 Diseño de Box-Behnken.....	23
2. Objetivos	25
3. Materiales y métodos.....	26
3.1 Materia prima.....	26
3.2 Equipo experimental.....	26
3.2.1 Equipo de extracción acústica.....	26
3.3 Metodología analítica.....	28
3.3.1 Contenido en humedad	28
3.3.2 Extracción de cannabinoides. Caracterización de la muestra de <i>Cannabis sativa</i> L.....	28
3.3.3 Análisis mediante cromatografía de gases.....	29
3.3.4 Determinación del contenido de los cannabinoides presentes en <i>Cannabis sativa</i> L.....	31
3.3.5 Microscopía electrónica de barrido.....	31
3.3.6 Metodología de Superficie de Respuesta (RSM). Diseño experimental	31

3.3.7 Análisis estadístico.....	32
3.3.8 Optimización y validación de los modelos de superficie de respuesta	33
4. Resultados y discusión	34
4.1 Caracterización de la muestra de <i>Cannabis sativa</i> L.	34
4.1.1 Análisis mediante microscopía electrónica de barrido	34
4.1.2 Caracterización inicial de la muestra. Principales compuestos cannabinoides .	35
4.2 Optimización del proceso de extracción	37
4.2.1 Elección de los niveles de estudio para las variables seleccionadas	37
4.2.2 Aplicación del diseño experimental	38
4.2.3 Ajuste del modelo de superficie de respuesta	40
4.2.3.1 Extracción de CBD.....	42
4.2.3.2 Extracción de Δ^9 -THC	43
4.2.3.3 Extracción de CBN.....	43
4.2.3.4 Contenido total de cannabinoides	44
4.2.4 Superficies de respuesta	44
4.2.4.1 Extracción de CBD.....	45
4.2.4.2 Extracción de Δ^9 -THC	46
4.2.4.3 Extracción de CBN.....	47
4.2.4.4 Contenido total de cannabinoides	48
4.2.5 Optimización y validación de los modelos obtenidos.....	50
5. Conclusiones	51
6. Bibliografía.....	53

Índice de figuras

Figura 1. <i>Cannabis sativa</i> L. Köhler's Medizinal-Pflanzen (Pabst, 1887).	11
Figura 2. Expansión del cannabis alrededor del mundo (Historical Records, Natural History Museum).....	12
Figura 3. Estructura química de los principales cannabinoides presentes en <i>Cannabis sativa</i> L. (Hazekamp, 2007).	13
Figura 4. Ruta biosintética de los principales cannabinoides ácidos presentes en <i>Cannabis sativa</i> L.	14
Figura 5. Cannabinoides tipo Δ^9 -THC.	15
Figura 6. Cannabinoides tipo Δ^8 -THC.	15
Figura 7. Cannabinoides tipo CBC.....	15
Figura 8. Cannabinoides tipo CBD.....	15
Figura 9. Cannabinoides tipo CBG.....	16
Figura 10. Cannabinoides tipo CBN.....	16
Figura 11. Cannabinoides tipo CBL.	16
Figura 12. Cannabinoides tipo CBE.	16
Figura 13. Cannabinoides tipo CBND.	17
Figura 14. Cannabinoides tipo CBT.	17
Figura 15. Taxonomía del cannabis basada en la existencia de tres especies (McPartland, 2018).	18
Figura 16. Cavitación, difusión del disolvente y liberación de los compuestos de interés (Medina-Torres et al., 2017).....	22
Figura 17. Representaciones gráficas del diseño de Box-Behnken para 3 variables.	23
Figura 18. Acondicionamiento de la muestra para su posterior análisis.....	26
Figura 19. Montaje del sistema de extracción y dibujo del equipo de ultrasonidos.	27
Figura 20. Sonotrodo utilizado en los experimentos de extracción asistida por ultrasonidos.....	27
Figura 21. Procedimiento experimental utilizado para la caracterización del contenido de cannabinoides presentes en la muestra de cáñamo.	29
Figura 22. Cromatógrafo utilizado para el análisis por GC y muestreador automático del equipo.	29
Figura 23. Curvas de calibrado correspondientes a los diferentes cannabinoides analizados.....	30
Figura 24. Imágenes de muestras de cáñamo tomadas con un SEM. Las imágenes de la columna izquierda se tomaron a menor resolución que las situadas en la derecha. (a)-(e) muestra fresca, (b)-(f) extracción con US a 15 °C y 15 min, (c)-(g) extracción con US a 25 °C y 15 min y (d)-(h) extracción con US a 35 °C y 15 min.	35
Figura 25. Cromatograma correspondiente a la muestra inicial de <i>Cannabis sativa</i> L. ...	36
Figura 26. Relación entre rendimiento de extracción de los cannabinoides estudiados y tiempo de extracción.	38
Figura 27. Diagrama de Pareto para la extracción de CBD asistida por ultrasonidos. ...	42

Figura 28. Diagrama de Pareto para la extracción de Δ^9 -THC asistida por ultrasonidos.	43
Figura 29. Diagrama de Pareto para la extracción de CBN asistida por ultrasonidos. ...	44
Figura 30. Diagrama de Pareto para el contenido total de cannabinoides.	44
Figura 31. Superficies de respuesta del contenido de CBD presente en las muestras de cáñamo (% p/p) afectado por (a) tiempo vs. temperatura de extracción, (b) ratio soluto:disolvente vs. temperatura de extracción y (c) ratio soluto:disolvente vs. tiempo.	46
Figura 32. Superficies de respuesta del contenido de Δ^9 -THC presente en las muestras de cáñamo (% p/p) afectado por (a) tiempo vs. temperatura de extracción, (b) ratio soluto:disolvente vs. temperatura de extracción y (c) ratio soluto:disolvente vs. tiempo.	47
Figura 33. Superficies de respuesta del contenido de CBN presente en las muestras de cáñamo (% p/p) afectado por (a) tiempo vs. temperatura de extracción, (b) ratio soluto:disolvente vs. temperatura y (c) ratio soluto:disolvente vs. tiempo de extracción.	48
Figura 34. Superficies de respuesta del contenido total de cannabinoides estudiado (% p/p) afectado por (a) tiempo vs. temperatura de extracción, (b) ratio soluto:disolvente vs. temperatura y (c) ratio soluto:disolvente vs. tiempo.	49

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de fenotipos químicos de la planta <i>Cannabis sativa</i> L. según Small y Beckstead (1973) y Fournier y Paris (1979).	19
Tabla 2. Valores codificados para un diseño Box-Behnken para 3 variables.	24
Tabla 3. Densidad acústica aplicada al sistema de extracción.	28
Tabla 4. Condiciones del equipo para llevar a cabo el análisis mediante GC-FID.	30
Tabla 5. Niveles y codificación de las variables estudiadas.	32
Tabla 6. Contenido individual y total de los principales cannabinoides presentes en la muestra de cáñamo analizada.	36
Tabla 7. Extracción y determinación de cannabinoides a partir de <i>Cannabis sativa</i> L. con asistencia acústica. Compuestos determinados y condiciones de extracción.	37
Tabla 8. Diseño experimental de Box-Behnken. Resultados experimentales de las variables de respuesta en la extracción de cannabinoides y valores estimados a partir de los datos del ANOVA.	39
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño de Box-Behnken para la extracción de cannabinoides en <i>Cannabis sativa</i> L. mediante ultrasonidos de potencia.	40
Tabla 10. Ecuaciones de los modelos formulados correspondientes a las respuestas seleccionadas.	42
Tabla 11. Valores de las variables que maximizan el contenido de CBD y el porcentaje total de cannabinoides obtenidos del cáñamo mediante extracción asistida por ultrasonidos y validación de los modelos desarrollados.	50

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
Δ^8 -THC	Δ^8 -tetrahidrocannabinol
Δ^9 -THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
ANOVA	Análisis de varianza
CBC	Cannabicromeno
CBCA	Ácido cannabicroménico
CBD	Cannabidiol
CBDA	Ácido cannabidiólico
CBE	Cannabielsoína
CBG	Cannabigerol
CBGA	Ácido cannabigerólico
CBL	Cannabiciclol
CBN	Cannabinol
CBND	Cannabinodiol
CBT	Cannabitriol
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GC	Cromatografía de gases
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
GPP	Pirofosfato de geranilo
LOF	Falta de ajuste
RSM	Metodología de superficie de respuesta
SEM	Microscopía electrónica de barrido
THCA	Ácido tetrahidrocannabinólico
UE	Unión Europea
UNODC	<i>United Nation Office on Drugs and Crime</i>
US	Ultrasonidos de potencia

Resumen

Cannabis sativa L. es una planta de la familia *Cannabaceae* que contiene una importante cantidad de metabolitos secundarios, con más de 500 compuestos identificados. Es una planta que lleva décadas causando controversia por la presencia de compuestos psicoactivos, aunque en los últimos años ha ido adquiriendo una gran importancia debido al potencial farmacológico que muestran algunos de los principales compuestos cannabinoides presentes en la planta. Por este motivo, es de gran interés evaluar la optimización del proceso de extracción de estos compuestos bioactivos mediante una metodología eficiente, que permita ahorrar en recursos, tiempo y costos del proceso. En este contexto, este estudio se basa en la utilización de ultrasonidos de potencia como tecnología para llevar a cabo la extracción de cannabinoides.

La investigación desarrollada hasta hoy sobre la optimización multivariante del proceso de extracción de cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L. es bastante limitada, a pesar del creciente interés de esta planta como fuente de cannabidiol (CBD) y otros cannabinoides no psicoactivos de gran interés. Por lo tanto, el objetivo principal del presente trabajo es llevar a cabo la optimización de la extracción asistida acústicamente de los principales cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L. con la finalidad de establecer las condiciones de extracción que permitan obtener los mayores rendimientos de los cannabinoides seleccionados.

Para la optimización del proceso de extracción de cannabinoides a partir de *Cannabis sativa* L. se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM), aplicando un diseño de Box-Behnken. Las respuestas analizadas fueron el contenido individual (% p/p) de CBD, de Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y de cannabino (CBN) presentes en *Cannabis sativa* L., así como el contenido total de cannabinoides. Para llevar a cabo el proceso se seleccionaron como variables independientes: la temperatura de extracción ($X_1 = 15-35$ °C), el tiempo de extracción ($X_2 = 5-15$ min) y el ratio soluto:disolvente ($X_3 = 20-80$ mL/g).

Los cuatro modelos matemáticos obtenidos durante el proceso de optimización de la extracción de los diferentes cannabinoides mediante RSM se ajustaron a los datos experimentales, obteniéndose las diferentes superficies de respuesta. A partir de los diferentes resultados, se pudo llevar a cabo la optimización tanto del proceso de extracción del CBD presente en la muestra de *Cannabis sativa* L., así como el de extracción de la totalidad de cannabinoides analizados.

En particular, las condiciones óptimas obtenidas para el proceso de extracción de CBD fueron $X_1 = 26,5$ °C, $X_2 = 12,2$ min y $1:X_3 = 1:20$, mientras que para la extracción del total de cannabinoides estudiados fueron $X_1 = 28,7$ °C, $X_2 = 12,5$ min y $1:X_3 = 1:20$. Utilizando estas condiciones, los valores máximos correspondientes al contenido de CBD y al de cannabinoides totales analizados fueron $10,6 \pm 0,2\%$ y $14,7 \pm 0,3\%$, respectivamente.

Finalmente, se llevó a cabo la validación de los modelos utilizando las condiciones óptimas para ambas respuestas. No se observaron diferencias significativas entre los valores estimados y los resultados experimentales, lo cual es indicativo de la validez de los modelos para llevar a cabo la optimización del proceso de extracción de cannabinoides a partir de *Cannabis sativa* L.

Abstract

Cannabis sativa L. is a plant of the *Cannabaceae* family that represents an important source of secondary metabolites, with more than 500 identified compounds. It is a plant that has been causing controversy for decades due to the presence of psychoactive compounds, although in recent years it has acquired great importance due to the pharmacological potential shown by some of the main cannabinoid compounds present in the plant. For this reason, it is of great interest to evaluate the optimisation of the extraction process of these bioactive compounds by means of an efficient methodology, which allows saving in resources, time and costs of the process. In this context, this study is based on the use of power ultrasound as a technology to carry out the cannabinoid extraction.

The research carried out to date on the multivariate optimisation of the cannabinoid extraction process present in *Cannabis sativa* L. is quite limited, despite the growing interest of this plant as a source of cannabidiol (CBD) and other non-psychoactive cannabinoids of great interest. Therefore, the main objective of this work is to carry out the optimisation of the acoustically assisted extraction of the main cannabinoids present in *Cannabis sativa* L. in order to establish the extraction conditions that allow obtaining the highest yields of the selected cannabinoids.

For the optimization of the cannabinoid extraction process from *Cannabis sativa* L., the response surface methodology (RSM) was used, applying a Box-Behnken design. The responses analyzed were the individual content (% w/w) of CBD, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and cannabiol (CBN) present in *Cannabis sativa* L., as well as the total content of cannabinoids. To carry out the process, the following were selected as independent variables: extraction temperature ($X_1 = 15$ -35 °C), extraction time ($X_2 = 5$ -15 min) and solute: solvent ratio ($X_3 = 20$ -80 mL/g).

The four mathematical models obtained during the optimisation process of the extraction of the different cannabinoids using RSM were adjusted to the experimental data, obtaining the different response surfaces. Based on the different results, it was possible to carry out the optimization of both the extraction process of the CBD present in the *Cannabis sativa* L. sample, as well as the extraction of all the cannabinoids analysed.

In particular, the optimal conditions obtained for the CBD extraction process were as follows: $X_1 = 26,5$ °C, $X_2 = 12,2$ min and $1:X_3 = 1:20$, whereas for the extraction of the total cannabinoids studied were $X_1 = 28,7$ °C, $X_2 = 12,5$ min and $1:X_3 = 1:20$. Using these conditions, the maximum values corresponding to the CBD content and to the total cannabinoids analysed were $10,6 \pm 0,2\%$ and $14,7 \pm 0,3\%$, respectively.

Finally, the validation of the models was carried out using the optimal conditions for both responses. No significant differences were observed between the estimated values and the experimental results, which is indicative of the validity of the models to carry out the optimisation of the cannabinoid extraction process from *Cannabis sativa* L.

1. Introducción

1.1 *Cannabis sativa* L.

Cannabis sativa L. (denominada habitualmente como cannabis) es una planta que crece en zonas templadas y tropicales del mundo perteneciente a la familia *Cannabaceae* (UNODC, 2009). La planta presenta hojas dentadas, en forma de abanico (Figura 1) y puede alcanzar hasta los 6 metros de altura, aunque el grado de ramificación y la altura de la planta dependen principalmente de factores ambientales y hereditarios, así como del método de cultivo (UNODC, 2009).

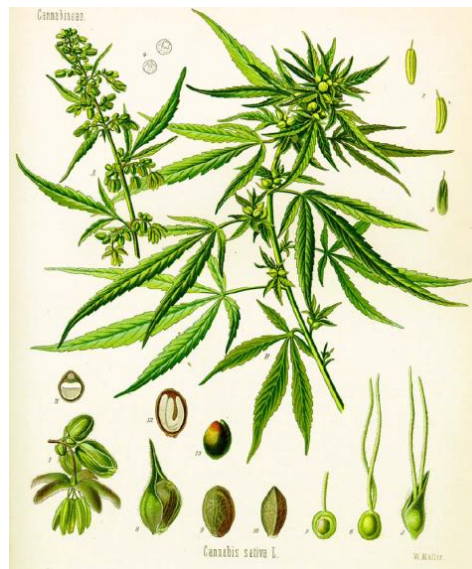


Figura 1. *Cannabis sativa* L. Köhler's Medizinal-Pflanzen (Pabst, 1887).

Cannabis sativa L. es una planta florida que se puede encontrar en formas variables, dependiendo sobre todo de la variedad cultivada y de la disponibilidad de espacio para su crecimiento. Es una especie normalmente dioica, por lo tanto, las flores masculinas y femeninas se encuentran en plantas separadas. Los compuestos bioactivos del cannabis están contenidos mayormente en las inflorescencias de la planta, encontrándose principalmente concentrados en los tricomas, apéndices en la superficie de la planta que cubren las flores, hojas y los tallos de ésta (Andre et al., 2016).

La planta fue clasificada por primera vez en 1753 por Carl Linnaeus y representa una importante fuente de metabolitos secundarios, con más de 500 compuestos identificados (Hanusš et al., 2016), siendo los cannabinoides el grupo de compuestos bioactivos más importante en la planta.

Desde que se conoce la existencia de compuestos psicoactivos en la planta de *Cannabis sativa* L., se ha nombrado de formas diversas con el objetivo de distinguir las plantas que contienen sustancias psicoactivas de las que no contienen dichos compuestos. Debido, por una parte, a la gran controversia que genera esta planta, pero también al gran potencial en diferentes ámbitos de la planta *Cannabis sativa* L. que no posee componentes psicoactivos, se hace necesaria esta distinción (HazeKamp, 2007).

En este contexto, se suele hablar de cáñamo para referirse a la planta que no contiene compuestos psicoactivos. No obstante, dado que este término no tiene base científica, en muchas ocasiones se utiliza el término cannabis para referirse a la planta *Cannabis sativa* L. en todas sus variedades (HazeKamp, 2007).

1.1.1 Origen y propagación

La planta de cáñamo está considerada como una de las más antiguas cultivadas por el ser humano, gracias a los múltiples usos que lo distinguen. Su origen se establece hace 6000 años en Asia Central (Schultes, 1970), existiendo diversos libros de aquella época en los que se indica la relación que tuvo con la medicina china hace aproximadamente 5000 años (Upton, 2020), aunque también era destacable su uso con otros fines como la obtención de fibra y la elaboración de aceite a partir de sus semillas (Small et al., 1975).

En Europa se utilizó como fuente de fibra hasta el siglo XVI, donde se introdujo como droga en una época plagada de exploraciones (Figura 2), que hizo llegar el cannabis hasta América (Small et al., 1975). En el siglo XIX es cuando aparecen los primeros datos contrastados sobre el cannabis; su uso se popularizó, siendo el divulgador de su aplicación terapéutica el médico William O'Shaughnessy, que proporcionó registros detallados de los efectos del cannabis (Upton, 2020).

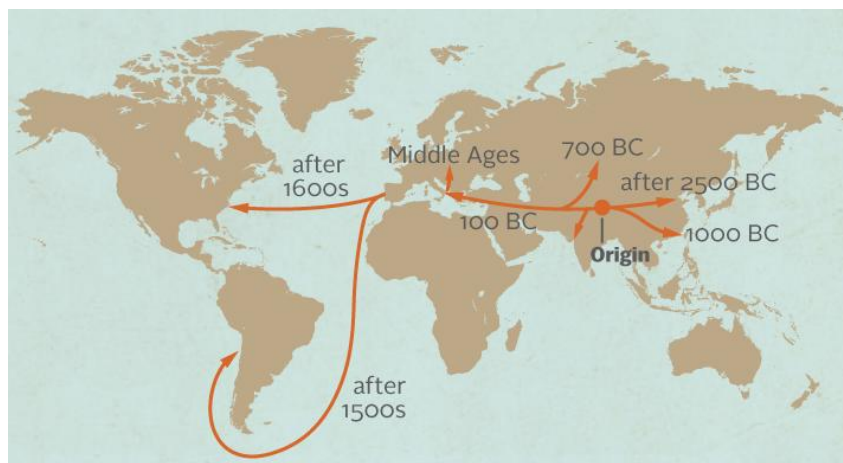


Figura 2. Expansión del cannabis alrededor del mundo (Historical Records, Natural History Museum).

En el siglo XX, la introducción en el mercado europeo y estadounidense de fibras menos costosas procedentes de Asia provocó el declive del cultivo de cáñamo, aunque este declive también estuvo relacionado con la prohibición del cannabis en Estados Unidos, tanto de la planta como de sus constituyentes activos.

Parece ser reciente el redescubrimiento del cáñamo como cultivo agrícola, debido principalmente al interés de la investigación que confirma la multifuncionalidad de esta planta y la legalización en muchos países del cultivo de *Cannabis sativa* L., siempre y cuando no se superen límites establecidos para el principal compuesto psicoactivo presente en la planta, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC, o simplemente THC).

1.1.2 Compuestos químicos presentes en *Cannabis sativa* L.

El cannabis es una mezcla natural químicamente compleja de compuestos bioactivos que abarcan, entre otros, flavonoides, terpenos, aminoácidos, vitaminas y azúcares, aunque los compuestos que presentan, sin duda, mayor interés son los cannabinoides (Citti et al., 2020; Cheng Hao, Gu y Xiao, 2015). No obstante, los demás compuestos también deben tenerse en cuenta ya que están asociados con múltiples efectos beneficiosos para la salud humana (Russo, 2011).

1.1.2.1 Cannabinoides

Los cannabinoides son terpenofenoles definidos como un grupo de compuestos formados por 21 átomos de carbono (Figura 3), característicos del género *Cannabis* (Mechoulam y Gaoni, 1967), entre los que se incluyen sus derivados y productos de transformación.

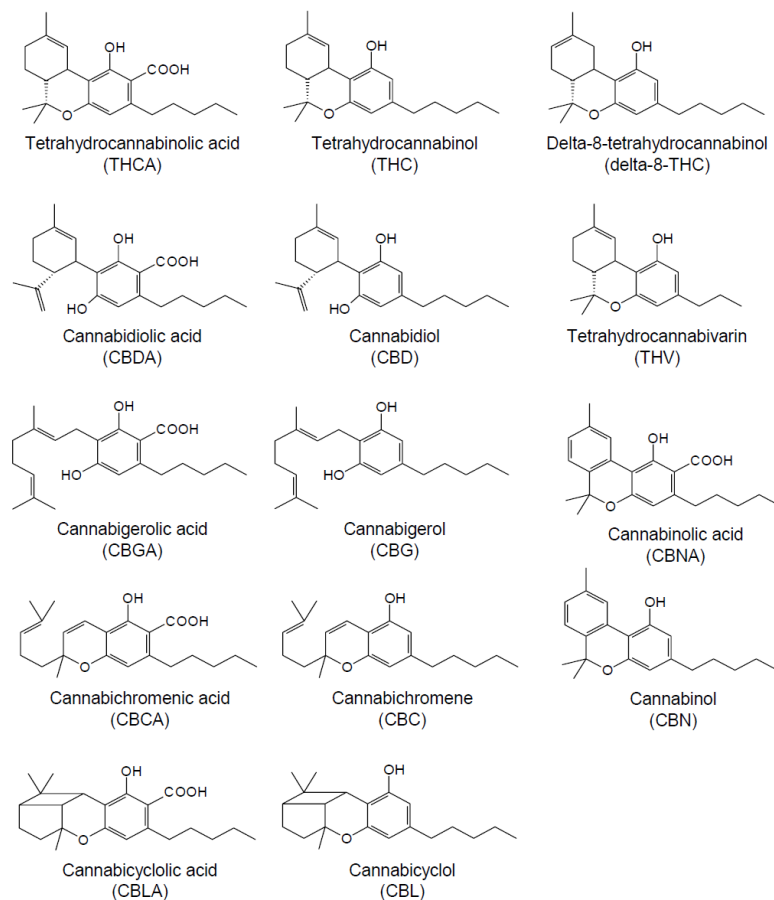


Figura 3. Estructura química de los principales cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L. (Hazekamp, 2007).

Actualmente se han identificado más de 100 compuestos cannabinoides (Radwan et al., 2009), entre los cuales destacan el Δ^9 -THC, el cannabidiol (CBD) y el cannabinol (CBN).

Los cannabinoides son compuestos inodoros, siendo el olor característico del cannabis debido a terpenos volátiles de la planta (Russo, 2011), que de forma natural presentan normalmente un grupo carboxilo en su estructura. Los cannabinoides ácidos se descarboxilan a sus formas neutras cuando son expuestos al calor y la luz, aunque también pueden experimentar la descarboxilación a bajas temperaturas durante el almacenamiento. De hecho, compuestos como el Δ^9 -THC, CBD, CBN y otros cannabinoides descarboxilados no están presentes en grandes concentraciones cuando la planta se encuentra en estado fresco (Macherone, 2020).

El CBD es el compuesto no psicoactivo más importante, mientras que el mayor responsable de la actividad psicotrópica de la planta es el Δ^9 -THC junto con el CBN. Este último posee una ligera actividad psicoactiva, estimada en una décima parte de la actividad atribuida al Δ^9 -THC (Gonzalez et al., 2002).

La biosíntesis de los cannabinoides presentes en la planta ha sido elucidada casi al completo (Raharjo et al., 2004). Los precursores de los cannabinoides se originan a partir de

dos rutas biosintéticas distintas: la ruta del acetato, que da lugar a la síntesis del ácido olivetólico, y la ruta del mevalonato, que conduce a pirofosfato de geranilo (GPP) (Sirikantaramas et al., 2007) (Figura 4).

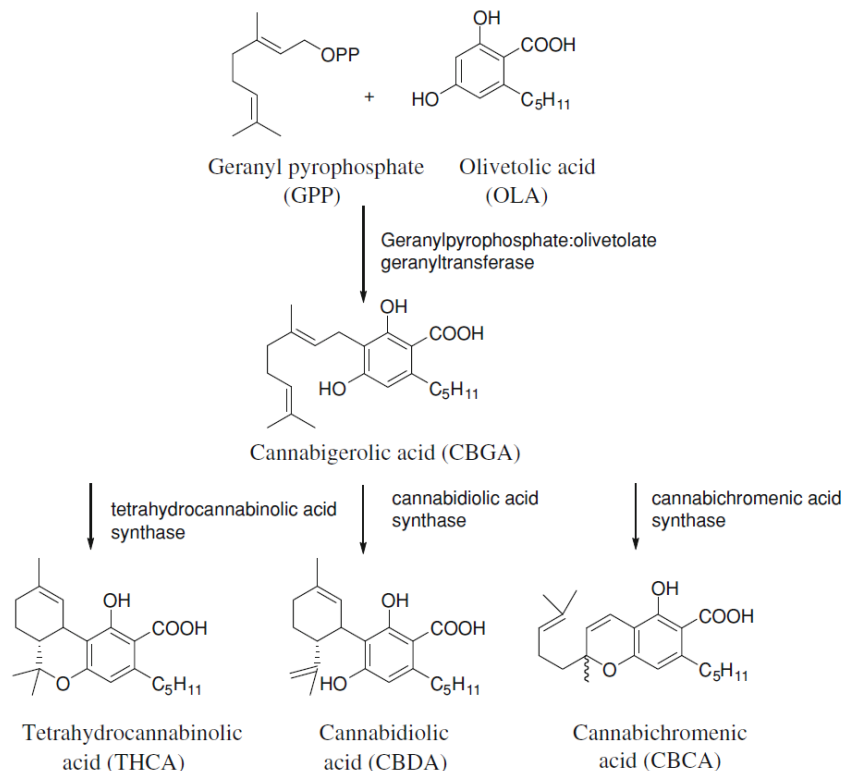


Figura 4. Ruta biosintética de los principales cannabinoides ácidos presentes en *Cannabis sativa* L.

La C-alkilación, catalizada por una sintasa, del ácido olivetólico con GPP conduce a la formación de ácido cannabigerólico (CBGA), precursor central de varios cannabinoides (Fellermeier y Zenk, 1998). A partir del CBGA, se producen diferentes procesos de ciclación oxidativa catalizados por enzimas que dan lugar al ácido tetrahydrocannabinólico (THCA), al ácido cannabidiólico (CBDA) y al ácido cannabicroménico (CBCA). Por tanto, los cannabinoides se biosintetizan en sus formas ácidas.

A partir de la investigación realizada durante los últimos años, el desarrollo de cannabinoides sintéticos (compuestos obtenidos por síntesis que tratan de reproducir la estructura de los cannabinoides naturales) y el descubrimiento de los endocannabinoides (lípidos bioactivos capaces de unirse a los receptores utilizados por los cannabinoides naturales), es habitual el uso del término "fitocannabinoides" para referirse a los compuestos presentes naturalmente en la planta (Pate, 1994). Estos se dividen en 10 subclases (ElSohly y Slade, 2005):

- Tipo Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC): el aislamiento de Δ^9 -THC puro a partir de un extracto de hachís fue realizado por Gaoni y Mechoulam en 1964. Es el fitocanabinoide psicoactivo más abundante y más estudiado en la planta *Cannabis sativa* L. Se caracteriza, además, por poseer propiedades farmacológicas muy diversas. Este grupo está formado por 9 cannabinoides distintos.

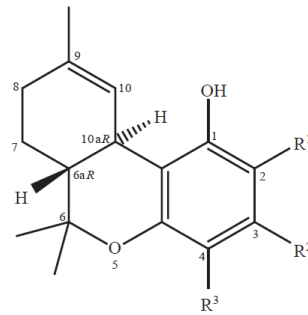


Figura 5. Cannabinoides tipo Δ^9 -THC.

- Tipo Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC): el cannabinoide Δ^8 -THC, de estructura similar al Δ^9 -THC, se aisló en 1966 (Hively et al., 1966). Este grupo está formado únicamente por dos compuestos.

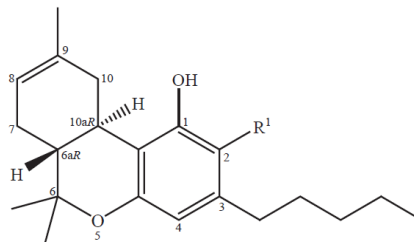


Figura 6. Cannabinoides tipo Δ^8 -THC.

- Tipo cannabicromeno (CBC): el CBC es un compuesto no psicoactivo de la planta cuyo descubrimiento por Claussen et al. y Gaoni y Mechoulam en 1966 ocurrió de forma casi simultánea. En este grupo hay 5 compuestos.

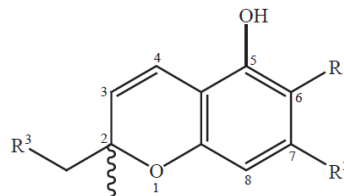


Figura 7. Cannabinoides tipo CBC.

- Tipo cannabidiol (CBD): el CBD no fue aislado hasta mitad del siglo XX. Es el compuesto no psicoactivo más importante en la planta, siendo un aspecto importante sus posibles efectos terapéuticos. En este grupo hay 7 compuestos de tipo CBD.

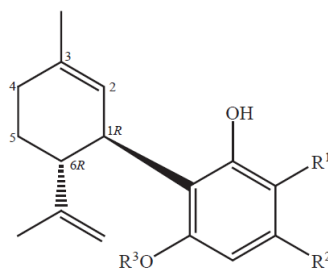


Figura 8. Cannabinoides tipo CBD.

- Tipo cannabigerol (CBG): en 1964 se aisló CBG de la resina de cannabis. Es un cannabinoide no psicoactivo que exhibe actividad antibacteriana. Existen 7 compuestos clasificados como cannabinoides de tipo CBG (Leghissa et al., 2018).

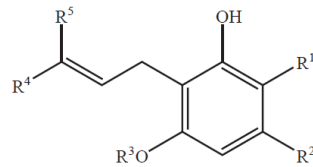


Figura 9. Cannabinoides tipo CBG.

- Tipo cannabinol (CBN): el primer compuesto aislado representativo de los cannabinoides fue el CBN en 1896, aunque su estructura química no fue caracterizada correctamente hasta 1940 (Hanuš et al., 2016). Es un compuesto derivado de la oxidación de Δ^9 -THC cuya concentración aumenta durante la conservación de la planta. Este grupo está formado por 7 compuestos.

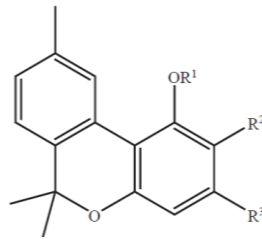


Figura 10. Cannabinoides tipo CBN.

- Tipo cannabiciolol (CBL): el CBL se aisló en 1967 y existen 3 compuestos diferentes en este grupo. Ninguno de estos presenta bioactividad, de acuerdo con los estudios hasta ahora realizados (Leghissa et al., 2018).

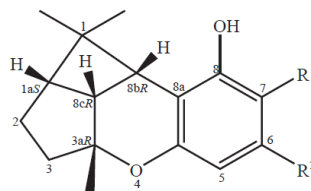


Figura 11. Cannabinoides tipo CBL.

- Tipo cannabielsoína (CBE): es uno de los descubrimientos más recientes. Existen 5 compuestos de este tipo, aunque tampoco se ha reportado bioactividad alguna para este tipo de compuestos (Leghissa et al., 2018).

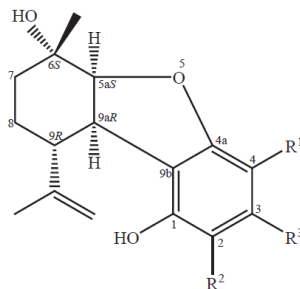


Figura 12. Cannabinoides tipo CBE.

- Tipo cannabinodiol (CBND): solo se han identificado 2 compuestos del tipo CBND. Se descubrieron en 1972 y se obtienen a partir de la oxidación del CBD (Leghissa et al., 2018).

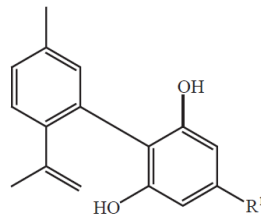


Figura 13. Cannabinoides tipo CBND.

- Tipo cannabitríol (CBT): se han aislado hasta 9 cannabinoides diferentes correspondientes a este último grupo de compuestos.

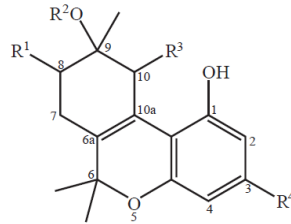


Figura 14. Cannabinoides tipo CBT.

1.1.2.2 Componentes no cannabinoides

La mayor parte de los componentes no cannabinoides identificados son los constituyentes habituales de una planta. Pese a que estos compuestos están presentes en pequeñas cantidades, se debe tener en cuenta la importancia de éstos, ya que pueden presentar efectos positivos para la salud humana y, por ejemplo, en el caso de terpenos y flavonoides, pueden llegar a contribuir de forma sinérgica con la actividad beneficiosa atribuida a los cannabinoides (Russo, 2011).

Hasta el momento, se han identificado hasta 100 terpenos diferentes en la planta. Entre ellos, los más destacables son el pineno, que se caracteriza por un efecto antiséptico, y el mirceno, al cual se le atribuyen propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Clarke y Watson, 2007).

Otros compuestos de interés son los ácidos grasos presentes en las semillas del cáñamo. Los aceites de semillas de cáñamo presentan una alta estabilidad a la oxidación y suelen ser ricos en ácido linoleico (ω -6) y α -linolénico (ω -3) (Cheng Hao, Gu y Xiao, 2015).

1.1.3 Cultivo, procesado y almacenamiento

En general, el cannabis es una planta que tolera bien los cambios de clima. Si bien se conoce que la mayoría de cannabinoides se concentran en las flores de la planta (Hemphill et al., 1980), su concentración en las hojas también puede llegar a ser importante. En menor concentración, también pueden encontrarse tanto en los tallos como en las raíces de la planta. Sin embargo, este tipo de compuestos no están presentes en las semillas (Russo y Marcu, 2017).

El ciclo vital que sigue el cannabis se basa en que germina, crece, florece y muere durante el transcurso de un año. Uno de los problemas de su cultivo en el exterior es la dificultad de mantener un perfil químico constante en la planta por la variabilidad de las condiciones ambientales. Sin embargo, un cultivo en invernadero permite un mejor control de las condiciones de cultivo (ElSohly et al., 2017).

En 1976, Fairbairn et al. demostraron que se producen pérdidas significativas de cannabinoides debido tanto a la exposición a la luz como al aire atmosférico. En el caso del Δ^9 -THC, su concentración puede verse alterada debido a que es un compuesto termolábil, sensible al oxígeno y a la luz, por lo que puede sufrir un proceso de degradación oxidativa a CBN tras un almacenamiento prolongado o experimentar un proceso de isomerización a Δ^8 -THC (Glivar et al., 2020). Por otra parte, la concentración de CBDA cuando se expone a la luz también disminuye (Thomas y ElSohly, 2016). Teniendo en cuenta estos aspectos, las condiciones preferidas para el almacenamiento de la planta son bajas temperaturas y ausencia de luz.

1.1.4 Taxonomía del *Cannabis sativa* L.

En 1783, después de comparar variedades de cáñamo indio y europeo, Lamarck observó diferencias entre la planta europea y la procedente de la India, por lo cual denominó a esta última *Cannabis indica*, mientras que en 1924 el botánico ruso Janischevsky indicó que existía una nueva especie en Asia con características diferentes a las demás que nombró *Cannabis ruderalis* (Small et al., 1975).

Actualmente, no existe un total acuerdo sobre la clasificación de las especies del género *Cannabis*. La taxonomía continúa cambiando y la discusión hace referencia a la existencia de 2 o 3 especies (Figura 15), aunque hay autores que indican que lo que se consideran 3 especies en realidad son 3 variedades de la especie *Cannabis sativa* L. (McPartland, 2018).

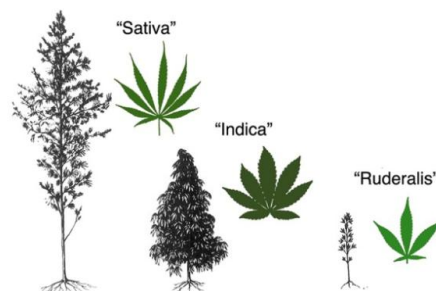


Figura 15. Taxonomía del cannabis basada en la existencia de tres especies (McPartland, 2018).

Debido a la falta de un criterio único a la hora de clasificar la planta, existen clasificaciones basadas en aspectos muy diversos. Una de las más habituales se basa en criterios morfológicos, como la altura y el grado de ramificación (Schultes, 1970). Este sistema distingue 3 especies del cannabis:

- *Cannabis sativa*: plantas altas, poco ramificadas con hojas largas.
- *Cannabis indica*: plantas pequeñas, con ramas cortas y brotes más densos.
- *Cannabis ruderalis*: plantas muy pequeñas, sin ramas y con hojas de un tamaño menor en comparación con las anteriores.

Otros sistemas de clasificación se desarrollaron para discriminar entre las diferentes variedades de cannabis, sobre todo entre las que podrían situarse como "tipo droga" o "tipo fibra". Este tipo de clasificación implica la determinación de la relación THC/CBD en una planta y asignarla a un fenotipo químico o "quimiotipo" (Small, et al., 1975). En 1971, Fetterman et al. describieron diferentes fenotipos basados en diferencias cuantitativas en el contenido de los principales cannabinoides y fue el primero en distinguir cannabis de "tipo droga" y de "tipo fibra". En 1973, Small y Beckstead utilizaron los niveles por separado de Δ^9 -THC y CBD para distinguir entre los diferentes quimiotipos. En cambio, otros autores

como Fournier y Paris (1979) optaron por usar niveles más altos de Δ^9 -THC para discriminar entre las variedades mencionadas (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de fenotipos químicos de la planta *Cannabis sativa* L. según Small y Beckstead (1973) y Fournier y Paris (1979).

Fenotipos	[THC] (%)	[CBD] (%)	[THC] / [CBD]	Referencias
<i>Droga</i>	> 0,3	< 0,5	-	Small y Beckstead, 1973
<i>Intermedio</i>	> 0,3	> 0,5	-	
<i>No-Droga</i>	< 0,3	> 0,5	-	
<i>Fibra</i>	< 0,5	> 0,5	< 1	Fournier y Paris, 1979
<i>Droga</i>	> 0,5	< 0,5	> 1	

En 2004, Hillig y Mahlberg identificaron 3 quimiotipos en función de la relación THC/CBD: una relación THC/CBD > 1 es característica de plantas clasificadas como "tipo droga" (quimiotipo I), una relación THC/CBD igual a 1 es para plantas "tipo intermedio" (quimiotipo II) y una relación THC/CBD < 1 es característica de las plantas "tipo fibra" (quimiotipo III). El uso de quimiotipos es útil a la hora de clasificar las diferentes variedades de *Cannabis sativa* L. Así, según la UNODC (*United Nation Office on Drugs and Crime*) (2009), para diferenciar entre cannabis "tipo droga" y "tipo fibra" se debe considerar el contenido en Δ^9 -THC, CBD y CBN (Ecuación 1):

$$X = \frac{[\text{THC}] + [\text{CBN}]}{[\text{CBD}]} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dado que el Δ^9 -THC tiende a oxidarse parcialmente formando CBN después de cortar y secar el material vegetal, se usa la suma de las áreas de los picos de los compuestos Δ^9 -THC y CBN obtenidos en el cromatograma y se divide por el área de CBD, lo cual permite determinar la variedad de cannabis analizada. Si se obtiene $X > 1$, la muestra de cannabis es de "tipo droga", un valor de $X < 1$ indica que es de "tipo fibra" y un valor de $X = 1$ señala que la muestra es de "tipo intermedio".

En la actualidad, aunque se han seleccionado y descrito otros nuevos quimiotipos de cannabis, se opta por una clasificación "monotípica", en la que se reconoce una especie, *Cannabis sativa* L., altamente polimórfica, que se clasifica en 3 quimiotipos en función del contenido en cannabinoides de la planta analizada (Aizpurua-Olaizola et al., 2016).

1.1.5 Legislación del cannabis

La legalidad referida al uso del *Cannabis sativa* L. lleva décadas causando controversia debido a que el cannabis es de las drogas más consumidas en todo el mundo. Así, la legislación varía significativamente de un país a otro.

En el año 1925 se situó, a nivel mundial, en la lista de drogas establecidas, restringiendo su uso únicamente para fines científicos (Plan Nacional sobre Drogas, 1925). Actualmente, tanto en la Unión Europea (UE) como en muchos países a nivel mundial, el cultivo de cáñamo está permitido si siguen la normativa correspondiente. En concreto, en la UE el contenido total de Δ^9 -THC en *Cannabis sativa* L. no debe exceder el límite del 0,2% en base seca (Reglamento (UE) N° 1307/2013).

En la UE cabe destacar el caso de los Países Bajos, donde la venta de cannabis está permitida en locales autorizados denominados *coffee-shops*. En otros países como Uruguay y Canadá ha sido completamente legalizado en la última década (EMCDDA, 2018).

Asimismo, algunos fármacos basados en cannabinoides como el CBD han sido desarrollados y aprobados para diferentes tratamientos, pero su venta está muy restringida por las diferentes limitaciones existentes en la legislación de cada país.

1.1.6 Propiedades farmacológicas del *Cannabis sativa* L.

Las propiedades terapéuticas del *Cannabis sativa* L. son uno de los principales aspectos que explican la gran popularidad de esta planta. El descubrimiento de los cannabinoides, la caracterización de su estructura química y el conocimiento sobre las relaciones estructura-actividad que dan lugar a los efectos de éstos, han permitido el diseño de compuestos análogos que han sido de gran utilidad en el estudio de las propiedades farmacológicas de estos compuestos (Flores-Sanchez y Verpoorte, 2008). Asimismo, se debe tener en cuenta el carácter hidrófobo de los cannabinoides, que limita su uso en algunos fármacos por su baja solubilidad en agua.

Los estudios actuales indican que los efectos farmacológicos de los cannabinoides presentes en cáñamo resultan de su capacidad para interactuar con el llamado sistema endocannabinoide, compuesto por receptores de cannabinoides, endocannabinoides y enzimas responsables de su síntesis y degradación (Radwan et al., 2021). Se trata de un sistema neuromodulador que juega un papel importante en el sistema nervioso central y en la respuesta a agresiones endógenas y ambientales (Lu y Mackie, 2017). Tanto el CBD como el Δ^9 -THC son capaces de interactuar con este sistema.

Desde un punto de vista farmacológico, el CBD es el compuesto más interesante, ya que presenta elevada actividad antioxidante y antiinflamatoria (Iffland y Grotenhermen, 2017), además de exhibir interesantes propiedades antibióticas, ansiolíticas y antiepilépticas (Lim et al., 2017).

El Δ^9 -THC, pese a ser psicoactivo, presenta propiedades muy diversas, ya que se puede usar como antiemético (Pertwee, 2008; Darmani, 2002), en el tratamiento del glaucoma (Tomida et al., 2004) y reduce el dolor en personas que padecen esclerosis múltiple (Zajicek et al., 2003). Por otro lado, el CBC exhibe actividad antiinflamatoria y antifúngica (Citti et al., 2018), mientras que el CBG actividad analgésica y antibacteriana (Andre et al., 2016).

Teniendo en cuenta las diferentes propiedades terapéuticas de los compuestos bioactivos presentes en *Cannabis sativa* L., se han llegado a desarrollar algunos fármacos, como por ejemplo Sativex y Epidiolex, aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos y por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), perteneciente a la UE, para tratar los síntomas de la esclerosis múltiple y la epilepsia, respectivamente.

1.2 Extracción sólido-líquido

La materia prima vegetal contiene normalmente pequeñas concentraciones de solutos de interés para diferentes industrias, hecho que justifica el desarrollo de procesos de separación para obtener un elevado rendimiento. La extracción de principios activos de materias primas vegetales por medio de disolventes apropiados es una operación unitaria habitual en la industria alimentaria (Romdhane y Gourdon, 2002). En la extracción sólido-líquido, los solutos migran del sólido (muestra) al líquido (disolvente de extracción) dependiendo de las propiedades fisicoquímicas tanto de los solutos como del disolvente.

1.2.1 Efecto de la temperatura, tiempo y ratio soluto:disolvente

El aislamiento de compuestos bioactivos y su separación de la matriz vegetal en ocasiones se complica debido a su sensibilidad a varios parámetros del proceso como la temperatura, el tiempo de extracción o el ratio soluto:disolvente (Agarwal et al., 2018).

La temperatura de extracción es una variable a tener en cuenta para minimizar el costo de energía del proceso. Muchos autores indican que un aumento en la temperatura del proceso favorece la extracción, aunque en el caso de compuestos bioactivos como los cannabinoides este parámetro debe controlarse adecuadamente debido a que al tratarse de compuestos termolábiles, pueden llegar a degradarse y/o sufrir importantes modificaciones en su estructura química (Veress et al., 1990).

Los métodos convencionales de extracción, como la extracción Soxhlet o la maceración, tienen como uno de los principales inconvenientes la necesidad de tiempos de extracción relativamente largos. En los últimos años, para superar estas limitaciones se han utilizado diferentes técnicas no convencionales que incluyen la extracción asistida por ultrasonidos, por microondas o la extracción mediante fluidos supercríticos (Azmir et al., 2013). De estos, la extracción asistida por ultrasonidos se ha utilizado ampliamente para la extracción de compuestos bioactivos con la finalidad de reducir, de forma considerable, los tiempos de extracción (Khan et al., 2010; Muñoz-Márquez et al., 2013).

El ratio soluto:disolvente también suele ser un parámetro importante a la hora de llevar a cabo el proceso de extracción. Cuando se realiza un estudio de optimización en el cual se considera esta variable, es importante utilizar un amplio rango de ratios soluto:disolvente que permitan efectuar un análisis adecuado de esta variable (Tzimas et al., 2021).

1.2.2 Extracción de compuestos bioactivos. Cannabinoides

En la extracción de compuestos bioactivos se utilizan disolventes con diferentes polaridades dependiendo de la naturaleza del compuesto de interés. El método más simple para la extracción de compuestos bioactivos a partir de plantas suele implicar la maceración en agua hasta la disolución de los constituyentes. Sin embargo, en el caso concreto de los cannabinoides es necesario aplicar métodos alternativos, utilizando diferentes disolventes orgánicos ya que la solubilidad de los cannabinoides en agua es muy baja (Lujan Ramirez et al., 2019).

El uso de disolventes orgánicos para la extracción de compuestos bioactivos, en general, puede presentar ventajas, como su bajo coste y la facilidad de trabajar con ellos, evitando el uso de equipos sofisticados. Sin embargo, su inflamabilidad y potencial toxicidad pueden conllevar serios riesgos para la salud y provocar un considerable impacto medioambiental.

Para el proceso de extracción de los principales compuestos presentes en la planta *Cannabis sativa* L., se pueden encontrar métodos muy diversos en la literatura. No obstante, antes de llevar a cabo el método de extracción de cannabinoides seleccionado, las muestras de *Cannabis sativa* L. deben seguir un tratamiento adecuado. A día de hoy, no existe homogeneidad en cuanto al método de extracción a aplicar. En Europa, los dos únicos protocolos que suelen ser utilizados como referencia se basan en el método establecido por la Unión Europea para determinar el contenido de Δ^9 -THC en cannabis y la monografía de cannabis de la Farmacopea alemana (Reglamento (CE) N° 1177/2000; German Pharmacopoeia, 2018).

1.2.3 Ultrasonidos de potencia. Uso en la extracción de cannabinoides

En el intento de mejorar el proceso de extracción, tanto para el aislamiento de analitos del material vegetal como para reducir inconvenientes de los métodos clásicos de extracción, se han implementado métodos de extracción innovadores como la extracción asistida por ultrasonidos (US) (Wianowska et al., 2015). Se pueden distinguir dos tipos de ultrasonidos a partir de su intensidad y frecuencia. Por una parte, se encuentran los ultrasonidos de baja potencia, con frecuencias comprendidas entre los 500 kHz y 10 MHz y, por otro lado, los ultrasonidos de potencia o de alta intensidad, con frecuencias entre los 20 y 100 kHz. Estos últimos pueden producir cambios en las diferentes propiedades del material analizado, dando lugar a diferentes aplicaciones en la industria alimentaria (Awad et al., 2012).

Los ultrasonidos están compuestos por ondas sonoras con una frecuencia que supera el límite del oído humano. Como otras ondas, los ultrasonidos pasan a través de un medio creando compresión y expansión. Este proceso produce un fenómeno llamado cavitación, que significa la producción, crecimiento y colapso de burbujas (Figura 16). Cuando estas burbujas alcanzan un punto inestable, liberan altas temperaturas y presiones por implosión. Este fenómeno puede romper las paredes celulares y favorecer la liberación de metabolitos de la muestra al disolvente (Lefebvre, Destandau y Lesellier, 2021).

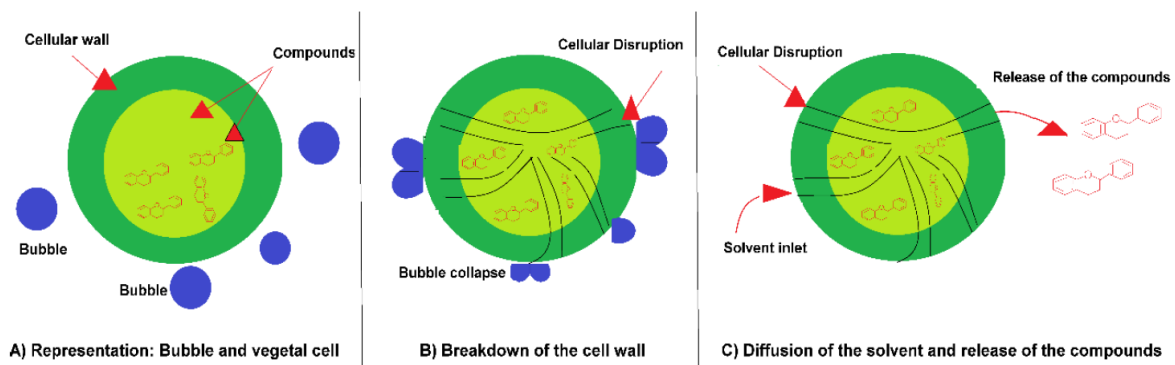


Figura 16. Cavitación, difusión del disolvente y liberación de los compuestos de interés (Medina-Torres et al., 2017).

Los parámetros que afectan a la cavitación también afectan el proceso de extracción realizado mediante ultrasonidos. Además de los parámetros que rigen la acción del ultrasonido (como la frecuencia y la amplitud de la onda), otros factores como la temperatura, la presión y la potencia ultrasónica también afectan a la extracción.

Las ventajas del uso de ultrasonidos en la extracción de cannabinoides incluyen una disminución de la temperatura, la selectividad del proceso y el tamaño reducido del equipo (Kenari y Dehghan, 2020). Además, la extracción asistida por ultrasonidos es una técnica que reduce el tiempo de trabajo y el uso de disolventes, simplificando la operación y mejorando significativamente el rendimiento del proceso (Chemat et al., 2017).

A partir de los datos publicados en los últimos años, se observa como los ultrasonidos están siendo aplicados en diferentes estudios basados en la extracción de compuestos cannabinoides (Nahar et al., 2021; Valizadehderakhshan et al., 2021).

1.3 Metodología de superficie de respuesta

En los últimos años, diferentes herramientas quimiométricas han sido aplicadas con frecuencia para la optimización de métodos analíticos considerando sus ventajas, como la reducción del número de experimentos a realizar, lo cual se traduce en un menor consumo

de reactivos y la reducción del trabajo de laboratorio. La optimización se refiere a la mejora de un sistema o proceso con el objetivo de obtener el máximo beneficio de éste. A la hora de realizar un análisis, este término se refiere la búsqueda de las condiciones óptimas en las cuales un procedimiento permite obtener la mejor respuesta posible (Bezerra et al., 2008).

Generalmente, el problema de las estrategias de optimización tradicionales es que no son capaces de determinar las interacciones entre diferentes variables. Por el contrario, las técnicas multivariantes, predominantemente la metodología de superficie de respuesta (RSM), permiten obtener las condiciones óptimas del proceso teniendo en cuenta las diferentes interacciones (Tzimas et al., 2021). Durante el procedimiento de optimización multivariante, existen dos tipos de variables: las respuestas (variables dependientes) y las variables independientes. Los valores de las respuestas dependen de los niveles de las variables independientes, que pueden ser cualitativas o cuantitativas (Ferreira et al., 2007).

La metodología de superficie de respuesta (RSM) se puede utilizar con el fin de optimizar los rendimientos de extracción de diferentes compuestos, siendo esta metodología un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas que se basan en el ajuste de los datos experimentales a una ecuación polinómica, utilizada en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influenciada por múltiples variables (Bezerra et al., 2008).

Para aproximar una función de respuesta a los datos experimentales, en el caso de que no puedan ser descritos por funciones lineales, se deben utilizar diseños experimentales de modelos de segundo orden como, por ejemplo, un diseño de Box-Behnken o de composición central (Bezerra et al., 2008). Cada vez es más habitual el uso de diseños de Box-Behnken dado que suelen presentar menos puntos experimentales que los de composición central, por lo cual su ejecución es menos costosa contando con la misma cantidad de variables. Además, la comparación entre ambos diseños ha demostrado que la matriz del diseño de Box-Behnken es ligeramente más eficiente y no contiene combinaciones para las cuales todas las variables están simultáneamente en sus niveles más altos o más bajos, siendo estos diseños útiles para evitar experimentos en condiciones extremas en las que pueden producirse resultados insatisfactorios (Ferreira et al., 2007).

1.3.1 Diseño de Box-Behnken

El diseño de Box-Behnken (Figura 17) es una clase de diseño de segundo orden basado en diseños factoriales de 3 niveles (Ferreira et al., 2007). Es una herramienta de RSM que ha sido ampliamente utilizado por los investigadores para la optimización de ensayos experimentales (Bezerra et al., 2008).

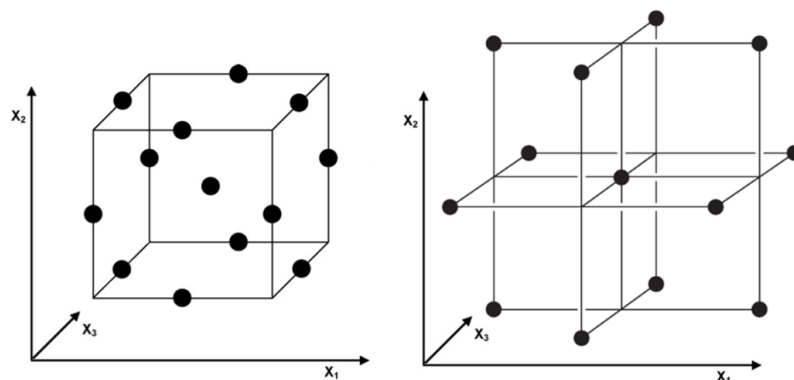


Figura 17. Representaciones gráficas del diseño de Box-Behnken para 3 variables.

El número de experimentos (N) necesarios para el desarrollo del método se define como $N = 2k(k - 1) + C_0$, donde k es el número de variables independientes y C_0 es el número de repeticiones del punto central (Ferreira et al., 2007). El modelo polinomial utilizado en el análisis de superficie de respuesta se explica mediante la Ecuación 2:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde Y hace referencia a las diferentes respuestas estudiadas, β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes de regresión para los términos de intersección, lineales, cuadráticos y la interacción entre i y j respectivamente, y X_i y X_j representan las variables independientes utilizadas en el estudio ($i \neq j$) (Peng et al., 2020).

Las variables independientes son estudiadas en tres niveles equidistantes (-1, 0, 1). La Tabla 2 contiene los valores codificados para un diseño de Box-Behnken de un sistema de tres variables, donde se observa que únicamente es necesario llevar a cabo 12 experimentos y 3 repeticiones del punto central.

Tabla 2. Valores codificados para un diseño Box-Behnken para 3 variables.

Experimento	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0

El diseño de Box-Behnken se ha utilizado ampliamente en diferentes ámbitos para optimizar los procesos de extracción de compuestos bioactivos, como polisacáridos o compuestos fenólicos, entre otros (Ahmad et al., 2015). La investigación sobre la optimización mediante RSM de la extracción de *Cannabis sativa* L. con fines analíticos es bastante escasa, aunque en la bibliografía se pueden encontrar algunos artículos en los últimos años donde se aplican diseños de optimización (Agarwal et al., 2018; Kenari y Dehghan, 2020; Tzimas et al., 2021).

2. Objetivos

En los últimos años, la planta *Cannabis sativa* L. ha ido adquiriendo una notable importancia debido principalmente a la presencia de cannabinoides, compuestos con un gran potencial para ser utilizados en ámbitos muy diversos.

El presente trabajo, se enmarca dentro de las líneas de investigación que, en los dos últimos años, viene desarrollando el grupo de Ingeniería Agroalimentaria de la Universidad de las Illes Balears en colaboración con la empresa Natural Healthy Cannabis Corporation SL.

En este contexto, el principal objetivo de este estudio consiste en **llevar a cabo la optimización del proceso de extracción, asistido acústicamente, de los principales cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L.** Optimización en el sentido de establecer las condiciones de operación que permitan obtener los mayores rendimientos posibles de los compuestos cannabinoides seleccionados.

Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Llevar a cabo la caracterización inicial de la muestra de *Cannabis sativa* L., con el objetivo de identificar y cuantificar los principales cannabinoides presentes en la muestra.
- Realizar la selección de las variables de operación que tengan una mayor influencia en el proceso de extracción de cannabinoides; así como de los niveles que determinan su rango de aplicación.
- Aplicar la metodología de superficie de respuesta (RSM) a partir de un diseño experimental de tipo Box-Behnken, desarrollando modelos de superficie de respuesta que permitan, por una parte, pronosticar los rendimientos de extracción tanto de cannabinoides individuales como de la totalidad de cannabinoides, y por otra, determinar las condiciones óptimas para obtener la máxima cantidad posible de estos compuestos.
- Validar experimentalmente los modelos polinomiales de superficie de respuesta desarrollados a partir de las condiciones óptimas encontradas para cada una de las respuestas analizadas.

3. Materiales y métodos

3.1 Materia prima

Las muestras de *Cannabis sativa* L. utilizadas en este trabajo fueron suministradas por un productor autorizado español, en concreto la empresa Natural Healthy Cannabis Corporation SL, ubicada en el municipio de Pollença (Mallorca).

La variedad de cáñamo industrial cultivada fue recolectada durante la etapa de floración de la planta. En concreto, la variedad suministrada por la empresa fue KC DORA, certificada conforme a las normas de la Unión Europea (UE) e incluida en la lista de variedades autorizadas por la UE publicada en el Catálogo común de variedades de especies de plantas agrícolas (Common catalogue of varieties of agricultural plant species, 2020).

Para este trabajo, el productor antes mencionado proporcionó 8 muestras de la misma variedad de *Cannabis sativa* L. recogidas de diferentes zonas del cultivo. A partir de las muestras, se preparó una mezcla homogénea utilizando las hojas y las inflorescencias de las plantas suministradas.

En concreto, la preparación de la muestra se llevó a cabo de acuerdo con el método de la UE establecido por la Comisión Europea para la determinación cuantitativa del contenido de Δ^9 -THC en cáñamo (Reglamento (CE) N° 1177/2000). En las diferentes muestras de *Cannabis sativa* L. se separaron las hojas y las inflorescencias de la planta, eliminando los tallos y las semillas de más de 2 mm, y se secaron en estufa durante 24 horas a 40 °C. Posteriormente, la muestra se sometió a un proceso de trituración, hasta obtener un polvo semifino, el cual fue tamizado utilizando un tamiz de 1 mm de malla. Así, la muestra final consistió en una mezcla pulverizada y homogénea (Figura 18), la cual se conservó en un recipiente hermético de plástico en un lugar seco, en ausencia de luz y a temperatura ambiente, hasta su procesado.



Figura 18. Acondicionamiento de la muestra para su posterior análisis.

3.2 Equipo experimental

3.2.1 Equipo de extracción acústica

El equipo utilizado para realizar las diferentes extracciones de cannabinoides mediante asistencia acústica se muestra en la Figura 19. Este equipo consta de un vaso encamisado de 100 mL conectado a un baño termostático de recirculación, el cual permite controlar la temperatura durante el proceso de extracción.

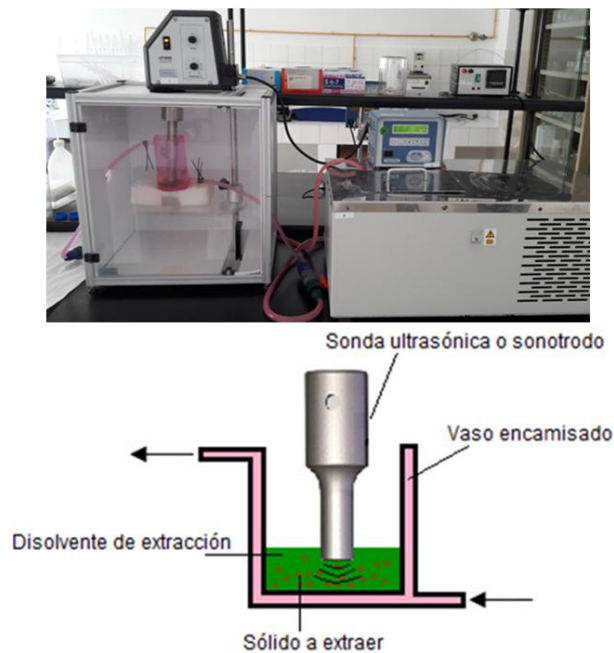


Figura 19. Montaje del sistema de extracción y dibujo del equipo de ultrasonidos.

La aplicación de los ultrasonidos de potencia se realizó mediante una sonda ultrasónica o sonotrodo de titanio con una potencia de 400 W, 22 mm de diámetro y una longitud de 100 mm (Figura 20) situado siempre en la misma posición en el eje central del vaso.



Figura 20. Sonotrodo utilizado en los experimentos de extracción asistida por ultrasonidos.

Con el fin de determinar la densidad de la potencia acústica (W/L) suministrada se utilizó una técnica calorimétrica que consiste en medir el incremento de temperatura durante los primeros 300 s de aplicación de los ultrasonidos (Arzeni et al., 2012). El cálculo de la potencia acústica se realizó utilizando la Ecuación 3 (Arzeni et al., 2012), a partir de la curva de temperatura-tiempo determinada experimentalmente por triplicado:

$$P = mC_p \frac{dT}{dt} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde P es la potencia acústica (medida en J/s o W), m es la masa del disolvente (en kg), C_p es la capacidad calorífica del disolvente (medida en J/kg·K), dT es el diferencial de temperatura (en °C) y dt el diferencial de tiempo (en s).

A partir de la capacidad calorífica (C_p) y el volumen usado de acetonitrilo, utilizando la Ecuación 3 se pudo calcular este parámetro. En la Tabla 3 se muestra la densidad de la potencia acústica obtenida.

Tabla 3. Densidad acústica aplicada al sistema de extracción.

Sonda (diámetro mm)	Densidad potencia acústica (W/L)
22	31 ± 3

3.3 Metodología analítica

3.3.1 Contenido en humedad

La determinación experimental del contenido de humedad de la muestra de cáñamo utilizada se realizó siguiendo el método de la UE establecido por la Comisión Europea para la determinación cuantitativa del contenido de Δ^9 -THC en cáñamo (Reglamento (CE) N° 1177/2000). Se pesaron aproximadamente 5 g de material vegetal y se deshidrató en una estufa a 40 °C hasta peso constante durante 24 h, ya que el método indica que la temperatura debe ser inferior a los 70 °C debido a que temperaturas superiores conducen a la modificación de la composición química del producto seco (Kwaśnica et al., 2020). A partir de la variación de peso se determinó el valor del contenido de humedad, siendo expresado el resultado, en base seca, como masa de agua dividido por masa de sólido seco (g agua/g ss). El contenido de humedad en base seca fue de $4,7 \pm 0,4$ g agua/g ss. El bajo contenido de humedad observado, inferior al límite establecido por la normativa europea (Reglamento (CE) N° 1177/2000), indica que el acondicionamiento realizado fue adecuado.

3.3.2 Extracción de cannabinoides. Caracterización de la muestra de *Cannabis sativa* L.

Con el fin de evaluar el contenido de los principales cannabinoides presente en la muestra de cáñamo, se llevó a cabo una caracterización inicial de la muestra por triplicado (Figura 21). Para ello, a partir de la muestra homogénea de *Cannabis sativa* L., se determinaron los contenidos de CBD, Δ^9 -THC y CBN, así como el contenido total de los cannabinoides analizados. Es importante señalar que en este trabajo la expresión "contenido total de cannabinoides" corresponde a la suma de los 3 cannabinoides mencionados, dado que en todas las extracciones efectuadas estos compuestos representaron entre el 95% y el 98% del total de cannabinoides presentes.

Para llevar a cabo la caracterización de la muestra, la extracción de los cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L. se realizó de acuerdo a la metodología de la UE establecida por la Comisión Europea para la determinación cuantitativa del contenido de Δ^9 -THC en cáñamo (Reglamento (CE) N° 1177/2000), sustituyendo el disolvente de extracción utilizado. Aproximadamente 0,2 g de muestra de *Cannabis sativa* L. en polvo fueron situados en 10 mL de acetonitrilo; este disolvente orgánico fue utilizado en lugar de hexano principalmente debido a que es menos perjudicial para la salud y ha mostrado en diferentes estudios que, junto a otros disolventes de mayor polaridad que el hexano, da lugar a unos mayores rendimientos de extracción de los cannabinoides de interés (Restek, 2014; Lujan Ramirez et al., 2019).

El proceso de extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente, utilizando un baño ultrasónico a potencia constante durante 20 min. Posteriormente, se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm y se recogió el sobrenadante, que fue filtrado con un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,45 μm y almacenado en el congelador a -20 °C hasta su posterior análisis mediante cromatografía de gases.

Para llevar a cabo los diferentes experimentos indicados en el diseño de Box-Behnken se siguió el mismo protocolo. Sin embargo, el proceso de extracción se realizó con asistencia

acústica (Figura 19) proporcionada por una sonda ultrasónica en lugar de utilizar el baño de ultrasonidos indicado en la normativa (Reglamento (CE) N° 1177/2000), ya que la sonicación con sonda permite un contacto directo con la muestra mientras que el uso del baño de ultrasonidos proporciona una sonicación relativamente débil y una distribución no tan uniforme de los ultrasonidos de potencia.



Figura 21. Procedimiento experimental utilizado para la caracterización del contenido de cannabinoides presentes en la muestra de cáñamo.

3.3.3 Análisis mediante cromatografía de gases

Los extractos de *Cannabis sativa* L. en acetonitrilo fueron diluidos en una proporción 1:20 antes de introducir las diluciones en viales para su posterior inyección y análisis mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).

El análisis se realizó con una columna capilar SC-5 MS (Scharlab) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor, fase estacionaria 5% fenil-95% metilpolisiloxano y un cromatógrafo GC Agilent 5890 (Figura 22). El detector utilizado fue el FID, antes mencionado (H_2 + aire sintético), utilizando helio (He) como gas portador, y un muestreador automático acoplado al cromatógrafo (7683B Agilent).

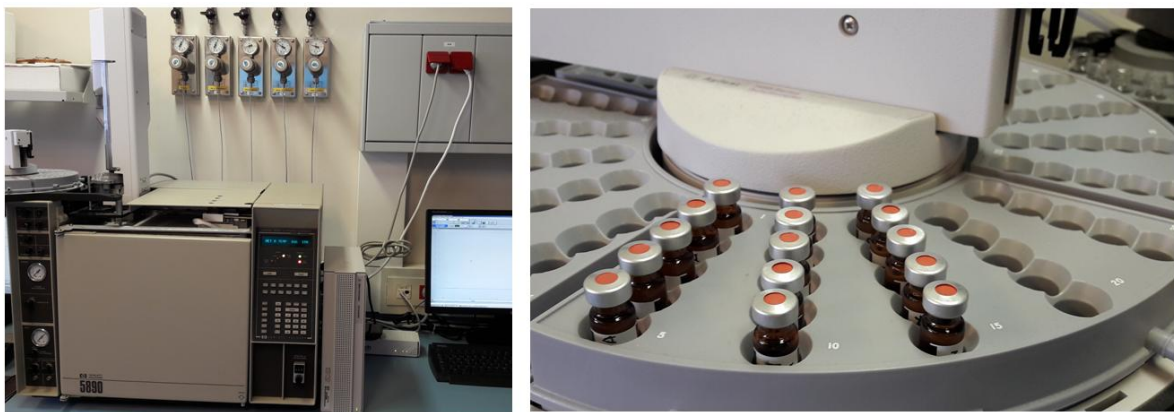


Figura 22. Cromatógrafo utilizado para el análisis por GC y muestreador automático del equipo.

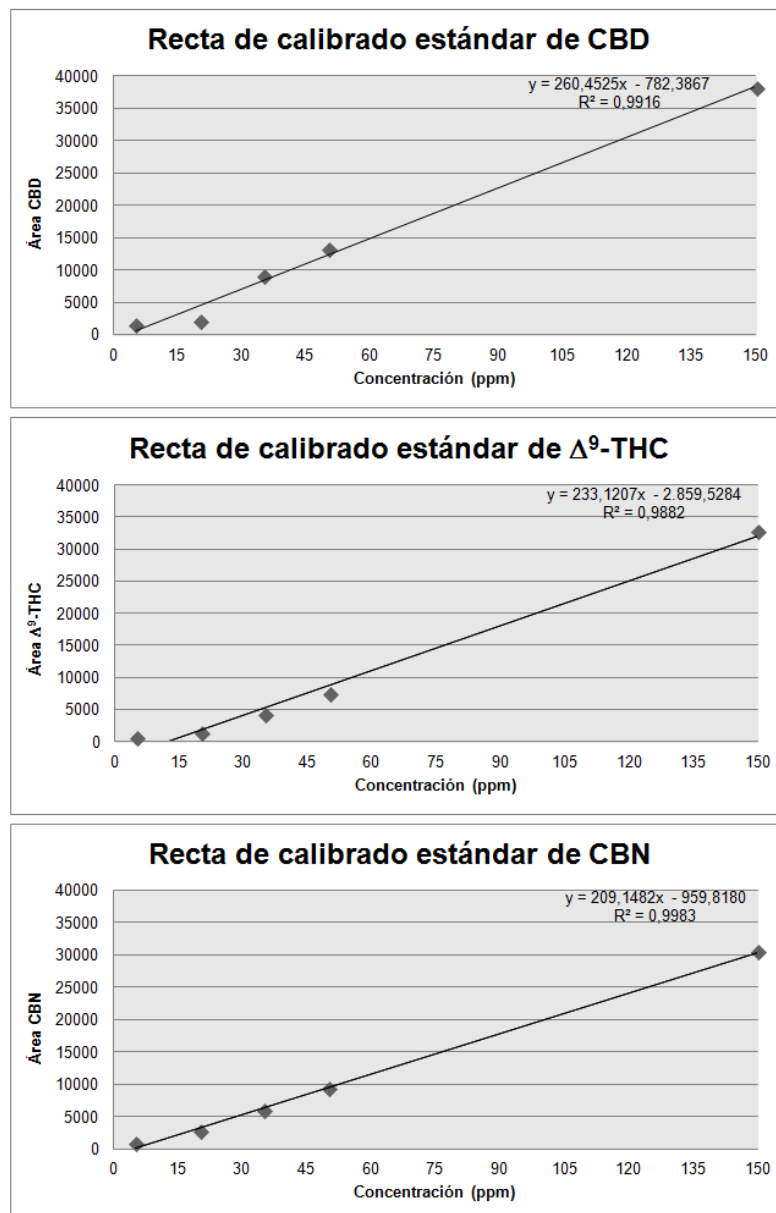
El equipo de GC se configuró utilizando los siguientes ajustes basados en el método de la UE establecido por la Comisión Europea para la determinación cuantitativa del contenido de Δ^9 -THC en cáñamo (Reglamento (CE) N° 1177/2000), con algunas modificaciones realizadas en base a las condiciones propuestas por Sánchez-Carnerero Callado et al. (2018) para el análisis de otros cannabinoides (como el CBD y el CBN), además de Δ^9 -THC (Tabla 4).

Posteriormente, a partir de 3 disoluciones estándar de CBD, Δ^9 -THC y CBN en acetonitrilo de 1000 ppm (1000 mg/L) se prepararon 5 disoluciones diferentes de menor concentración y se introdujeron en viales para su inyección en el cromatógrafo y obtener así las curvas de calibrado correspondientes a cada uno de los cannabinoides de interés (Figura 23).

Tabla 4. Condiciones del equipo para llevar a cabo el análisis mediante GC-FID.

Temperatura detector	300 °C
Temperatura inyector	300 °C
Caudal gas portador	1,3 mL/min
Relación de split	Modo splitless
Programa/Gradiente de temperatura	Inicialmente se mantiene 2 min a T = 160 °C. Después, se aumenta 25 °C/min hasta 242 °C y 2 °C/min hasta 250 °C. Finalmente, se aumenta 25 °C/min hasta 300 °C y después se mantiene a 305 °C durante 5 min.
Volumen inyectado	1 µL
Tiempo total	25 min

En concreto, se prepararon disoluciones de 5, 20, 35, 50 y 150 ppm para poder cuantificar adecuadamente los contenidos de CBD, Δ^9 -THC y CBN presentes en la muestra de *Cannabis sativa* L. utilizada. La inyección de estas disoluciones se realizó por triplicado.

**Figura 23.** Curvas de calibrado correspondientes a los diferentes cannabinoides analizados.

3.3.4 Determinación del contenido de los cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L.

El cálculo del contenido de los diferentes cannabinoides presentes en la muestra de cáñamo se llevó a cabo a partir de las curvas de calibrado indicadas en la Figura 23 y la Ecuación 4:

$$\% (p/p) = \frac{\text{Concentración} \cdot V \cdot D}{m \cdot 10} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde Concentración se refiere a la concentración del cannabinoide analizado obtenida a partir de las curvas de calibrado (mg/L), V es el volumen del disolvente de extracción (L), D es el factor de dilución y m la masa de muestra (g). El factor 10 es necesario para obtener el porcentaje de cada cannabinoide a partir del resultado obtenido en mg cannabinoide/g muestra.

3.3.5 Microscopía electrónica de barrido

Con el fin de evaluar el efecto de los ultrasonidos sobre la microestructura del *Cannabis sativa* L., se estudiaron las muestras antes y después de la aplicación ultrasónica mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Hitachi S-3400N). Para ello, se llevaron a cabo micrografías a un aumento de 80x y 400x de las muestras sólidas en diferentes condiciones.

Así, se llevó a cabo el análisis de la muestra de cáñamo fresca, con anterioridad a la aplicación de los ultrasonidos, y de 3 muestras obtenidas después de realizar la extracción a 3 temperaturas diferentes, pero aplicando el mismo tiempo de extracción. En concreto, se observaron en el SEM tres muestras extraídas durante 15 min a 15, 25 y 35 °C.

La preparación de las 4 muestras analizadas consistió en su liofilización (para evitar interferencias) y fijación en el soporte correspondiente con adhesivos de carbón para seguidamente ser observadas directamente en el SEM, sin tratamiento adicional.

3.3.6 Metodología de Superficie de Respuesta (RSM). Diseño experimental

La técnica de RSM se utilizó para determinar las condiciones que optimizan las variables de respuesta seleccionadas, tanto para la extracción de cada uno de los cannabinoides de interés como de su totalidad. Las extracciones se realizaron a partir de la muestra pulverizada con asistencia acústica, tal como se ha explicado previamente. La RSM se utiliza para determinar los efectos de las variables independientes en el proceso y estimar las condiciones óptimas para el proceso de extracción, realizando el menor número de experimentos posible.

En el presente trabajo, el diseño propuesto para desarrollar la RSM fue un diseño de Box-Behnken de 3 variables aplicado al proceso de extracción de cannabinoides con acetonitrilo mediante asistencia ultrasónica. El modelo polinomial generalizado de segundo orden utilizado en el análisis de superficie de respuesta se basa en la Ecuación 2.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Ecuación 2})$$

En concreto, en este estudio se examinaron los efectos de la temperatura de extracción (X_1), el tiempo de extracción (X_2) y el ratio soluto:disolvente (X_3) sobre las variables de respuesta. Las respuestas evaluadas en este trabajo fueron los contenidos individuales de CBD, CBN y Δ^9 -THC, así como el contenido total de estos cannabinoides.

La codificación se lleva a cabo con el fin de ajustar los niveles de cada variable a la matriz experimental. Este proceso consiste en transformar cada valor real estudiado en coordenadas dentro de una escala de valores adimensionales. La codificación se realizó a partir de la ecuación utilizada por Bezerra et al. (2008) (Ecuación 5):

$$X = \frac{X_i - X_i^0}{\Delta X_i} \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde X es el valor codificado de un nivel determinado, X_i es el valor real del nivel correspondiente, X_i^0 es el valor real del nivel en el punto central del dominio experimental y ΔX_i es la distancia entre el valor real en el punto central y el valor real en el nivel superior o inferior de una variable.

Las variables independientes utilizadas en el diseño de Box-Behnken para la extracción de cannabinoides de *Cannabis sativa* L. y los 3 niveles en los que fueron estudiadas las variables para llevar a cabo el análisis, basados en valores bibliográficos y experimentos preliminares, se muestran en la Tabla 5. La codificación utilizada para el ratio soluto:disolvente se indica en mL/g para poder estudiar las variables independientes en 3 niveles equidistantes, aunque el análisis de esta variable se basa en su inversa, es decir, 1: X_3 (g/mL).

La matriz experimental del diseño de Box-Behnken utilizada para la extracción de cannabinoides, a partir de *Cannabis sativa* L., se indica en la Tabla 2. El diseño experimental estuvo formado por 15 puntos experimentales: 12 puntos factoriales y 3 repeticiones del punto central.

Tabla 5. Niveles y codificación de las variables estudiadas.

Variables	Unidades	Codificación	Niveles		
			-1	0	1
Temperatura	°C	X_1	15	25	35
Tiempo	min	X_2	5	10	15
Soluto:disolvente	mL/g	X_3	20	50	80

3.3.7 Análisis estadístico

Para analizar la regresión lineal múltiple de los diseños de la RSM se realizó un análisis de varianza (ANOVA), utilizada también para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los datos. Los coeficientes de determinación para los términos lineales, cuadráticos y de interacción también se determinaron a partir de la regresión lineal múltiple y las condiciones óptimas de extracción se estimaron mediante análisis de regresión y gráficos de superficie de respuesta en 3D.

Además, a partir de los datos del ANOVA se realizó el análisis de la falta de ajuste (LOF) de los modelos desarrollados junto con los diferentes coeficientes de determinación (R^2), con el objetivo de comprobar si estos se ajustaban correctamente a los datos experimentales.

La totalidad del análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del software Design-Expert 13.0 (Stat-Ease, EE.UU.) y del software Minitab (Minitab LLC., EE.UU.) y las diferencias existentes se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

3.3.8 Optimización y validación de los modelos de superficie de respuesta

Una vez determinadas las condiciones óptimas de extracción, en aquellos casos donde fue posible, se realizaron experimentos adicionales (llevando a cabo 3 réplicas de cada uno) para comparar los valores obtenidos experimentalmente frente a los valores estimados. Para evaluar la calidad del ajuste de los valores experimentales a los valores estimados a partir de los diferentes modelos desarrollados, se utilizó el parámetro de error relativo medio (ERM) (Ecuación 6):

$$ERM (\%) = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{|Y_{exp} - Y_{calc}|}{Y_{exp}} \right)}{n} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

donde n es el número de experimentos, Y_{exp} hace referencia al valor obtenido experimentalmente y el término Y_{calc} al valor estimado obtenido a partir de los modelos formulados. Según Sulaiman et al. (2017), se consideran apropiados valores de este parámetro inferiores al 5%.

4. Resultados y discusión

En esta sección, se presentan y discuten los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo. En primer lugar, se analizan las imágenes adquiridas por SEM y se muestran los valores relativos a la caracterización inicial de la muestra de cáñamo, además de ser comparados con datos bibliográficos.

Posteriormente, con el objetivo de llevar a cabo la optimización del proceso de extracción con asistencia acústica de los principales cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L., se aplicó la metodología de superficie de respuesta (RSM), basada en un diseño de Box-Behnken. En este apartado se establecieron las variables de extracción utilizadas en el presente trabajo para optimizar dicho proceso, mostrando la aplicación del diseño experimental propuesto.

A partir de los resultados observados en el ANOVA, se ha realizado el análisis estadístico correspondiente en base a la significancia de los diferentes parámetros indicados para discutir la posibilidad de optimizar la extracción de los diferentes cannabinoides de interés. Mediante los diagramas de Pareto, se han establecido los términos que de forma individual afectan significativamente al proceso de extracción y, a partir de las diferentes gráficas de superficie de respuesta, se ha podido comprobar el efecto de las diferentes variables en las respuestas evaluadas. Finalmente, se ha llevado a cabo la optimización y validación de los modelos seleccionados en función de los resultados obtenidos.

4.1 Caracterización de la muestra de *Cannabis sativa* L.

4.1.1 Análisis mediante microscopía electrónica de barrido

Con el fin de evaluar el efecto de los ultrasonidos de potencia sobre las muestras de cáñamo, se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 24). Así, se tomaron micrografías tanto de la muestra fresca como de muestras después de ser sometidas a diferentes procesos de extracción.

Como se puede observar en las imágenes de la columna izquierda en la Figura 24, la muestra de cáñamo fresca presenta una estructura más compacta y una superficie no muy lisa con ligera presencia de pequeñas grietas. La misma muestra, después de ser sometida al proceso de extracción asistido acústicamente a diferentes temperaturas, en las imágenes se observa una superficie más rugosa, probablemente debido a la aplicación de los ultrasonidos.

Si se comparan las imágenes con mayor resolución, la muestra de cáñamo fresca presenta una estructura prácticamente sin grietas, lo que indica que no ha tenido lugar la rotura de un gran número de paredes celulares. Sin embargo, la aplicación de ultrasonidos da lugar a mayores diferencias en la microestructura de las muestras, observándose superficies mucho más agrietadas, sobre todo en los casos en que la temperatura aplicada en la extracción es mayor, siendo más perceptible la rotura de los tejidos vegetales y alteraciones de las paredes celulares en las extracciones llevadas a cabo a temperaturas de 25 y 35 °C.

Los resultados obtenidos coinciden con el trabajo realizado por Toma et al. (2001), basado en la evaluación del efecto de los ultrasonidos sobre diferentes tejidos vegetales. En el estudio se vio como el uso de ultrasonidos mejoraba el proceso de extracción a partir de la mayor fragmentación de los tejidos vegetales.

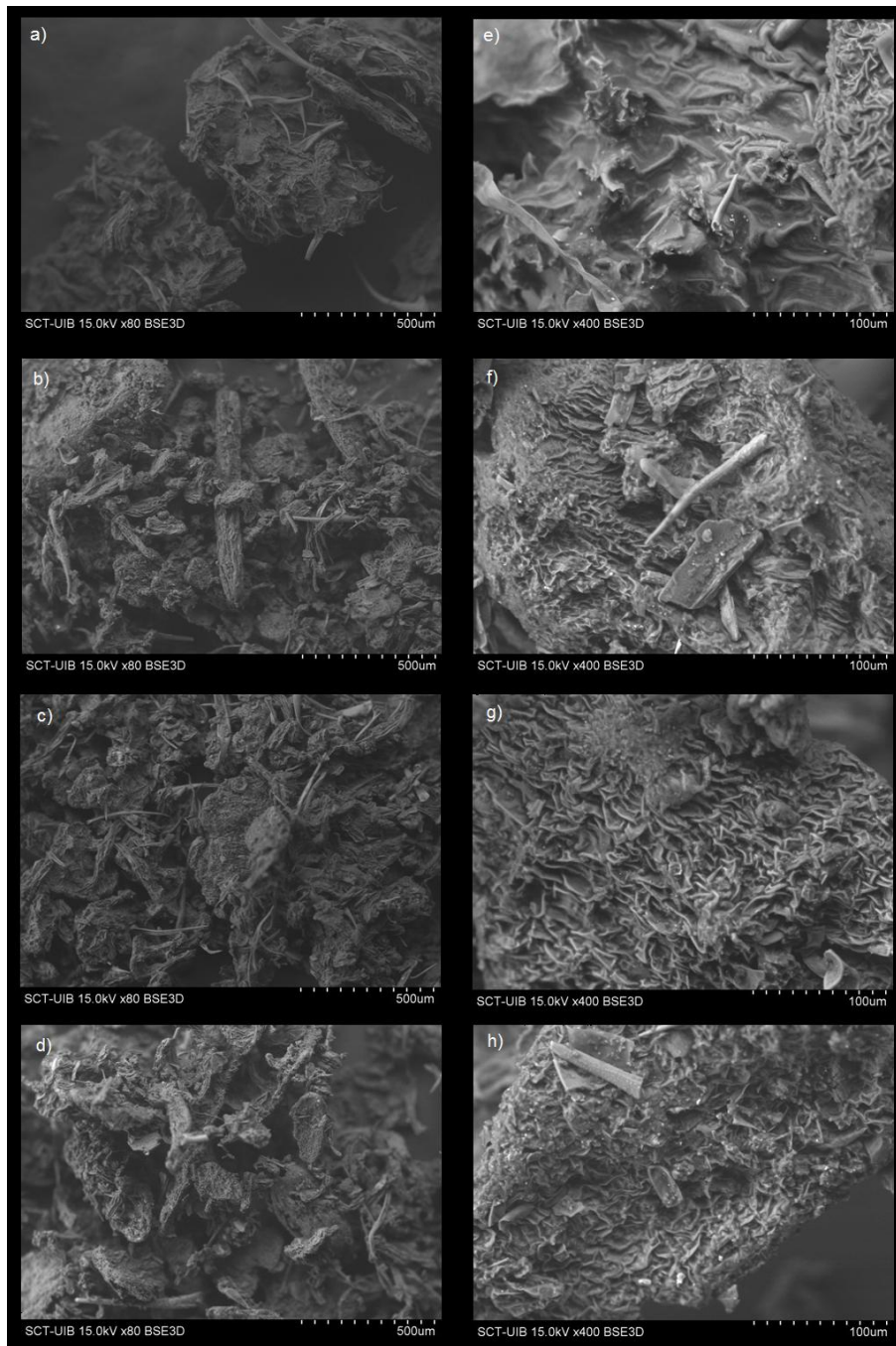


Figura 24. Imágenes de muestras de cáñamo tomadas con un SEM. Las imágenes de la columna izquierda se tomaron a menor resolución que las situadas en la derecha. (a)-(e) muestra fresca, (b)-(f) extracción con US a 15 °C y 15 min, (c)-(g) extracción con US a 25 °C y 15 min y (d)-(h) extracción con US a 35 °C y 15 min.

4.1.2 Caracterización inicial de la muestra. Principales compuestos cannabinoides

La caracterización inicial de la muestra de *Cannabis sativa* L. se llevó a cabo con el fin de evaluar el contenido de los principales compuestos cannabinoides presentes en la planta. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos relativos al contenido de CBD, Δ^9 -THC y CBN, así como al contenido total de estos compuestos, mientras que en la [Figura 25](#) se presenta el cromatograma de una de las muestras analizadas.

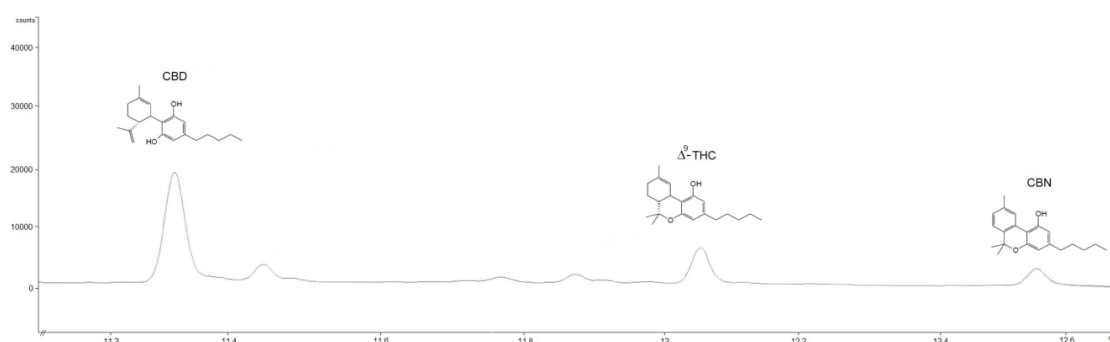


Figura 25. Cromatograma correspondiente a la muestra inicial de *Cannabis sativa* L.

Los resultados obtenidos en este estudio para la muestra de cáñamo analizado son, en general, similares a los resultados descritos en la bibliografía. No obstante, en algunos casos pueden observarse diferencias significativas entre los valores obtenidos para los distintos cannabinoides. Este hecho puede deberse no solo a las distintas variedades de cáñamo analizadas sino también a la falta de estandarización del método utilizado para el análisis de este tipo de compuestos (Citti et al., 2020).

Tabla 6. Contenido individual y total de los principales cannabinoides presentes en la muestra de cáñamo analizada.

Cannabinoides de interés (mg cannabinoide/100 mg muestra)	
CBD	9,1 ± 0,2
Δ ⁹ -THC	3,0 ± 0,2
CBN	1,1 ± 0,1
Total cannabinoides	13,2 ± 0,3

En particular, el contenido total de CBD en la muestra analizada es 9,1 ± 0,2%. Este valor es superior a los reportados tanto en el trabajo de Brighenti et al. (2017), en el cual el contenido varió entre 0,4 y 5,1%, dependiendo de la variedad de cáñamo analizada, así como en el de Tzimas et al. (2021), quienes observaron valores comprendidos entre 2,7 y 3,4%. Por el contrario, Glivar et al. (2020) obtuvieron resultados superiores para el CBD, situados en un rango de 4,7 y 9,6%, dependiendo también de la variedad de cáñamo cultivada.

Por otra parte, en gran parte de los trabajos de investigación el contenido de Δ⁹-THC presente en *Cannabis sativa* L. suele ser inferior al 0,2% establecido por la normativa (Reglamento (UE) N° 1307/2013). No obstante, es habitual encontrar estudios en los cuales se obtienen porcentajes de Δ⁹-THC similares o incluso superiores al valor de 3,0 ± 0,2% determinado en este trabajo. Por ejemplo, en el trabajo de Gallo-Molina et al. (2019) el contenido de Δ⁹-THC varió entre 1,6 y 7,0%, mientras que en el estudio de Glivar et al. (2020) los valores se situaron entre 0,2 y 2,5%, dependiendo de la variedad cultivada.

Respecto al CBN, se obtuvo un valor de 1,1 ± 0,1% en este trabajo. En el cannabis, este cannabinoide aparece normalmente en pequeñas proporciones o incluso no se detecta, como se puede observar en el artículo de Deville et al. (2020), en el cual se analizaron muestras muy diversas y los valores máximos de CBN se situaron entre el 0,1 y el 0,2%.

Los valores obtenidos experimentalmente en este trabajo (Tabla 6), sobre todo en el caso del Δ⁹-THC y el CBN, son relativamente elevados. Esto puede ser debido principalmente a múltiples factores como la variedad o las condiciones de almacenamiento, que pueden conllevar la descarboxilación de los cannabinoides estudiados y la degradación de Δ⁹-THC a

CBN, como se ha indicado en el apartado 1.1.2.1. Además, la técnica GC-FID establecida en el Reglamento (CE) N° 1177/2000 presenta como problema principal que la descarboxilación producida en la columna por las elevadas temperaturas alcanzadas puede no ser del todo completa y conllevar cierta variabilidad analítica (Citti et al., 2018; Citti et al., 2020; Dussy et al., 2005).

No obstante, pese a obtener unos porcentajes de Δ^9 -THC y CBN considerables, la planta de *Cannabis sativa* L. analizada sigue siendo considerada de tipo fibra si se tiene en cuenta la Ecuación 1 establecida por la UNODC para la clasificación de la planta.

4.2 Optimización del proceso de extracción

4.2.1 Elección de los niveles de estudio para las variables seleccionadas

Con el fin de delimitar el intervalo de estudio que permita llevar a cabo la optimización del proceso de extracción de cannabinoides de *Cannabis sativa* L., mediante asistencia acústica, se realizó un estudio previo de las principales variables que pueden afectar en mayor medida al procedimiento extractivo.

La finalidad de esta primera fase es la de seleccionar no solo las variables sino también definir los rangos adecuados que permitan la correcta aplicación del diseño de Box-Behnken, propuesto para optimizar la extracción de cannabinoides.

El objetivo que se persigue es la obtención de las condiciones óptimas que permitan llevar a cabo un proceso de extracción eficiente, utilizando la menor cantidad de disolvente posible, tiempos de extracción reducidos y bajas temperaturas (Kenari y Dehghan, 2020).

Los estudios basados en la optimización del proceso de extracción de cannabinoides presentes en cáñamo son bastante escasos y, de hecho, la mayor parte de estudios se han llevado a cabo en los últimos años. Por otra parte, se ha constatado el uso habitual de los ultrasonidos de potencia para aumentar la eficacia de los procesos extractivos de este tipo de compuestos bioactivos. A partir de una búsqueda bibliográfica se ha elaborado la Tabla 7, en la cual aparecen no solo los cannabinoides determinados sino también las diferentes condiciones de extracción aplicadas en diferentes artículos publicados en los últimos años. En todos estos trabajos se ha utilizado la asistencia de ultrasonidos de potencia.

Tabla 7. Extracción y determinación de cannabinoides a partir de *Cannabis sativa* L. con asistencia acústica. Compuestos determinados y condiciones de extracción.

Compuestos determinados	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Soluto:disolvente (g/mL)	Referencia bibliográfica
CBG, Δ^9 -THC	-	5, 10, 15	1:20	Agarwal et al., 2018
CBD, CBG	25	10, 20, 30, 45	1:5, 1:10	Barauskaite et al., 2020
CBD, CBDA, CBG, CBGA	40	15	1:40	Brighenti et al., 2017
CBD, CBDA, Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA	25	5	1:10	Lewis-Bakker et al., 2019
CBD, CBDA	20, 26, 35, 44, 50	5, 15, 30, 45	1:10, 1:28, 1:55, 1:82, 1:100	Tzimas et al., 2021
CBD, CBDA, CBG, CBGA, Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA	-	15	1:125	Zivovinic et al., 2018

Es importante destacar que de los diferentes artículos mencionados en la Tabla 7, solo en los trabajos de Agarwal et al., 2018, Lewis-Bakker et al., 2019 y Tzimas et al., 2021 se llevó a cabo la optimización de las condiciones de extracción. Por otra parte, en el trabajo de Tzimas et al. (2021) se aplicó la RSM para el análisis estadístico de la optimización del proceso de extracción, aunque únicamente para el compuesto CBD y su forma ácida (CBDA). En el presente trabajo, además de la aplicación del uso de ultrasonidos de potencia durante la extracción, se ha realizado un análisis estadístico de la optimización, basado en la RSM, del rendimiento de extracción de los tres cannabinoides individuales más importantes presentes en la planta (CBD, Δ^9 -THC y CBN). A partir de la información que aparece en la Tabla 7, se eligieron como principales variables relativas al proceso de extracción con ultrasonidos el ratio soluto:disolvente, temperatura y el tiempo de extracción.

En cuanto al ratio soluto:disolvente, las experiencias se llevaron a cabo dentro del rango comprendido entre 1:20 y 1:80 g/mL, de forma que incluyera la mayoría de valores observados en los diferentes estudios analizados. Para la temperatura, el rango de estudio estuvo comprendido entre 15 y 35 °C, considerando no solo los diferentes estudios realizados sino también las propiedades de los analitos objetivo y el disolvente utilizado.

Por otra parte, para definir los niveles de la variable tiempo se llevó a cabo un análisis experimental, estudiando el contenido de cannabinoides obtenidos mediante la extracción por ultrasonidos a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 20 min), manteniendo la temperatura de extracción y el ratio soluto:disolvente constantes a 25 °C y 1:50, respectivamente.

En la Figura 26 se muestran los resultados del estudio del efecto del tiempo sobre el rendimiento de extracción de los cannabinoides de interés. En las diferentes gráficas se puede observar como el máximo contenido tanto para CBD, Δ^9 -THC y CBN es prácticamente constante a partir de los 10 min de extracción. Por lo tanto, los resultados sugieren que un aumento del tiempo de extracción a partir de los 10 min no promueve un incremento significativo del rendimiento de los distintos cannabinoides. A partir de estos resultados, los niveles seleccionados para la variable tiempo de extracción estuvieron comprendidos entre los 5 y los 15 min.

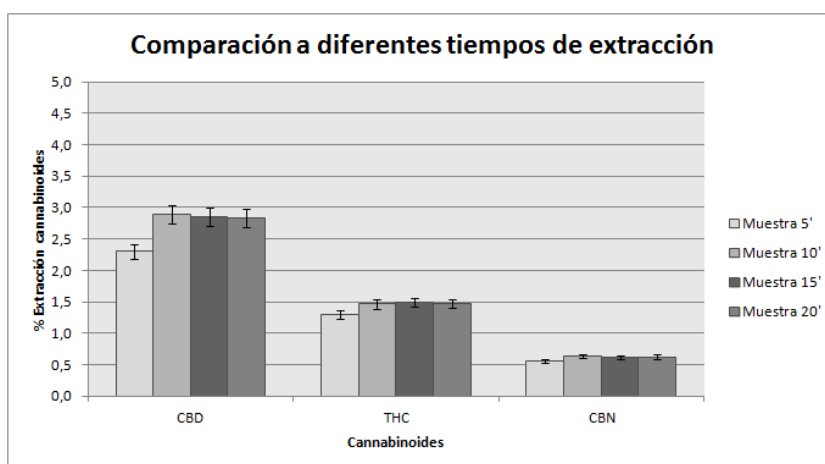


Figura 26. Relación entre rendimiento de extracción de los cannabinoides estudiados y tiempo de extracción.

4.2.2 Aplicación del diseño experimental

Una vez seleccionadas las principales variables con sus correspondientes niveles de estudio, la metodología de superficie de respuesta (RSM) fue utilizada para llevar a cabo la optimización del proceso de extracción de cannabinoides de la planta *Cannabis sativa* L.

mediante asistencia acústica. Con la finalidad de adaptar la RSM al proceso, se aplicó un diseño experimental, tipo Box-Behnken, que consta de 3 variables con 3 niveles cada una, además de 3 réplicas del punto central. Las respuestas seleccionadas fueron los contenidos individuales de CBD, Δ^9 -THC y CBN, así como el contenido total de cannabinoides.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de los 15 experimentos correspondientes al diseño de Box-Behnken, presentando tanto los valores obtenidos de forma experimental como los valores estimados para cada una de las respuestas, los cuales fueron calculados a partir de los datos que aparecen en el análisis de varianza (ANOVA) llevado a cabo en este trabajo.

Tabla 8. Diseño experimental de Box-Behnken. Resultados experimentales de las variables de respuesta en la extracción de cannabinoides y valores estimados a partir de los datos del ANOVA.

Experimento	Variables			Resultados experimentales				Resultados estimados			
	X ₁	X ₂	X ₃	% CBD	% Δ^9 -THC	% CBN	% Total	% CBD	% Δ^9 -THC	% CBN	% Total
1	-1	-1	0	1,98	2,06	1,41	5,45	2,07	2,21	1,46	5,74
2	1	-1	0	2,28	2,47	1,53	6,27	2,35	2,67	1,54	6,56
3	-1	1	0	2,86	2,78	1,49	7,14	2,79	2,57	1,48	6,85
4	1	1	0	3,42	2,96	1,59	7,98	3,33	2,81	1,54	7,69
5	-1	0	-1	8,89	2,76	0,88	12,53	8,76	2,75	0,83	12,34
6	1	0	-1	9,37	3,41	0,95	13,73	9,26	3,34	0,94	13,54
7	-1	0	1	3,00	3,19	1,61	7,80	3,11	3,26	1,62	7,99
8	1	0	1	3,30	3,36	1,62	8,28	3,43	3,37	1,67	8,47
9	0	-1	-1	8,31	3,09	0,79	12,19	8,35	2,95	0,79	12,09
10	0	1	-1	9,65	2,85	0,75	13,25	9,86	3,06	0,81	13,73
11	0	-1	1	3,48	3,29	1,62	8,39	3,28	3,08	1,56	7,91
12	0	1	1	3,51	3,33	1,56	8,41	3,47	3,47	1,56	8,51
13	0	0	0	4,35	2,66	1,17	8,19	4,45	2,74	1,15	8,33
14	0	0	0	4,50	2,76	1,14	8,39	4,45	2,74	1,15	8,33
15	0	0	0	4,49	2,79	1,14	8,42	4,45	2,74	1,15	8,33

En general, los resultados obtenidos mostraron cierta variabilidad con respecto al contenido en CBD y al contenido total de cannabinoides. Por el contrario, el contenido en Δ^9 -THC y CBN fue similar en la mayor parte de las extracciones efectuadas.

En concreto, en el caso del contenido en CBD presente en las diferentes extracciones, los valores obtenidos se situaron en un amplio rango comprendido entre el 1,98 y el 9,65% del material extraído. Por otra parte, el contenido en Δ^9 -THC varió entre el 2,06 y el 3,41%, mientras que para el CBN los valores estuvieron comprendidos entre el 0,75 y el 1,62%. Como consecuencia de lo anterior, el contenido total de los cannabinoides analizados presentó una importante variación situándose entre el 5,45 y 13,73% del material extraído.

El contenido más elevado de CBD extraído de la muestra (9,65%) se obtuvo bajo las siguientes condiciones: 25 °C, 15 min y un ratio soluto:disolvente de 1:20. Para el caso del Δ^9 -THC y también del contenido total de los cannabinoides investigados, los mayores porcentajes se observaron cuando las variables utilizadas fueron: 35 °C, 10 min y un ratio soluto:disolvente de 1:20. Finalmente, el mayor contenido en CBN se obtuvo a 35 °C, con un tiempo de extracción de 10 min y un ratio soluto:disolvente de 1:80 y, también, cuando la extracción se llevó a cabo a 25 °C, durante 5 min y con un ratio de 1:80.

4.2.3 Ajuste del modelo de superficie de respuesta

Con el fin de evaluar la significancia de los modelos de regresión lineal múltiple generados por la técnica RSM se llevó a cabo un ANOVA (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño de Box-Behnken para la extracción de cannabinoides en *Cannabis sativa* L. mediante ultrasonidos de potencia.

	Fuente de variación	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor p	R ²	R ² _{adj}
% CBD	Modelo (regresión)	9	102,39	11,38	299,09	0,000	0,998	0,995
	Lineal	3	67,50	22,50	591,47	0,000		
	Cuadrático	3	34,44	11,48	301,82	0,000		
	Interacción	3	0,45	0,15	3,98	0,086		
	Residual	5	0,19	0,04				
	Falta de ajuste (LOF)	3	0,18	0,06	8,35	0,109		
	Error puro	2	0,014	0,007				
% Δ ⁹ -THC	Modelo (regresión)	9	1,67	0,19	3,36	0,097	0,858	0,603
	Lineal	3	0,52	0,17	3,12	0,126		
	Cuadrático	3	1,06	0,35	6,42	0,036		
	Interacción	3	0,09	0,03	0,55	0,672		
	Residual	5	0,28	0,06				
	Falta de ajuste (LOF)	3	0,27	0,09	19,16	0,050		
	Error puro	2	0,009	0,005				
% CBN	Modelo (regresión)	9	1,46	0,16	46,54	0,000	0,988	0,967
	Lineal	3	1,17	0,39	111,43	0,000		
	Cuadrático	3	0,29	0,09	28,07	0,001		
	Interacción	3	< 0,01	< 0,01	0,11	0,954		
	Residual	5	0,02	0,004				
	Falta de ajuste (LOF)	3	0,02	0,01	18,72	0,051		
	Error puro	2	< 0,001	< 0,001				
% Total cannabinoides	Modelo (regresión)	9	90,54	10,06	50,27	0,000	0,989	0,969
	Lineal	3	48,18	16,06	80,25	0,000		
	Cuadrático	3	41,96	13,99	69,89	0,000		
	Interacción	3	0,40	0,13	0,67	0,608		
	Residual	5	1,00	0,20				
	Falta de ajuste (LOF)	3	0,97	0,32	20,67	0,050		
	Error puro	2	0,031	0,016				

Estos modelos de regresión generados por la RSM están formados por un término lineal, un término cuadrático y un término de interacción, los cuales determinan el orden del modelo desarrollado. A partir de los datos del ANOVA, también se puede realizar el análisis de la falta de ajuste (LOF) de los diferentes modelos matemáticos generados.

Como se ha mencionado en el apartado 3.3.7, las diferencias existentes se consideran estadísticamente significativas cuando el valor del parámetro p es inferior a 0,05. Así, en el caso del modelo matemático obtenido para optimizar la extracción del CBD presente en cáñamo, tanto el término lineal como el cuadrático fueron significativos ($p < 0,05$). En el modelo desarrollado para optimizar la extracción de Δ^9 -THC, el término lineal no fue significativo ($p > 0,05$), mientras que sí lo fue el cuadrático, hecho que indica que el modelo desarrollado para esta respuesta es una función cuadrática o modelo de segundo orden.

Por otra parte, tanto en el modelo desarrollado para optimizar la obtención de CBN como en el modelo referido al contenido total de cannabinoides en cáñamo, el término lineal y el término cuadrático fueron ambos significativos ($p < 0,05$). A partir de los datos indicados en la Tabla 9, también es interesante comentar que el término de interacción no fue significativo para ninguno de los 4 modelos evaluados en este trabajo.

Asimismo, se realizó el análisis de LOF de los modelos desarrollados, con el fin de evaluar si estos se ajustaban adecuadamente a los datos experimentales. Un valor de $p < 0,05$ en la prueba de LOF indica que el modelo formulado presenta una falta de ajuste significativa a los datos experimentales mientras que, si la falta de ajuste no es significativa, el modelo presenta un buen ajuste a los datos, siendo capaz de hacer predicciones de la respuesta. En este caso, el análisis de LOF mostró que los cuatro modelos formulados para optimizar la extracción tanto de los cannabinoides individuales analizados como de la totalidad de estos, se ajustaron a los datos experimentales debido a que la falta de ajuste no fue significativa.

La adecuación de los modelos propuestos se evaluó también mediante los coeficientes de determinación R^2 y R^2 ajustado (R^2_{adj}). Los valores de estos coeficientes indican el porcentaje de respuestas que son explicadas por los modelos formulados y si el modelo se puede explicar mediante las variables analizadas (Silva et al., 2017).

Los valores de R^2 para la optimización de la extracción de CBD y CBN, así como para el contenido total de cannabinoides fueron de 0,998, 0,988 y 0,989, respectivamente. Estos elevados valores de R^2 indican un buen ajuste de los diferentes modelos a los datos experimentales. En cambio, en el caso del Δ^9 -THC, el valor de R^2 fue 0,858. Por lo tanto, el porcentaje de respuestas explicadas por el modelo formulado es menor para esta respuesta.

El valor de R^2 ajustado (R^2_{adj}) se considera también un parámetro útil para evaluar los diferentes modelos desarrollados ya que tiene en cuenta los grados de libertad. Los valores de R^2_{adj} para el CBD, el CBN y el contenido total de cannabinoides fueron próximos a los de R^2 antes mencionados, mientras que en el caso del Δ^9 -THC el término de R^2_{adj} presentó un valor inferior igual a 0,603.

En base a los resultados obtenidos a partir del ANOVA, se pudo ver como las diferentes respuestas estudiadas se pueden ajustar mediante modelos de superficie de respuesta. Los modelos predictivos para cada una de las respuestas están representados por las ecuaciones indicadas en la Tabla 10, donde X_1 , X_2 y X_3 son las variables independientes presentadas en forma codificada. Las ecuaciones en términos de variables codificadas se pueden utilizar para hacer predicciones sobre las respuestas para niveles dados de cada variable.

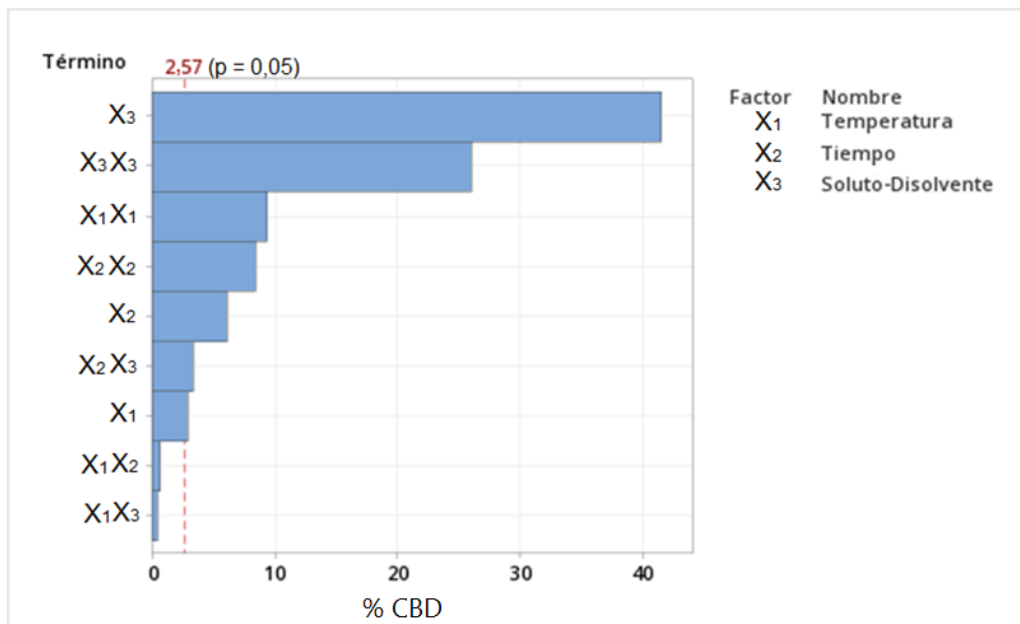
Tabla 10. Ecuaciones de los modelos formulados correspondientes a las respuestas seleccionadas.

Respuesta	Ecuación
% CBD	$\% \text{ CBD} = 4,45 + 0,21X_1 + 0,42X_2 - 2,87X_3 + 0,07X_1X_2 - 0,05X_1X_3 - 0,33X_2X_3 - 0,96X_1^2 - 0,86X_2^2 + 2,65X_3^2$
% Δ^9 -THC	$\% \Delta^9\text{-THC} = 2,74 + 0,18X_1 + 0,13X_2 + 0,13X_3 - 0,06X_1X_2 - 0,12X_1X_3 + 0,07X_2X_3 - 0,07X_1^2 - 0,11X_2^2 + 0,51X_3^2$
% CBN	$\% \text{ CBN} = 1,15 + 0,04X_1 + 0,01X_2 + 0,38X_3 - 0,01X_1X_2 - 0,02X_1X_3 - 0,01X_2X_3 + 0,22X_1^2 + 0,14X_2^2 - 0,11X_3^2$
% Total cannabinoides	$\% \text{ Total} = 8,33 + 0,42X_1 + 0,56X_2 - 2,35X_3 + 0,01X_1X_2 - 0,18X_1X_3 - 0,26X_2X_3 - 0,80X_1^2 - 0,82X_2^2 + 3,05X_3^2$

Finalmente, los componentes individuales correspondientes a cada uno de los términos de los modelos desarrollados (lineal, cuadrático e interacción) también se analizaron estadísticamente con el fin de evaluar aquellos que afectan significativamente a la respuesta del modelo. Para ello, se utilizaron diagramas de Pareto, lo cual permite visualizar de forma gráfica la significancia de los diferentes componentes. Además, este tipo de gráficos permiten observar el grado de importancia de cada uno de los términos que intervienen en el modelo. Este análisis, realizado para cada uno de los modelos desarrollados, se muestra en los siguientes apartados.

4.2.3.1 Extracción de CBD

En la Figura 27 se puede observar el diagrama de Pareto correspondiente a la extracción de CBD. Esta figura permite evaluar de forma gráfica los términos que presentan efectos significativos sobre el modelo formulado para la extracción de este cannabinoide a partir del cáñamo.

**Figura 27.** Diagrama de Pareto para la extracción de CBD asistida por ultrasonidos.

En este caso, el término lineal referido al ratio soluto:disolvente fue significativo, siendo el factor que afectó en mayor medida a la respuesta de este modelo, seguido por los términos cuadráticos de la misma variable, de la temperatura y del tiempo de extracción ($p < 0,05$).

Los términos lineales de tiempo y temperatura también fueron significativos para este modelo. En la Tabla 9, se muestra como el término de interacción global no es significativo para este modelo. Sin embargo, el término de interacción entre tiempo y soluto:disolvente sí que es significativo según el diagrama de Pareto, mientras que los otros dos términos de interacción no fueron significativos ($p > 0,05$).

En el estudio realizado por Tzimas et al. (2021) se puede observar una tendencia similar en el proceso de optimización del proceso de extracción de CBD, debido a que los términos lineales que influyeron en el modelo disminuyeron en este orden: ratio soluto:disolvente, tiempo de extracción y temperatura de extracción, ejerciendo todos ellos un efecto significativo en la respuesta examinada.

4.2.3.2 Extracción de Δ^9 -THC

Como puede observarse en la Figura 28, el efecto predominante sobre el modelo formulado para la extracción de Δ^9 -THC fue generado únicamente por el término cuadrático del ratio soluto:disolvente, siendo esta variable la más influyente ($p < 0,05$) sobre la respuesta estudiada. Así, tanto los términos cuadráticos de temperatura y tiempo, así como el resto de términos lineales y de interacción no fueron significativos ($p > 0,05$) para el proceso de extracción de Δ^9 -THC.

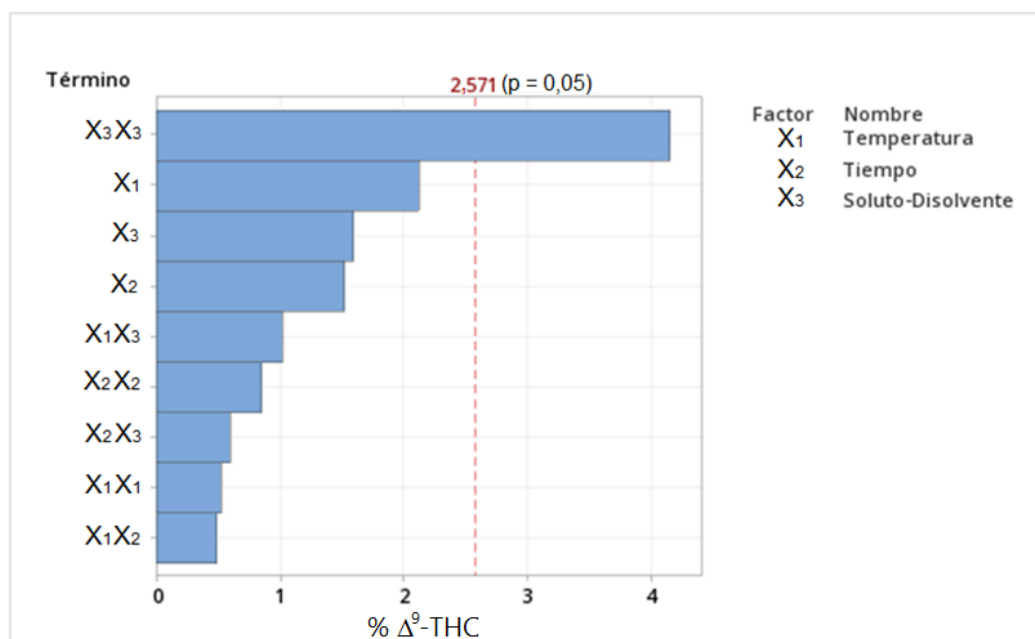


Figura 28. Diagrama de Pareto para la extracción de Δ^9 -THC asistida por ultrasonidos.

4.2.3.3 Extracción de CBN

A partir de la Figura 29 se observa como el efecto más importante sobre el modelo correspondiente a la extracción de CBN fue debido al término lineal referido al ratio soluto:disolvente ($p < 0,05$), seguido por los términos cuadráticos de la temperatura, el tiempo de extracción y del de ratio soluto:disolvente. El resto de términos evaluados mostraron no ser significativos ($p > 0,05$) para este modelo.

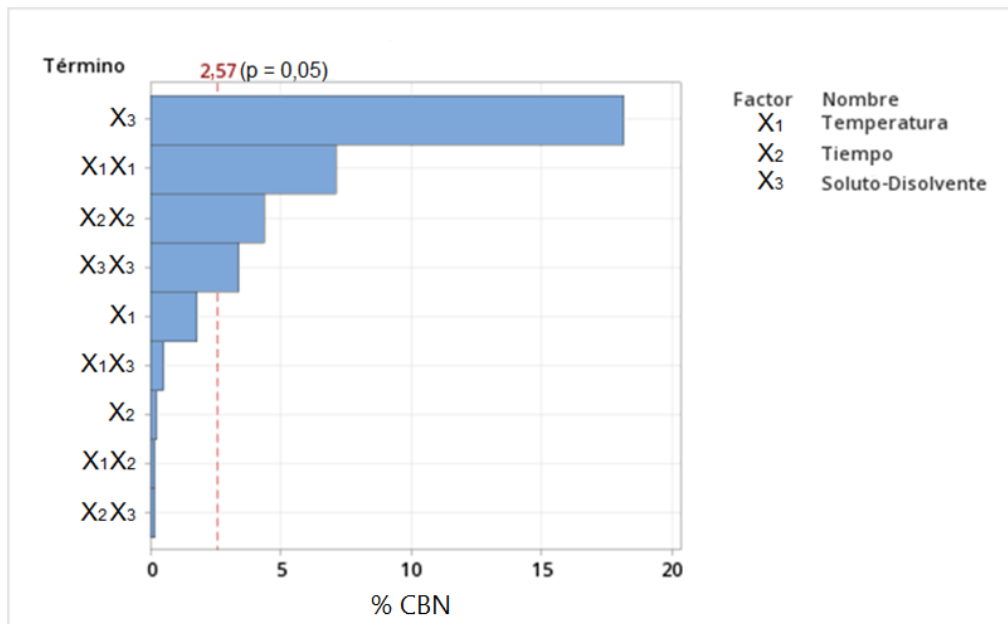


Figura 29. Diagrama de Pareto para la extracción de CBN asistida por ultrasonidos.

4.2.3.4 Contenido total de cannabinoides

En la Figura 30, puede observarse como tanto los términos lineales como los términos cuadráticos de las diferentes variables analizadas fueron significativos para el modelo desarrollado correspondiente al contenido total de cannabinoides extraídos ($p < 0,05$), siendo el término lineal del ratio soluto:disolvente el factor que afectó en mayor medida a la respuesta. Por otra parte, ninguno de los términos de interacción afectó de forma significativa a la respuesta estudiada.

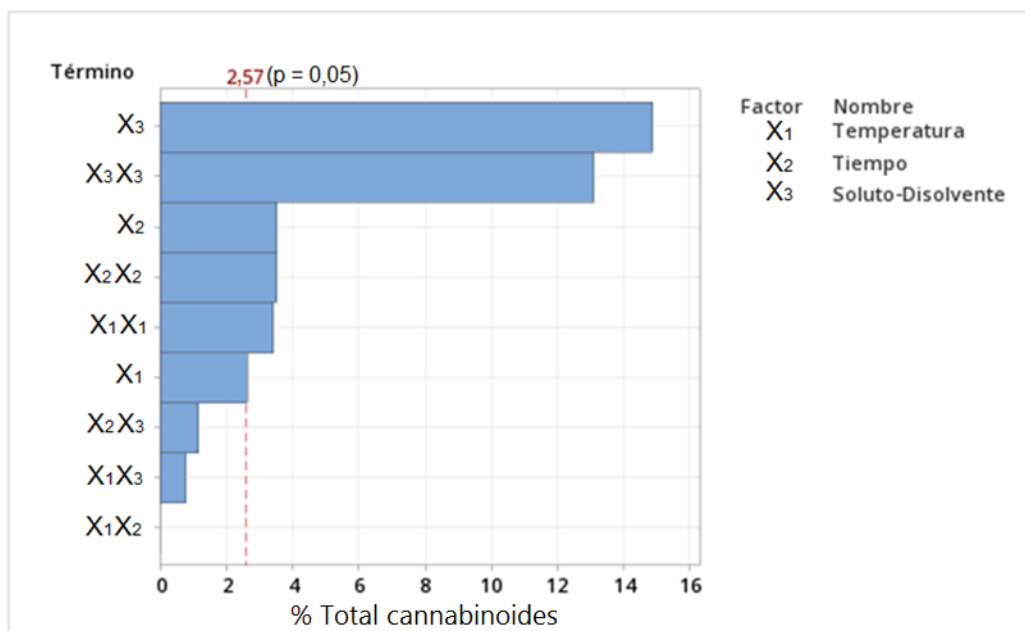


Figura 30. Diagrama de Pareto para el contenido total de cannabinoides.

4.2.4 Superficies de respuesta

La superficie de respuesta es la representación gráfica en 3D del modelo generado mediante la regresión lineal múltiple. Este tipo de gráfica ayuda a comprender la naturaleza

de la relación entre las diferentes variables independientes y las respuestas estudiadas, siendo posible visualizar cada una de las respuestas en función de las variables implicadas en el proceso estudiado. En concreto, la superficie de respuesta permite evaluar una respuesta en función de 2 de las variables independientes; la tercera variable (que no se muestra en la gráfica) se mantiene constante. El diseño de Box-Behnken puede visualizarse en 3 superficies de respuesta para cada una de las respuestas evaluadas. En los siguientes apartados se muestran y analizan las diferentes representaciones gráficas.

4.2.4.1 Extracción de CBD

La Figura 31 muestra las gráficas de superficie de respuesta correspondientes al modelo formulado para la optimización del proceso de extracción de CBD a partir de cáñamo. Las gráficas de superficie presentan en el eje vertical la respuesta (% CBD), mientras en los ejes horizontales se van alternando las variables independientes: temperatura de extracción, tiempo de extracción y ratio soluto:disolvente.

En la Figura 31a se puede observar como un aumento en el tiempo de extracción permite obtener un mayor porcentaje de CBD, siendo el tiempo óptimo de extracción de aproximadamente 10 min, independientemente de la temperatura aplicada.

En las Figuras 31b y 31c se puede ver como aumentando el ratio soluto:disolvente desde 1:80 hasta 1:20 aumenta de forma clara el porcentaje de CBD extraído, con independencia de la temperatura y del tiempo de extracción utilizados. Asimismo, en la Figura 31c se puede observar cómo se obtienen porcentajes de CBD relativamente más elevados a partir de un tiempo de sonicación cercano a los 10 min.

Estos resultados sugieren que existe una influencia positiva tanto del tiempo de extracción como del ratio soluto:disolvente, lo cual indica que la extracción de CBD aumentará de forma significativa al incrementar el ratio soluto:disolvente, así como el tiempo de extracción hasta valores próximos a los 10 min. Estos resultados están en concordancia con el trabajo publicado por Tzimas et al. (2021), quienes también observaron como los factores que afectaban en mayor medida al proceso de extracción de CBD, con asistencia acústica, fueron el ratio soluto:disolvente y el tiempo de extracción.

Por otra parte, el aumento de CBD extraído al aumentar el ratio soluto:disolvente no coincide con los resultados publicados en algunos artículos relacionados con la extracción de cannabinoides. Tzimas et al. (2021) indicaron que el mayor contenido de CBD se obtenía a partir de proporciones inferiores a 1:77, ya que una proporción baja de soluto:disolvente normalmente facilita el proceso de extracción al aumentar el gradiente de concentración entre el tejido vegetal y el disolvente de extracción, lo que a su vez puede aumentar la velocidad de transferencia de materia (Vinatoru et al., 2017). A mayor temperatura, la capacidad del disolvente para solubilizar los compuestos aumenta y la viscosidad de los extractos disminuye permitiendo una mejor penetración del disolvente en la matriz de la muestra y la consecuente liberación de cannabinoides (Ahmad et al., 2020). Así, para un ratio soluto:disolvente elevado cuando el proceso se realiza a mayor temperatura podría justificar los resultados obtenidos. No obstante, en nuestro caso se observa, en la Figura 31a, como la temperatura prácticamente no influye. Aún así, el ratio soluto:disolvente de 1:20 podría ser un valor no muy elevado, el cual permite obtener los porcentajes de CBD observados.

En trabajos realizados por autores como Brighenti et al. (2017) y Baranauskaite et al. (2020), quienes estudiaron la extracción de cannabinoides mediante diferentes técnicas, se sitúa la

temperatura óptima de extracción de CBD alrededor de los 25 °C, lo cual encaja con lo observado en nuestro estudio. Asimismo, estos autores destacan que no deben superarse los 65-70 °C si se quiere evitar la posible degradación de los compuestos cannabinoides (Brighenti et al., 2017).

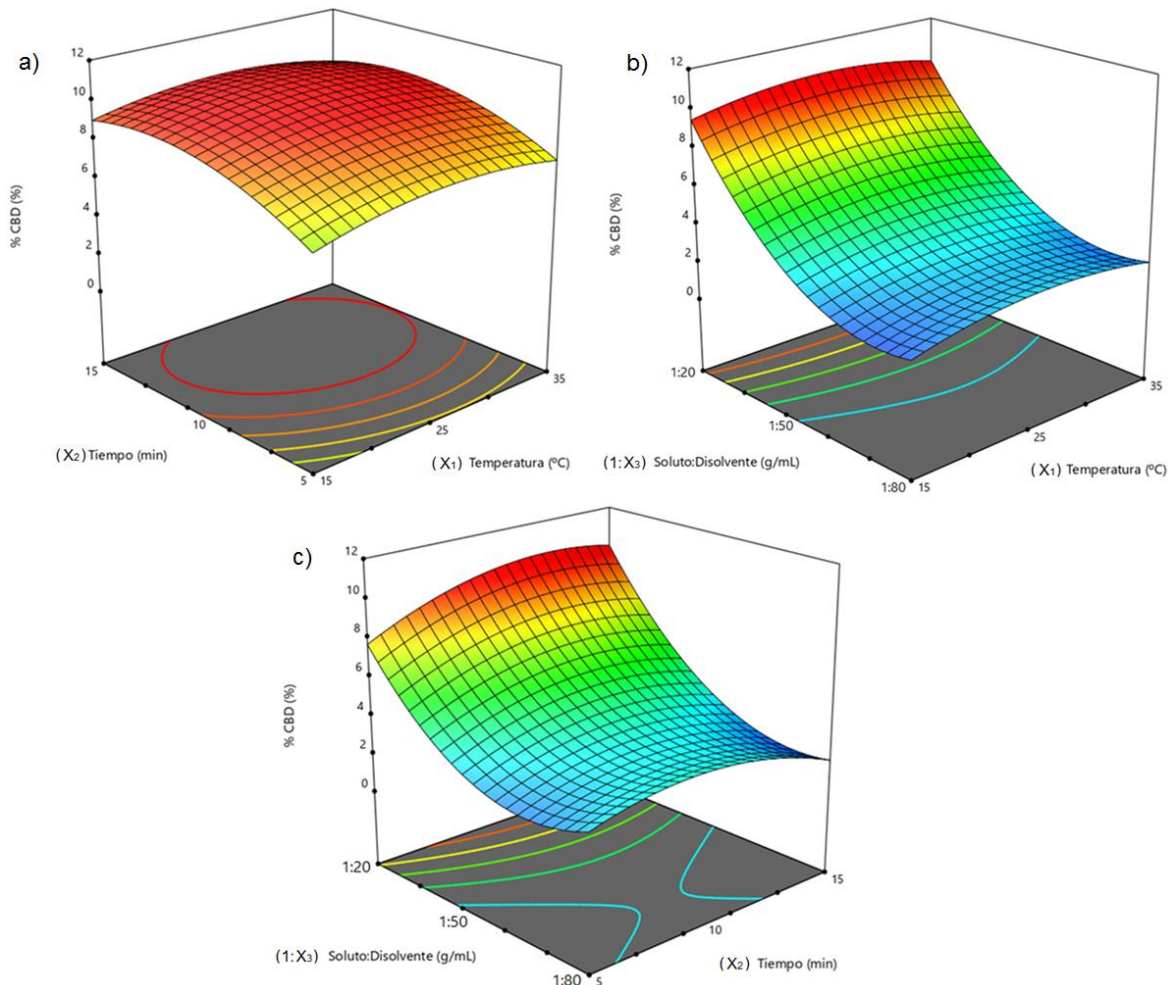


Figura 31. Superficies de respuesta del contenido de CBD presente en las muestras de cáñamo (% p/p) afectado por (a) tiempo vs. temperatura de extracción, (b) ratio soluto:disolvente vs. temperatura de extracción y (c) ratio soluto:disolvente vs. tiempo.

4.2.4.2 Extracción de Δ^9 -THC

En la Figura 32 pueden observarse las superficies de respuesta correspondientes al modelo desarrollado para la optimización del proceso de extracción de Δ^9 -THC a partir de la muestra de cáñamo.

Evaluando la Figura 32a, se puede observar como un aumento de la temperatura de extracción provoca un ligero incremento del contenido de Δ^9 -THC extraído, independientemente del tiempo de extracción aplicado, llegando a obtenerse un porcentaje de Δ^9 -THC del 3,4%.

Por otra parte, a partir de las Figuras 32b y 32c se puede comprobar como para ratios de soluto:disolvente alejados de la zona central de la gráfica, es decir, tanto para 1:20 como para 1:80, se obtienen las mayores proporciones de Δ^9 -THC extraído. En estas 2 superficies de respuesta, esta tendencia parece ser independiente del tiempo de extracción, aunque en

la Figura 32b puede observarse como al aumentar la temperatura de extracción el porcentaje de Δ^9 -THC obtenido también aumenta.

Los porcentajes de Δ^9 -THC obtenidos para ratios soluto:disolvente más bajos concuerda con lo indicado por Vinatoru et al. (2017), ya que, según estos autores, una proporción baja del ratio soluto:disolvente facilita el proceso de extracción aumentando el gradiente de concentración entre el tejido vegetal y el disolvente de extracción.

Por otra parte, la temperatura de extracción también afectó de forma significativa a la extracción de este cannabinoide, hecho que coincide con los resultados presentados por Ahmad et al. (2020) y Martín-García et al. (2020) en sus trabajos. A temperaturas más altas, la viscosidad de los extractos disminuye, permitiendo una mejor penetración del disolvente en la matriz de la muestra y una mayor liberación de cannabinoides en el disolvente. Este aspecto, que puede observarse de forma clara en la Figura 32a, coincide con el estudio de Monton et al. (2019), quienes obtuvieron los mayores rendimientos de Δ^9 -THC aplicando una temperatura de unos 40 °C, aunque utilizando etanol como disolvente de extracción.

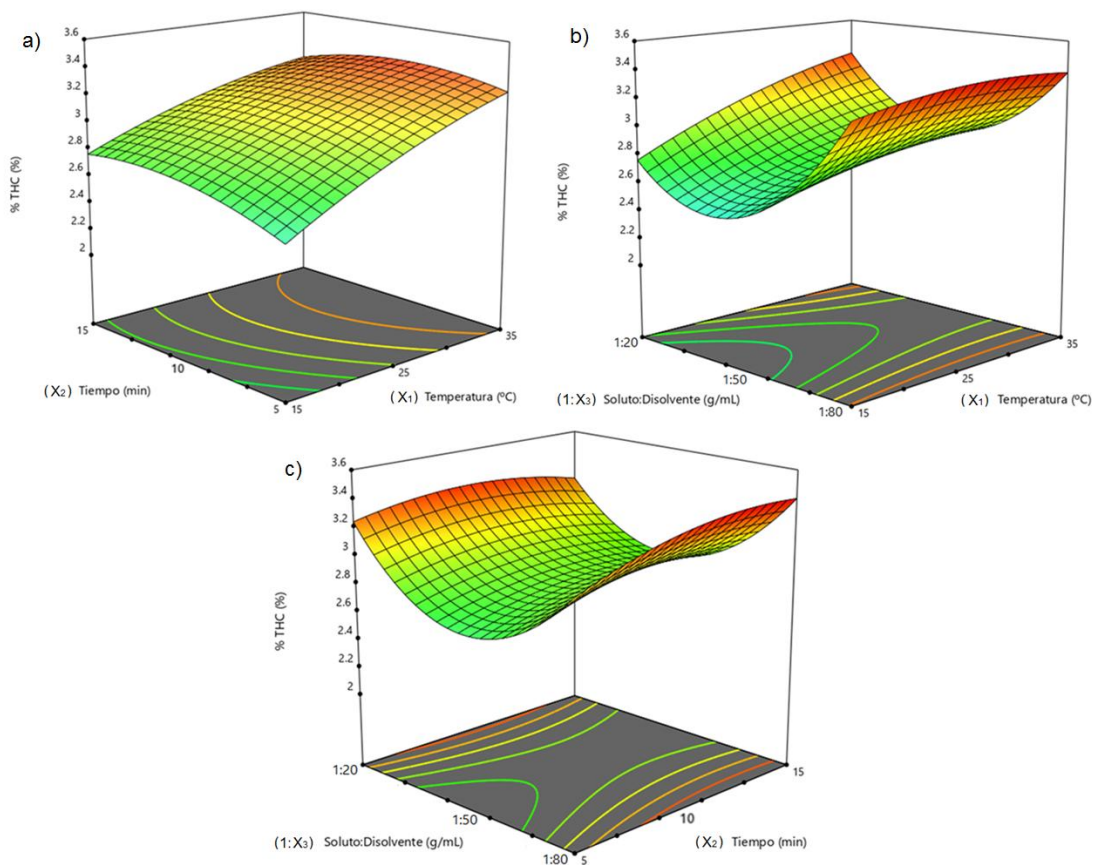


Figura 32. Superficies de respuesta del contenido de Δ^9 -THC presente en las muestras de cáñamo (% p/p) afectado por (a) tiempo vs. temperatura de extracción, (b) ratio soluto:disolvente vs. temperatura de extracción y (c) ratio soluto:disolvente vs. tiempo.

4.2.4.3 Extracción de CBN

En la Figura 33 se muestran las superficies de respuesta que corresponden al modelo formulado para la optimización del proceso de extracción de CBN en *Cannabis sativa* L.

A partir de la Figura 33a, se puede comprobar como para tiempos y temperaturas de extracción alejadas de la zona central de la gráfica se obtienen los mayores porcentajes de

CBN, aunque el mayor contenido de CBN (aproximadamente de un 1,2%) se obtuvo para una temperatura de extracción de 35 °C y un tiempo de extracción de 15 min.

Las gráficas de las Figuras 33b y 33c muestran cómo, a diferencia del CBD y del Δ^9 -THC, la extracción de CBN aumenta a medida que el ratio soluto:disolvente disminuye, independientemente de la temperatura y del tiempo de extracción utilizados.

Además, se puede comprobar cómo el proceso de extracción de CBN sigue una tendencia similar a la observada para el Δ^9 -THC, siendo el ratio soluto:disolvente de 1:80 el que permite obtener los mejores resultados.

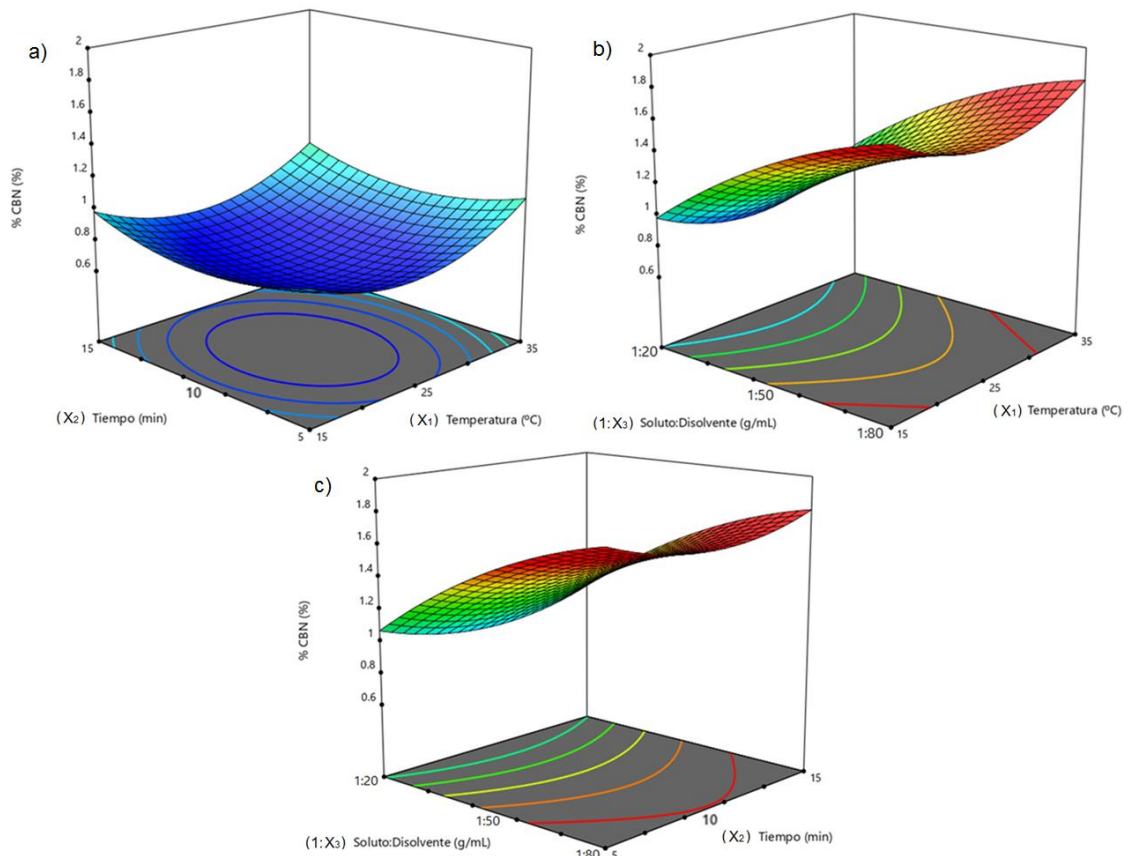


Figura 33. Superficies de respuesta del contenido de CBN presente en las muestras de cáñamo (% p/p) afectado por (a) tiempo vs. temperatura de extracción, (b) ratio soluto:disolvente vs. temperatura y (c) ratio soluto:disolvente vs. tiempo de extracción.

No se ha encontrado información bibliográfica sobre las condiciones de extracción del CBN, esto es probablemente debido a que este cannabinoide suele estar presente en cantidades relativamente bajas en *Cannabis sativa* L., llegando en ocasiones incluso a no ser detectado (Glivar et al., 2020; Zivovinovic et al., 2018).

4.2.4.4 Contenido total de cannabinoides

En la Figura 34 se pueden observar las superficies de respuesta del modelo desarrollado para la optimización del proceso de extracción del total de cannabinoides presentes en la muestra de cáñamo analizada en este trabajo.

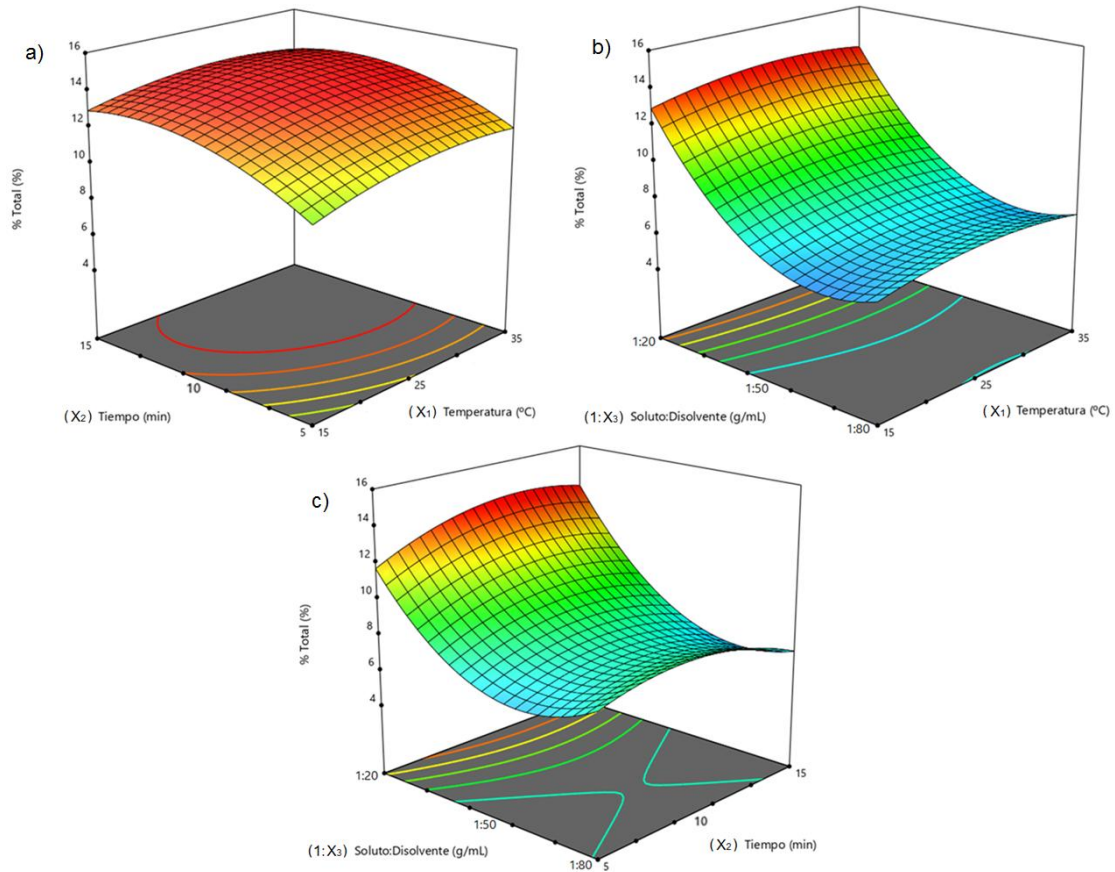


Figura 34. Superficies de respuesta del contenido total de cannabinoides estudiado (% p/p) afectado por (a) tiempo vs. temperatura de extracción, (b) ratio soluto:disolvente vs. temperatura y (c) ratio soluto:disolvente vs. tiempo.

En la Figura 34a se puede comprobar cómo un aumento en el tiempo de extracción permite obtener un mayor porcentaje del contenido total de cannabinoides, situándose el tiempo de extracción óptimo alrededor de los 10-12 min, independientemente de la temperatura de extracción aplicada. Por lo tanto, para tiempos de extracción más reducidos se obtienen menores porcentajes del total de cannabinoides de interés, disminuyendo este valor desde aproximadamente un 14% hasta valores próximos al 8%. Esto se debe principalmente a lo indicado por Ahmad et al. (2020) en su trabajo; un tiempo de sonicación más prolongado ayuda a mejorar la penetración del disolvente en la matriz de la planta, lo cual conduce a la obtención de mayores rendimientos de extracción.

En las Figuras 34b y 34c, se puede observar como un incremento en el ratio soluto:disolvente, desde 1:80 hasta 1:20, provoca un aumento del porcentaje de cannabinoides extraídos, con independencia de la temperatura y del tiempo de extracción utilizados. No obstante, en la Figura 34c se observan unos porcentajes de cannabinoides totales relativamente más altos a partir de un tiempo de sonicación de 10 min. Estos resultados sugieren, de forma análoga a lo observado en la optimización de la extracción de CBD, que existe una influencia positiva tanto del tiempo de extracción como del ratio soluto:disolvente. Este resultado está en concordancia con lo indicado en un estudio reciente que involucró la extracción asistida por microondas (Drinić et al., 2020), en el cual los autores describieron el efecto significativo del ratio soluto:disolvente en el rendimiento obtenido para la extracción del total de cannabinoides.

4.2.5 Optimización y validación de los modelos obtenidos

El software Minitab fue utilizado para encontrar las condiciones óptimas que maximizan cada una de las respuestas analizadas para el proceso de extracción de cannabinoides.

A partir de los resultados obtenidos, se decidió llevar a cabo la optimización de la extracción del CBD presente en la muestra de *Cannabis sativa* L., así como del contenido total de cannabinoides, ya que fueron las dos únicas respuestas estudiadas mediante gráficas de superficie de respuesta en las cuales se pudo observar el punto máximo del rendimiento de extracción dentro de la región experimental analizada (Figura 31a y Figura 34a).

En la Tabla 11 se muestran los valores de las tres variables de proceso necesarios para llevar a cabo la optimización de las dos respuestas seleccionadas. Así, se deben utilizar las condiciones óptimas indicadas para llevar a cabo la validación de los dos modelos.

Tabla 11. Valores de las variables que maximizan el contenido de CBD y el porcentaje total de cannabinoides obtenidos del cáñamo mediante extracción asistida por ultrasonidos y validación de los modelos desarrollados.

Respuesta	Unidades	Variables de proceso			Valor estimado (%)	Valor experimental (%)	ERM (%)
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Soluto:disolvente (g/mL)			
% CBD	%	26,5	12,2	1:20	10,2	10,6 ± 0,2	4,3
% Total cannabinoides	%	28,7	12,5	1:20	14,1	14,7 ± 0,3	4,7

Los experimentos de validación, realizados por triplicado ($n = 3$), con el objetivo de validar las condiciones óptimas mencionadas, pueden observarse en la Tabla 11, donde se presenta el valor calculado a partir del modelo desarrollado (valor estimado) y el valor medio obtenido de forma experimental. En concreto, utilizando las condiciones óptimas de extracción indicadas, se obtuvieron valores promedio de 10,6% y de 14,7% para los contenidos de CBD y del total de cannabinoides, respectivamente.

Como se indicó con anterioridad, según Sulaiman et al. (2017), se consideran apropiados valores de ERM inferiores al 5%. En la Tabla 11, se puede observar como para las dos respuestas evaluadas, los valores de ERM fueron inferiores al 5%, lo cual indica que los modelos planteados en este estudio permiten predecir con cierta precisión los valores experimentales. Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran la adecuación de estos modelos para llevar a cabo el proceso de extracción de cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L.

5. Conclusiones

En el presente estudio se ha utilizado la metodología de superficie de respuesta (RSM) con el fin de optimizar el proceso de extracción, con asistencia acústica, de los principales cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L.

A partir de los resultados obtenidos se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- La caracterización inicial de la muestra de *Cannabis sativa* L. mostró que los cannabinoides cannabidiol (CBD), Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y cannabinol (CBN) representaban entre el 95% y el 98% del total de cannabinoides presentes en la muestra, siendo el CBD el cannabinoide predominante.
- Los ultrasonidos de potencia mostraron ser eficaces en la ruptura de las paredes celulares de la muestra pulverizada de *Cannabis sativa* L., lo cual facilitó la extracción de los cannabinoides presentes en la planta.
- A partir de los resultados experimentales obtenidos tras llevar a cabo el diseño de Box-Behnken, se pudo comprobar la variabilidad de las diferentes respuestas estudiadas, observándose que los rangos de valores obtenidos tanto para el CBD (entre 1,98 y 9,65%) como para el contenido total de cannabinoides (entre 5,45 y 13,73%) fueron mucho más amplios que los rangos obtenidos en el caso del Δ^9 -THC (entre el 2,06 y el 3,41%) y del CBN (0,75 y el 1,62%).
- A partir de los datos de análisis de falta de ajuste (LOF) y los valores de R^2 y R^2_{adj} obtenidos mediante el ANOVA, se ha comprobado que los datos experimentales de las diferentes respuestas analizadas se ajustaron de forma significativa a un modelo cuadrático. No obstante, el porcentaje de respuesta explicada fue mucho más elevado para los contenidos de CBD, CBN y cannabinoides totales que en el caso del Δ^9 -THC.
- A partir de los diagramas de Pareto generados para cada respuesta, se ha podido evaluar con mayor detalle la influencia de los diferentes términos en cada uno de los modelos obtenidos, así como la importancia de los mismos:
 - Para el rendimiento de extracción del CBD, el término lineal referido al ratio soluto:disolvente fue el factor que afectó en mayor medida a la respuesta de este modelo, seguido por los términos cuadráticos de la misma variable, así como de la temperatura y del tiempo de extracción.
 - En el caso del contenido de Δ^9 -THC, el término cuadrático referido al ratio soluto:disolvente fue el único que influyó de forma significativa en el proceso de extracción.
 - Para el rendimiento de extracción del CBN, el efecto más importante fue debido al término lineal referido al ratio soluto:disolvente, seguido por los términos cuadráticos de temperatura, tiempo de extracción y ratio soluto:disolvente.
 - En el caso del contenido total de los cannabinoides, tanto los términos lineales como los cuadráticos fueron significativos, siendo el término lineal correspondiente al ratio soluto:disolvente el factor de mayor significancia estadística.

- Mediante la RSM se determinaron las condiciones de temperatura, tiempo de extracción y ratio soluto:disolvente que permitieron optimizar las respuestas referidas al contenido de CBD presente en cáñamo, así como a la totalidad de cannabinoides extraídos. Las condiciones óptimas para la extracción y los valores máximos obtenidos experimentalmente para ambas respuestas fueron los siguientes:
 - % CBD (% p/p): a 26,5 °C durante 12,2 min y usando un ratio 1:20 soluto:disolvente, se obtuvo un valor de $10,6 \pm 0,2\%$.
 - % cannabinoides totales (% p/p): a 28,7 °C durante 12,5 min y usando un ratio 1:20 soluto:disolvente, se obtuvo un valor de $14,7 \pm 0,3\%$.
- Los resultados derivados de la validación de los modelos obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los valores experimentales y los valores estimados. Por lo tanto, los modelos desarrollados en este trabajo mediante la RSM presentan una buena precisión y son adecuados para simular el proceso de extracción con asistencia acústica de los principales cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L.

6. Bibliografía

- Agarwal, C., Máthé, K., Hofmann, T., & Csóka, L. (2018). Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from *Cannabis Sativa* L. Optimized by Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 83(3), 700-710.
- Ahmad, A., Alkharfy, K. M., Wani, T. A., & Raish, M. (2015). Application of Box-Behnken design for ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Paeonia emodi*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 990-997.
- Ahmad, A., Rehman, M. U., Wali, A. F., El-Serehy, H. A., Al-Misned, F. A., Maooda, S. N., Aljawdah, H. M., Mir, T. M., & Ahmad, P. (2020). Box-Behnken Response Surface Design of Polysaccharide Extraction from *Rhododendron arboreum* and the Evaluation of Its Antioxidant Potential. *Molecules*, 25(17), 3835.
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2016). Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79(2), 324-331.
- Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in plant science*, 7, 19.
- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472.
- Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410-427.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Baranauskaite, J., Marksa, M., Ivanauskas, L., Vitkevicius, K., Liaudanskas, M., Skyrius, V., & Baranauskas, A. (2020). Development of extraction technique and GC/FID method for the analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. spp. *santicha* (hemp). *Phytochemical Analysis*, 31, 516-521.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- 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.
- Cannabis Flos. New text of the German Pharmacopoeia. (2018). Bonn (Germany).
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Cheng Hao, D., Gu X.-J., & Xiao, P. G. (2015). Phytochemical and biological research of Cannabis pharmaceutical resources. En. *Medicinal plants: chemistry, biology and omics*. Ed. Woodhead Publishing.
- Citti, C., Braghiroli, D., Vandelli, M. A., & Cannazza, G. (2018). Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 565-579.

- Citti, C., Russo, F., Sgrò, S., Gallo, A., Zanotto, A., Forni, F., Vandelli, M. A., Laganà, A., Montone, C. M., Gigli, G., & Cannazza, G. (2020). Pitfalls in the analysis of phytocannabinoids in cannabis inflorescence. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(17), 4009–4022.
- Clarke, R. C., & Watson, D. P. (2007). Cannabis and Natural Cannabis Medicines. En: *Marijuana and the Cannabinoids*. Ed. Humana Press.
- Claussen, U., von Spulak, F., & Korte, F. (1966). Zur chemischen klassifizierung von pflanzen-XXXI, haschisch-X: Cannabichromen, ein neuer haschisch-inhalts-stoff. *Tetrahedron*, 22(4), 1477-1479.
- Common catalogue of varieties of agricultural plant species. (2020). https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-02/plant-variety-catalogues_agricultural-plant-species.pdf (acceso: 30 de julio de 2021)
- Darmani, N. A. (2002). Antiemetic action of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and synthetic cannabinoids in chemotherapy-induced nausea and vomiting. En: *Biology of Marijuana: From Gene to Behavior* (pp. 356-389). Ed. CRC Press.
- 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, 110234.
- Drinić, Z., Vladić, J., Koren, A., Zeremski, T., Stojanov, N., Kiproovski, B., & Vidović, S. (2020). Microwave-assisted extraction of cannabinoids and antioxidants from Cannabis sativa aerial parts and process modeling. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95, 831-839.
- Dussy, F. E., Hamberg, C., Luginbühl, M., Schwerzmann, T., & Briellmann, T. A. (2005). Isolation of Delta9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Delta9-THC in cannabis products. *Forensic Science International*, 149(1), 3-10.
- EISOhly, M. A., & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, 78, 539-548.
- EISOhly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., & Galal, A. (2017). Phytochemistry of Cannabis sativa L. *Progress in the chemistry of organic natural products*, 103, 1-36.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Cannabis legislation in Europe: An overview. <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4135/TD0217210ENN.pdf> (acceso: 30 de julio de 2021)
- Fairbairn, J. W., Liebmann, J. A., & Rowan, M. G. (1976). The stability of cannabis and its preparations on storage. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 28(1), 1–7.
- Fellermeier, M., & Zenk, M. H. (1998). Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS letters*, 427(2), 283-285.
- Ferreira, S. L., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186.
- Fetterman, P. S., Keith, E. S., Waller, C. W., Guerrero, O., Doorenbos, N. J., & Quimby, M. W. (1971). Mississippi-grown Cannabis sativa L: preliminary observation on chemical definition of phenotype and variations in tetrahydrocannabinol content versus age, sex, and plant part. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(8), 1246-1249.
- Flores-Sanchez, I. J., & Verpoorte, R. (2008). Secondary metabolism in cannabis. *Phytochemistry Reviews*, 7, 615-639.

- Fournier, G. & Paris, M. R. (1979). Le chanvre papetier (*Cannabis sativa* L.) cultivé en France: Le point sur les constituants. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 13, 116-121.
- Gallo-Molina, A. C., Castro-Vargas, H. I., Garzón-Méndez, W. F., Martínez Ramírez, J. A., Rivera Monroy, Z. J., King, J. W., & Parada-Alfonso, F. (2019). Extraction, isolation and purification of tetrahydrocannabinol from the *Cannabis sativa* L. plant using supercritical fluid extraction and solid phase extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 146, 208-216.
- Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1646-1647.
- Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1966). Cannabichromene, a new active principle in hashish. *Chemical Communications*, 20-21.
- Glivar, T., Eržen, J., Kreft, S., Zagožen, M., Čerenak, A., Čeh, B., & Tavčar Benkovič, E. (2020). Cannabinoid content in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties grown in Slovenia. *Industrial Crops and Products*, 145, 112082.
- Gonzalez, R., Carey, C., & Grant, I. (2002). Nonacute (residual) neuropsychological effects of cannabis use: a qualitative analysis and systematic review. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(S1), 48S-57S.
- Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Tagliabatella-Scafati, O., & Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural product reports*, 33(12), 1357-1392.
- Hazekamp, A. (2007). PhD thesis: Cannabis; extracting the medicine. Universidad de Leiden (Países Bajos).
- Hemphill, J. K., Turner, J. C., & Mahlberg, P. G. (1980). Cannabinoid content of individual plant organs from different geographical strains of *Cannabis sativa* L. *Journal of Natural Products*, 43, 112-122.
- Hillig, K. W., & Mahlberg, P. G. (2004). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *American Journal of Botany*, 91(6), 966-975.
- Hively, R. L., Mosher, W. A., & Hoffman, F. W. (1966). Isolation of trans-delta-6-THC from marijuana. *Journal of the American Chemical Society*, 88, 1832.
- Iffland, K., & Grotenhermen, F. (2017). An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 139-154.
- Kenari, R. E., & Dehghan, B. (2020). Optimization of ultrasound-assisted solvent extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil using RSM: Evaluation of oxidative stability and physicochemical properties of oil. *Food Science & Nutrition*, 8, 4976-4986.
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O., Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851-858.
- Kwaśnica, A., Pachura, N., Masztalerz, K., Figiel, A., Zimmer, A., Kupczyński, R., Wujcikowska, K., Carbonell-Barrachina, A. A., Szumny, A., & Róžański, H. (2020). Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (*Cannabis sativa* L.). *Foods*, 9(8), 1118.
- Lefebvre, T., Destandau, E., Lesellier, E. (2021). Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of Chromatography A*, 1635, 461770.
- Leghissa, A., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. (2018). A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. *Journal of Separation Science*, 41(1), 398-415.

- Lewis-Bakker, M. M., Yang, Y., Vyawahare, R., & Kotra, L. P. (2019). Extractions of Medical Cannabis Cultivars and the Role of Decarboxylation in Optimal Receptor Responses. *Cannabis and cannabinoid research*, 4(3), 183-194.
- Lim, K., See, Y. M., & Lee, J. (2017). A Systematic Review of the Effectiveness of Medical Cannabis for Psychiatric, Movement and Neurodegenerative Disorders. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 15(4), 301-312.
- Lu, H. C., & Mackie, K. (2016). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biological Psychiatry*, 79(7), 516-525.
- Lujan Ramirez, C., Fanovich, M. A., & Churio, M. S. (2019). Cannabinoids: Extraction Methods, Analysis, and Physicochemical Characterization. En: *Studies in Natural Products Chemistry* (pp. 143-173).
- Macherone, A. (2020). Comprehensive analytical testing of cannabis and hemp. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 90, 3-29.
- Martín-García, B., Pimentel-Moral, S., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. (2020). Box-Behnken experimental design for a green extraction method of phenolic compounds from olive leaves. *Industrial Crops and Products*, 154, 112741.
- McPartland, J. M. (2018). Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 3(1), 203-212.
- Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1967). Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, 25, 175-213.
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7(3), 47.
- Monton, C., Madaka, F., Settharaksa, S., Wunnakup, T., Suksaeree, J., & Songsak, T. (2019). Optimal condition of cannabis maceration to obtain the high cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol content. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(3), e20190676.
- Muñiz-Márquez, D. B., Martínez-Ávila, G. C., Wong-Paz, J. E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1149-1154.
- Nahar, L., Uddin, S. J., Alam, Md. A., Sarker, S. D. (2021). Extraction of naturally occurring cannabinoids: an update. *Phytochemical Analysis*, 32, 228-241.
- Pate, D. (1994). Chemical ecology of cannabis. *Journal of the International Hemp Association*, 2(29), 32-37.
- Peng, X., Yang, G., Shi, Y., Zhou, Y., Zhang, M., & Li, S. (2020). Box-Behnken design based statistical modeling for the extraction and physicochemical properties of pectin from sunflower heads and the comparison with commercial low-methoxyl pectin. *Scientific reports*, 10(1), 3595.
- Pertwee, R. G. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 - tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 199-215.
- Plan Nacional sobre Drogas (1925).
<https://pnsd.sanidad.gob.es/pnsd/legislacion/pdfestatal/i2.pdf> (acceso: día 8 de julio de 2021)
- Radwan, M. M., Elsohly, M. A., Slade, D., Ahmed, S. A., Khan, I. A., & Ross, S. A. (2009). Biologically active cannabinoids from high-potency *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 72(5), 906-911.

- Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., & ElSohly, M. A. (2021). Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules*, 26(9), 2774.
- Raharjo, T. J., Chang, W. T., Choi, Y. H., Peltenburg-Looman, A. M. G., & Verpoorte, R. (2004). Olivetol as product of a polyketide synthase in *Cannabis sativa* L. *Plant Science*, 166, 381-385.
- Reglamento (CE) N° 1177/2000 de la comisión de 31 de mayo de 2000 por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 1164/89 relativo a las disposiciones de aplicación de la ayuda para el lino textil y el cáñamo.
- Reglamento (UE) N° 1307/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de diciembre de 2013 por el que se establecen normas aplicables a los pagos directos a los agricultores en virtud de los regímenes de ayuda incluidos en el marco de la Política Agrícola Común y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n° 637/2008 y (CE) n° 73/2009 del Consejo.
- Restek (2014). Medical Marijuana Solvent Extraction Efficiency–Potency Determinations with GC-FID. <https://www.restek.com/en/chromatography/chromatography/medical-marijuana-solvent-extraction-efficiency--potency-determinations-with-gc-fid> (acceso: 2 de junio de 2021)
- Romdhane, M., & Gourdon, C. (2002). Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, 87(1), 11-19.
- Russo, E. B. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1344-1364.
- Russo, E. B., & Marcu, J. (2017). Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. *Advances in Pharmacology*, 80, 67-134.
- Sánchez-Carnerero Callado, C., Núñez-Sánchez, N., Casano, S., & Ferreira-Vera, C. (2018). The potential of near infrared spectroscopy to estimate the content of cannabinoids in *Cannabis sativa* L.: A comparative study. *Talanta*, 190, 147-157.
- Schultes, R. E. (1970). Random thoughts and queries on the botany of Cannabis. En: *The botany and chemistry of Cannabis*. Ed. J. & A. Churchill.
- Silva, E. O., Borges, L. L., da Conceição, E. C., Bara, M. T. F. (2017). Box-Behnken experimental design for extraction of artemisinin from *Artemisia annua* and validation of the assay method. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 519-524.
- Sirikantaramas, S., Taura, F., Morimoto, S., & Shoyama, Y. (2007). Recent advances in *Cannabis sativa* research: biosynthetic studies and its potential in biotechnology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 8(4), 237-243.
- Small, E., & Beckstead, H. D. (1973). Cannabinoid phenotypes in *Cannabis sativa*. *Nature*, 245(5421), 147-148.
- Small, E., Beckstead, H. D., & Chan, A. (1975). The evolution of cannabinoid phenotypes in Cannabis. *Economic Botany*, 29, 219-232.
- Sulaiman, I. S. C., Basri, M., Masoumi, H. R. F., Chee, W. J., Ashari, S. E., & Ismail, M. (2017). Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central journal*, 11(1), 54.
- Thomas, B. F., & ElSohly, M. A. (2016). *The Analytical Chemistry of Cannabis*. Ed. RTI Press.
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137-142.
- Tomida, I., Pertwee, R. G., & Azuara-Blanco, A. (2004). Cannabinoids and glaucoma. *British Journal of Ophthalmology*, 88(5), 708-713.

- Tzimas, P. S., Petrakis, E. A., Halabalaki, M., & Skaltsounis, L. A. (2021). Effective determination of the principal non-psychoactive cannabinoids in fiber-type *Cannabis sativa* L. by UPLC-PDA following a comprehensive design and optimization of extraction methodology. *Analytica Chimica Acta*, 1150, 338200.
- UNODC (2009). Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products. https://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook_1.pdf (acceso: 30 de junio de 2021)
- Upton, R. (2020). Cannabis (Marijuana) and cannabinoids. En: *Textbook of natural medicine*. Ed. Churchill Livingstone.
- Valizadehderakhshan, M., Shahbazi, A., Kazem-Rostami, M., Todd, M. S., Bhowmik, A., & Wang, L. (2021). Extraction of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. (Hemp)—Review. *Agriculture*, 11, 384.
- Veress, T., Szanto, J. I., & Leisztner, L. (1990). Determination of cannabinoid acids by high-performance liquid chromatography of their neutral derivatives formed by thermal decarboxylation: I. Study of the decarboxylation process in open reactors. *Journal of Chromatography A*, 520, 339-347.
- Vinatoru, M., Mason, T. J., Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159-178.
- Wianowska, D., Dawidowicz, A. L., & Kowalczyk, M. (2015). Transformations of Tetrahydrocannabinol, Tetrahydrocannabinolic Acid and Cannabinol during Their Extraction from *Cannabis sativa* L. *Journal of Analytical Chemistry*, 70(8), 920-925.
- Zajicek, J., Fox, P., Sanders, H., Wright, D., Vickery, J., Nunn, A., Thompson, A., & UK MS Research Group (2003). Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 362(9395), 1517-1526.
- 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, 27.