

“Evaluación de métodos y condiciones de extracción de inflorescencias de dos variedades de *Cannabis sativa*.”

Informe de Licenciatura en Química

Nicolás Caballero Álvarez

Facultad de Química, UDELAR

2025

Tutores

Dr. QF. Carlos García Carnelli

Dr. Ing. Alim. Ignacio Vieitez



i- RESUMEN

Este trabajo de investigación se centra en la evaluación de tres métodos de extracción aplicados a las inflorescencias de *Cannabis sativa* con el objetivo de optimizar la recuperación de cannabinoides y proporcionar resultados preliminares para determinar cuál es el método potencialmente más eficiente en términos de rendimiento y calidad del extracto obtenido.

Los métodos de extracción evaluados incluyeron maceración etanólica, extracción con CO₂ supercrítico (SFE) y extracción con líquidos presurizados (PLE). Para maceración etanólica se utilizaron condiciones fijas en todas las extracciones, ya que este método sirvió como referencia y no se variaron parámetros como el solvente (etanol), la temperatura o el tiempo de extracción. En el caso de SFE, las variables estudiadas fueron la temperatura y la presión, manteniendo el CO₂ como solvente en condiciones supercríticas. Por otro lado, en PLE, se variaron la temperatura y la composición del solvente, mientras que la presión se mantuvo constante.

Se utilizaron dos variedades de *C. sativa*: BB, rica en THC y P3, con una proporción aproximada 2:1 de CBD:THC. Se observó que SFE y PLE, técnicas que combinan alta presión y temperatura, proporcionaron rendimientos superiores en comparación con maceración etanólica. Los resultados más destacados se obtuvieron con SFE aplicando una presión de 380 bar y 60 °C, obteniéndose un rendimiento del 18,69% para la variedad BB. En las extracciones PLE, la mezcla de etanol/agua en proporción 60:40 a 80 °C resultó ser la más eficiente, alcanzando un rendimiento de 44,08% para la variedad BB, el más alto entre todos los métodos evaluados.

Además, se analizaron mediante HPLC-DAD las concentraciones de los principales cannabinoides en los extractos obtenidos. SFE destacó por extraer mayores cantidades de THC (hasta 36,52%) en comparación con la maceración etanólica. Por otro lado, la maceración etanólica fue más eficaz para preservar altos niveles de THCA, alcanzando un 69,97% para la variedad BB. En la variedad P3, los métodos más eficientes para extraer CBDA fueron maceración etanólica y PLE, con concentraciones de 37,41% y 34,46% respectivamente.

También, se llevó a cabo la determinación de compuestos volátiles no cannabinoides mediante GC-MS en diversas muestras de extractos obtenidos por SFE, así como en muestras obtenidas a partir de trampas de hexano ubicadas en la salida del CO₂ al ambiente y en los puntos de recolección de extractos.

En conjunto, estos resultados demuestran que si bien los perfiles cualitativos tienden a mantenerse entre extracciones de una misma variedad, las condiciones de extracción influyen en las concentraciones relativas de los compuestos. Además, la implementación de sistemas de recolección fraccionada y trampas externas puede aportar información valiosa sobre el comportamiento de los volátiles durante el proceso y optimizar su recuperación según el objetivo deseado.

Este trabajo no solo permitió identificar las condiciones más favorables para optimizar la extracción de cannabinoides desde una perspectiva técnica, sino que también sienta las

bases para futuras investigaciones orientadas a mejorar la calidad, eficiencia y sostenibilidad de los procesos de obtención de compuestos bioactivos a partir de *Cannabis sativa*. Además, constituye un puntapié inicial para el desarrollo de estudios estadísticos más robustos, con un número de datos representativo y amplio que permita evaluar y concluir de forma responsable aspectos clave como la eficiencia de extracción de los analitos de interés y los efectos que distintas metodologías y condiciones de extracción producen sobre el rendimiento y la composición del extracto final. Debido a las limitaciones de material vegetal disponible e inconvenientes técnicos de alguno de los equipos no fue posible profundizar completamente en estos aspectos, pero se buscó cubrir el mayor alcance posible dentro del marco experimental, dejando así una base sólida para continuar con investigaciones futuras.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1.- INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2.- ANTECEDENTES..... | 6 |
| 3.- METODOLGÍAS DE EXTRACCIÓN..... | 11 |
| 3.1- Maceración..... | 11 |
| 3.2- Extracciones con CO₂ en estado supercrítico..... | 11 |
| 3.3- Extracciones PLE..... | 13 |
| 4.- OBJETIVOS..... | 14 |
| 4.1-Objetivo general..... | 14 |
| 4.2-Objetivos específicos..... | 14 |
| 5.- MATERIALES Y METODOLOGÍA..... | 14 |
| 5.2.1- Análisis de cannabinoides por HPLC-DAD..... | 15 |
| 5.2.2- Maceración..... | 15 |
| 5.2.3- Extracción supercrítica..... | 16 |
| 5.2.4- Extracciones con líquidos presurizados..... | 17 |
| 5.2.5-Análisis por GC-MS..... | 18 |
| 5.3- Análisis estadísticos..... | 20 |
| 6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 21 |
| 6.1- Humedad de las flores previo a la extracción..... | 21 |
| 6.2- Análisis de flores previo a la extracción..... | 24 |
| 6.3- Rendimientos maceración etanólica..... | 28 |
| 6.4- Rendimientos extracciones por SFE..... | 29 |
| 6.4.1-Rendimientos extracciones por SFE variedad BB..... | 29 |
| 6.4.2-Rendimientos de las extracciones por SFE para la variedad P3..... | 31 |
| 6.5- Rendimientos extracciones por PLE..... | 33 |
| 6.5.1- Rendimientos extracciones por PLE variedad BB..... | 33 |
| 6.5.2- Rendimientos extracciones por PLE variedad P3..... | 35 |
| 6.6- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por maceración etanólica.. | 38 |
| 6.6.1- Concentración de cannabinoides en los extractos obtenidos por maceración etanólica variedad BB..... | 38 |
| 6.6.2 Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por maceración etanólica variedad P3..... | 39 |
| 6.7- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por SFE..... | 41 |
| 6.7.1- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por SFE variedad BB.... | 41 |
| 6.7.2 Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por SFE variedad P3..... | 42 |
| 6.8- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por PLE..... | 44 |

| | |
|---|----|
| 6.8.1- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por PLE variedad BB.... | 44 |
| 6.8.2- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por PLE variedad P3.... | 48 |
| 6.9- Contenido de volátiles analizados por GC..... | 55 |
| 6.9.1-Contenido de volátiles en trampas de hexano | 55 |
| 6.9.2-Contenido de volátiles en muestras de extracto (BBE1, BBE6, P3E1, P3E6, BBE7 ciclón 1, BBE7 ciclón 2, BBE7 ciclón 3) | 58 |
| 7.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS..... | 69 |
| 8.- BIBLIOGRAFÍA..... | 71 |
| 9.-ANEXOS..... | 1 |

iii- LISTA DE ABREVIATURAS

| Abreviación | Nombre |
|-------------------|--|
| BB | variedad de <i>C. sativa</i> Bruce Banner |
| BBES | Waters Bio-Botanical Extraction System |
| cAMP | adenosín monofosfato cíclico |
| CB1 | Receptor de cannabinoides CB1 |
| CB2 | Receptor de cannabinoides CB2 |
| CBD | Cannabidiol |
| CBDA | Ácido cannabidiólico |
| CBC | Cannabicromeno |
| CBCA | Ácido canbicroménico |
| CBN | Cannabinol |
| CBG | Cannabigerol |
| CBGA | Ácido canabigerólico |
| CV | Coefficiente de variación |
| DMII | Durga Mata II |
| DOXP | 1-desoxi-D-xilosa-5-fosfato |
| GC | Cromatografía de gases |
| GC-FID | Cromatografía de gases con detector de ionización de llamas |
| GC-MS | Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas |
| GPP | pirofosfato de geranilo |
| GRAS | Generally Recognized as Safe |
| GSC | Girl Scout Cookies |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficiencia |
| HPLC-DAD | Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos |
| MD | Maceración dinámica |
| ME | Maceración estática |
| P3 | variedad de <i>C. sativa</i> P3 |
| PLE | Extracción con líquidos presurizados |
| RSM | Metodología de superficie de respuesta |
| scCO ₂ | Extracción con CO ₂ supercrítico |
| SFE | Extracción con fluido supercrítico |
| SCE | Sistema Cannabinoide Endógeno |
| THC | Tetrahidrocannabinol |
| THCA | Ácido tetrahidrocannabinólico |

1.- INTRODUCCIÓN

El cannabis (*Cannabis sativa* L.) es una planta ampliamente distribuida en el planeta, que ha proporcionado al hombre fibra, alimentos, aceite, medicinas y estupefacientes desde tiempos del neolítico (1). Esta especie produce un gran número de metabolitos secundarios entre los que se destacan cannabinoides, terpenoides y flavonoides (2).

Los cannabinoides son los compuestos de mayor relevancia dada su actividad biológica y su producción exclusiva por este género vegetal, se trata de terpenofenoles definidos como un grupo de compuestos formados por 21 átomos de carbono (Figura 1), característicos del género Cannabis, entre los que se incluyen sus derivados y productos de transformación (3).

Actualmente, se han identificado más de 100 compuestos cannabinoides, entre los que se destacan el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), el cannabidiol (CBD) y el cannabinol (CBN) (Figura 1). Los demás compuestos se encuentran presentes en cantidades reducidas y variables, siendo probablemente el cannabicromeno (CBC) y el cannabigerol (CBG) los más conocidos (4).

El CBD es uno de los 113 cannabinoides presentes en la planta *Cannabis sativa* y fue descubierto en 1940. Junto con el THC, es uno de los compuestos más abundantes de la planta (5). Es insoluble en agua y presenta solubilidad en solventes orgánicos. A temperatura ambiente, se encuentra en forma de un sólido cristalino e incoloro (6). A diferencia del THC, que actúa como agonista parcial del receptor endocannabinoide CB1, el CBD tiene un efecto opuesto y actúa como un antagonista de este receptor (7,8).

El THC, también conocido como delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), es el principal compuesto psicoactivo presente en la planta de cannabis. Este compuesto tiene una baja solubilidad en agua, pero se disuelve con facilidad en la mayoría de los solventes orgánicos, especialmente en lípidos y alcoholes (9). La actividad farmacológica del THC se debe a su acción como agonista parcial sobre los receptores cannabinoides CB1 y CB2. El receptor CB1 se encuentra principalmente en el sistema nervioso central, mientras que el receptor CB2 se expresa predominantemente en las células del sistema inmunitario. Los efectos psicoactivos del THC están mediados principalmente por su interacción con los receptores CB1 acoplados a proteínas G, lo que provoca una reducción de las concentraciones del segundo mensajero cAMP debido a la inhibición de la adenilil ciclasa (10). El THC posee propiedades analgésicas leves a moderadas. Además, su efecto psicotrópico puede contribuir al manejo del dolor mediante la modulación de la liberación de neurotransmisores en el ganglio espinal de la médula espinal y en la sustancia gris periacueductal (10).

El CBN es un subproducto oxidativo no enzimático del THC, más abundante en muestras de cannabis envejecidas en el tiempo. Tiene una menor afinidad por los receptores de cannabinoides (CB1 y CB2) y se consideró inactivo cuando se probó solo en voluntarios humanos, pero produjo una mayor sedación combinado con THC (11). El CBN fue el primer compuesto aislado representativo de los cannabinoides, aunque su estructura química no fue caracterizada correctamente hasta 1940 (12). En este sentido, el CBD no

fue aislado hasta mitad del siglo XX, mientras que la estructura del Δ^9 -THC fue totalmente caracterizado en 1964 por Gaoni y Mechoulam (13).

El desarrollo de cannabinoides sintéticos (14) y el descubrimiento de los endocannabinoides han impulsado el uso del término "fitocannabinoides" para la descripción específica de este tipo de compuestos. Los fitocannabinoides son metabolitos secundarios sintetizados principalmente en los tricomas de la flor femenina de la planta de cannabis. Estos compuestos interactúan con el sistema endocannabinoide en humanos y otros mamíferos influyendo sobre funciones fisiológicas y cognitivas como el dolor, el estado de ánimo, el apetito y la memoria (15,12).

La mayoría de las acciones farmacológicas de los cannabinoides se deben a que actúan mimetizando la acción de los ligandos endógenos (endocannabinoides) del Sistema Cannabinoide Endógeno (SCE) (16). Este es un sistema regulador que es capaz de modular gran variedad de efectos fisiológicos. Está formado por receptores específicos y mecanismos de síntesis y degradación (17).

El SCE contiene tres componentes clave: endocannabinoides, receptores de cannabinoides y enzimas (18). Los endocannabinoides son moléculas naturales presentes en el organismo de los mamíferos siendo capaces de interactuar con los receptores de cannabinoides (19).

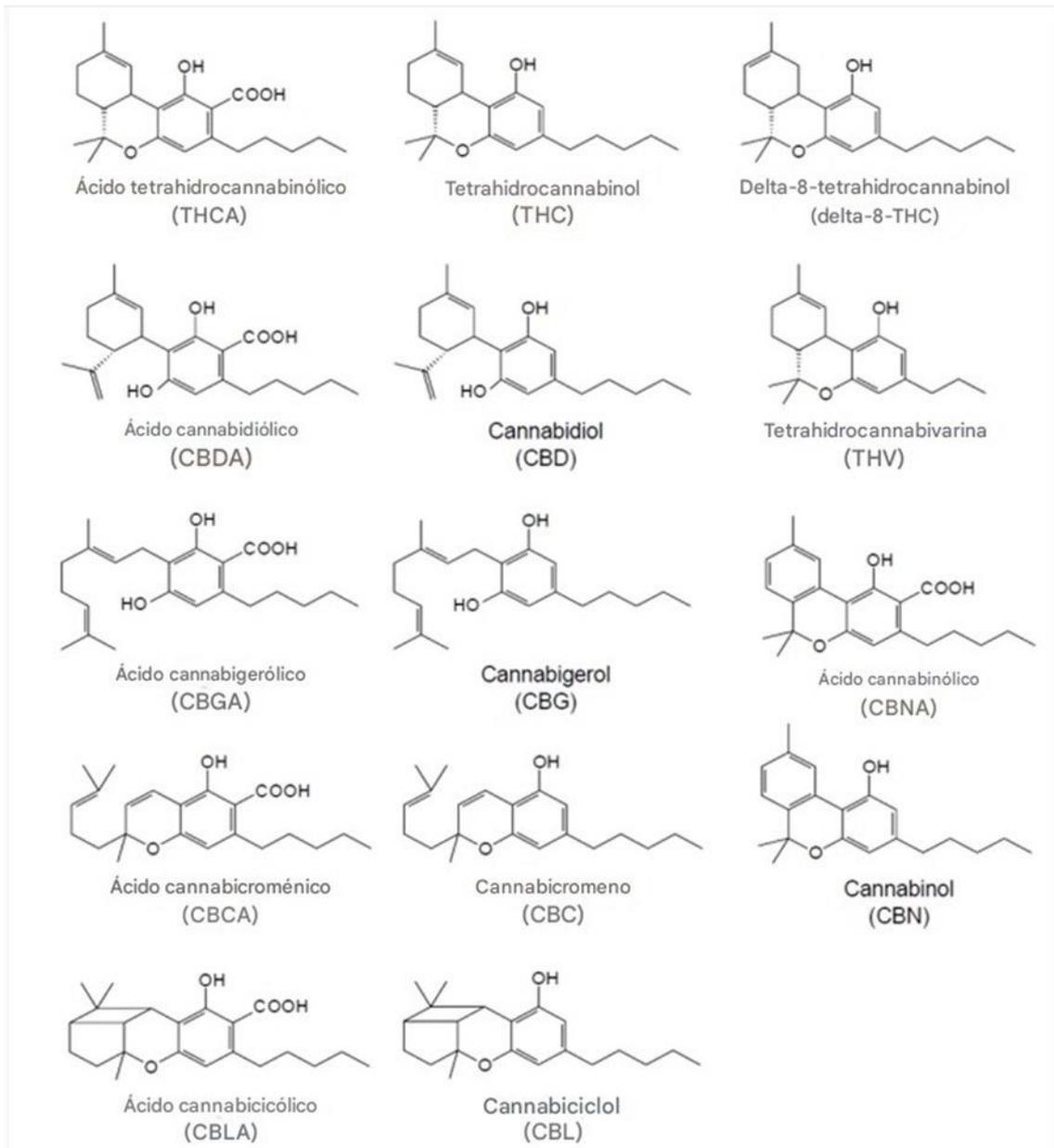


Figura 1: Estructura química de los principales cannabinoides presentes en la planta *C. sativa*.

La ruta biosintética de los cannabinoides de *C. sativa* L. ha sido elucidada casi por completo (20). 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 ácido mevalónico o vía de 1-desoxi-D-xilosa-5-fosfato (DOXP), que conduce a la formación del pirofosfato de geranilo (GPP) (Figura 2) (21).

La C-alquilación del ácido olivetólico con GPP catalizada por una sintasa, conduce a la formación de ácido cannabigerólico (CBGA), precursor central de varios cannabinoides (22). A partir del CBGA, se producen diferentes procesos de ciclación oxidativa catalizados por enzimas que dan lugar al ácido tetrahidrocannabinólico (THCA), al ácido cannabidiólico (CBDA) y al ácido cannabicroménico (CBCA). Estos compuestos que se

encuentran en su forma ácida no pueden unirse a los receptores de cannabinoides con gran afinidad (23). Para aumentar su biodisponibilidad y mejorar su capacidad para unirse a estos receptores, es necesario que estos compuestos se descarboxilen y se encuentren en sus formas neutras (24). La descarboxilación es un proceso químico que elimina un grupo carboxilo de los cannabinoides ácidos, tales como THCA y CBDA, convirtiéndolos en sus formas neutras activas (THC y CBD respectivamente) (Figura 3). Un aspecto importante a tener en cuenta es que la temperatura y el tiempo óptimo para la descarboxilación pueden variar según el tipo específico de cannabinoide o producto que se procese (flores o extractos). La descarboxilación juega un papel crucial en la maximización del potencial terapéutico de los cannabinoides y es un paso importante en la producción de muchos productos a base de cannabis.

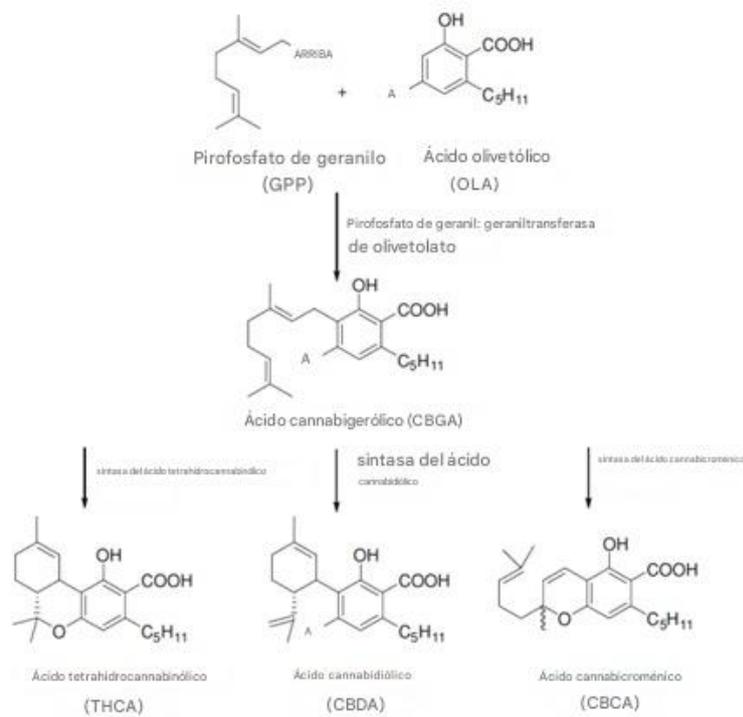


Figura 2: Ruta biosintética de los principales cannabinoides ácidos presentes en la planta C. sativa.

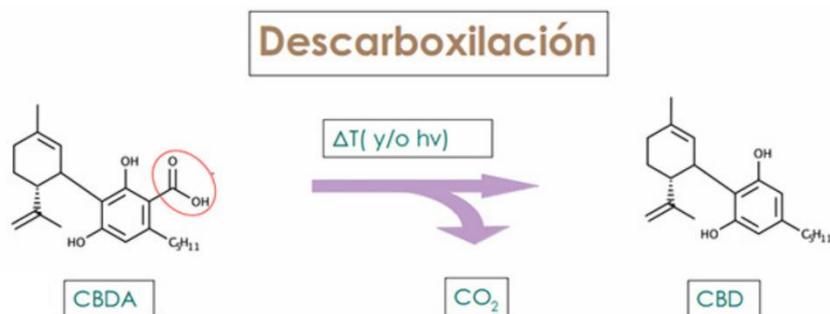


Figura 3: Proceso de descarboxilación mediante la aplicación de calor (ΔT) o radiación ($h\nu$), liberando dióxido de carbono (CO_2).

Por otro lado, los terpenos son compuestos cuya estructura básica está compuesta por unidades de isopreno. Estos compuestos y sus derivados oxigenados son responsables de muchas de las características aromáticas y medicinales de las plantas (11). Los terpenos pueden producir efectos terapéuticos que pueden contribuir significativamente a los efectos de los extractos medicinales a base de cannabis. Las interacciones entre fitocannabinoides y terpenoides pueden producir una sinergia en el tratamiento de varias afecciones como la sensación de relajación, alivio del estrés, aumento de energía y mantenimiento de la concentración junto con sus funciones farmacéuticas subyacentes, actividad conocida como efecto séquito (11, 25, 26).

Hasta la fecha, se han reportado más de 200 compuestos volátiles de las diferentes variedades de cannabis (27). Entre otros, los principales componentes monoterpénicos son el limoneno, el β -mirceno, el α -pineno y el linalol con trazas de α -terpinoleno y trans- β ocimeno, mientras que los sesquiterpenos predominantes son el β -cariofileno, el óxido de cariofileno y el β -farneseno (26).

Dependiendo de las composiciones variables de los terpenos, las diferentes variedades de cannabis provocan diferentes aromas (28, 29, 31). La composición de terpenos del cannabis es una variable estacional; la alteración en la proporción de terpenoides en el cannabis depende de su variedad, la parte de la planta, las condiciones ambientales, la madurez y el método de análisis (30, 31).

Las diferentes etapas de crecimiento del cannabis podrían dar lugar a variaciones considerables en la composición de terpenos. Se determinó que el perfil de estos compuestos en la etapa vegetativa tiene una proporción mucho menor de monoterpenos que en la etapa de floración (32).

La diversa composición de cannabinoides y terpenos en inflorescencias de diferentes variedades de *C. sativa* destaca la importancia de caracterizar sus compuestos para poder evaluar posibles efectos medicinales. Esta comprensión puede ayudar a los profesionales de la salud a elegir la variedad más efectiva para la terapia de sus pacientes (33).

La extracción, caracterización y cuantificación precisas de los cannabinoides son fundamentales para un tratamiento efectivo y pueden conducir al desarrollo de nuevos productos y tratamientos para afecciones como el dolor crónico, la ansiedad, la depresión, la epilepsia y el cáncer (33).

Una mejor comprensión de los perfiles de los fitocannabinoides y las condiciones óptimas de extracción puede conducir a mezclas de extractos mejoradas que ofrezcan una mejor calidad, uniformidad y eficacia terapéutica.

Además, el estudio de diferentes métodos de extracción y variedades de cannabis puede promover la investigación científica y el desarrollo de nuevos productos terapéuticos (33).

En conclusión, además de caracterizar los principales componentes bioactivos de una planta medicinal como *C. sativa*, resulta relevante establecer los rendimientos y perfiles químicos de los extractos obtenidos bajo diferentes condiciones. Resulta importante estudiar los procesos de extracción de los compuestos bioactivos buscando las condiciones óptimas y caracterizando los extractos obtenidos.

2.- ANTECEDENTES

La extracción de compuestos del cannabis sigue siendo objeto de estudio de muchos investigadores. El principal método de extracción de compuestos cannabinoides a partir de distintas partes de *C. sativa* es la extracción convencional con solventes orgánicos (34). La desventaja de estas técnicas consiste en que requieren mucho tiempo y utilizan un volumen grande de solvente orgánico con toxicidad para el medio ambiente y para el humano. Por lo tanto, el desarrollo de técnicas modernas de extracción como la extracción asistida por ultrasonido, la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la extracción con líquidos presurizados (PLE) se han investigado como alternativa a las nombradas en primer lugar. Dentro de las ventajas, se pueden evidenciar la reducción en la utilización de solventes orgánicos, la eficiencia de extracción, la selectividad hacia los compuestos de interés y la facilidad de automatización, entre otras.

La SFE y la PLE son ampliamente reconocidas como metodologías de extracción debido a que existen experiencias exitosas de su aplicación para extraer compuestos en forma selectiva en varias matrices vegetales que podrían implementarse a escala industrial (34).

La extracción con CO₂ se utiliza cada vez más para el aislamiento de cannabinoides y terpenos de flores de *C. sativa*. Algunas investigaciones se han centrado en la optimización de las condiciones de extracción, la solubilidad de los cannabinoides individuales y la evaluación de la eficiencia de extracción en comparación con otras técnicas de extracción (35).

En el desarrollo del presente este estudio comenzó con una exhaustiva búsqueda bibliográfica destinada a identificar antecedentes sobre las condiciones óptimas para la extracción de flores de *C. sativa* mediante las metodologías de PLE y SFE. Este paso inicial fue fundamental para establecer los parámetros experimentales que guiarían el desarrollo del trabajo.

Con el fin de comparar las extracciones obtenidas por PLE y SFE, como punto de referencia se decidió realizar extracciones por duplicado mediante maceración con etanol 95° en dos variedades distintas de *C. sativa*. Para ello, se tomó como guía el estudio de Fernández y colaboradores (36), pero adaptando el proceso a una escala mayor.

Para SFE se tomaron como referencia las condiciones más relevantes en cuanto a rendimiento de las bibliografías citadas, nombradas en los antecedentes previamente descritos, incorporando las condiciones utilizadas en la empresa donante del material vegetal.

Para PLE, dada la falta de antecedentes, se realizó un diseño experimental como se explica en la sección 5.3, estudiando la relación entre las variables mediante la metodología de superficie de respuesta.

Por ejemplo, Grijó y colaboradores (35), encontraron que las mejores condiciones para extraer CBD y THC con CO₂ supercrítico fueron 70 °C y 220 bar, después de una descarboxilación previa de 30 minutos a 140°C(35).

Esta condición permitió maximizar el contenido de THC en el extracto, alcanzando hasta un 84% y para CBD un 3,2% (Tabla 1).

Tabla 1: Análisis de la composición de extractos invernizados obtenidos por el método de descarboxilación (35). Se muestra los rendimientos porcentuales en masa y la composición de cannabinoides de los extractos supercríticos obtenidos en relación con las condiciones de temperatura, presión y densidad del scCO₂ puro utilizado como disolvente.

| Corrida | Condiciones | Rendimiento (%) | Compuestos | Total (%) |
|---------|---|-----------------|---------------------|-------------|
| 1 | Precalentamiento: 140 °C por 30 min, 220 bar; 70 °C, d=0.6695 g ml ⁻¹ | 8,3 | CBD | 3,2 ± 0,4 |
| | | | Δ ⁹ -THC | 84,0 ± 1,0 |
| 2 | Precalentamiento: 140 °C por 30 min, 400 bar; 70 °C, d=0.8577 g ml ⁻¹ | 9,4 | CBD | 3,1 ± 0,3 |
| | | | Δ ⁹ -THC | 75 ± 1,0 |
| 3 | Precalentamiento: 140 °C por 120 min, 220 bar; 70 °C, d=0.6695 g ml ⁻¹ | 5,9 | CBD | 0,25 ± 0,01 |
| | | | Δ ⁹ -THC | 54,4 ± 0,4 |
| 4 | Precalentamiento: 140 °C por 120 min, 400 bar; 50 °C, d=0.9239 g ml ⁻¹ | 7,1 | CBD | 2,8 ± 0,2 |
| | | | Δ ⁹ -THC | 40,4± 0.5 |
| 5 | Precalentamiento: 140 °C por 30 min, 400 bar; 50 °C, d=0.9239 g ml ⁻¹ | 7,9 | CBD | 2,7 ± 0,2 |
| | | | Δ ⁹ -THC | 68,3 ± 0,4 |

Otro trabajo de Grijó y colaboradores (37) tuvo como objetivo investigar el efecto de las condiciones de extracción en el rendimiento y la composición de los cannabinoides neutros de dos variedades híbridas de flores de *C. sativa* (37). El estudio comparó dos estrategias de extracción de cannabinoides de flores: extracción con solventes orgánicos y extracción con dióxido de carbono supercrítico. La extracción con scCO₂ se realizó a diferentes temperaturas y presiones y se determinó que las mejores condiciones en extracto invernizado para obtener cannabinoides neutros de flores no descarboxiladas fueron: 70 °C y 249 bar para CBD y 70 °C y 165 bar para THC en la variedad "GSC" (Tabla 2), en tanto en la variedad "DMII" para CBD y THC, 70°C y 165 bar son las condiciones óptimas (37) (Tabla 3).

Tabla 2: Composición de los extractos obtenidos por la primera estrategia de la variedad "GSC" (37).

| Extracto | Cannabinoides | 50 °C 165 bar | 50 °C 249 bar | 70 °C 165 bar | 70 °C 249 bar | 60 °C 207 bar |
|---------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Crudo | CBD | 5,08 ± 2.01 | 1,21 ± 0,17 | 1,35 ± 0,04 | 1,81 ± 0,31 | 2,29 ± 0,23 |
| | Δ ⁹ -THC | 2,22 ± 0.74 | 1,38 ± 0,14 | 1,94 ± 0,39 | 4,09 ± 0,70 | 2,24 ± 0,10 |
| | Rendimiento | 20,5 | 24,5 | 14,9 | 20,4 | 22,1 ± 1,70 |
| Invernalizado | CBD | 85,41 ± 4,26 | 84,12 ± 6,45 | 85,95 ± 0,93 | 88,51 ± 1,54 | 76,20 ± 3,82 |
| | Δ ⁹ -THC | 0,53 ± 0,59 | 0,62 ± 0,07 | 1,18 ± 0,04 | 0,54 ± 0,66 | 1,38 ± 0,87 |

Tabla 3: Composición de los extractos obtenidos por la primera estrategia de la variedad "DMII" (37).

| Extracto | Cannabinoides | 50 °C 165 bar | 50 °C 249 bar | 70 °C 165 bar | 70 °C 249 bar | 60 °C 207 bar |
|---------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Crudo | CBD | 35.23 ± 6.69 | 33.81 ± 0.43 | 43.00 ± 3.54 | 33.42 ± 2.48 | 38.66 ± 3.59 |
| | Δ ⁹ -THC | 29.18 ± 8.66 | 30.79 ± 0.93 | 32.69 ± 2.79 | 32.69 ± 3.12 | 32.82 ± 0.98 |
| Invernalizado | CBD | 34.43 ± 2.89 | 33.88 ± 2.65 | 38.88 ± 3.07 | 31.75 ± 3.15 | 37.76 ± 1.87 |
| | Δ ⁹ -THC | 0.31 ± 0.02 | 0.28 ± 0.13 | 0.45 ± 0.29 | 0.22 ± 0.08 | 0.39 ± 0.01 |

En otro trabajo reportado por Fernández y colaboradores (36), empleando extracción con scCO₂, tuvo como objetivo evaluar la extracción de cannabinoides de dos variedades de inflorescencias de *C. sativa* L., 'A' con alto contenido de THC y 'B' con alto contenido de CBD. Los resultados del estudio mostraron que las mejores condiciones de extracción para obtener el mayor rendimiento fueron diferentes para cada variedad. Para flores A, no descarboxiladas y sin uso de co-solventes en el proceso, solo scCO₂, las mejores condiciones de extracción para el THC resultaron ser a 300 bar y 70 °C, con un rendimiento de 17,2% (Tabla 4). Por otro lado, para las flores B, utilizando flores no descarboxiladas y sin uso de co-solventes en el proceso de extracción, solo scCO₂, las condiciones para obtener el mayor rendimiento en CBD fueron 60 °C y 300 bar, con un rendimiento de 12,7% (36) (Tabla 5).

Tabla 4: Análisis de composición de extractos invernalizados obtenidos del quimiotipo A (36).

| Extracción | Condiciones | Rendimientos (%) | THC (%) | THCA (%) | Total, THC (THC+THCA) (%) |
|------------|--|------------------|------------|------------|---------------------------|
| 1 | 60 °C; 200 bar | 9.3 ± 0.9 | 32.4 ± 1.1 | 25.0 ± 1.4 | 75.9 ± 4.7 |
| 2 | 70 °C; 300 bar | 17.2 ± 0.7 | 41.5 ± 1.4 | 22.2 ± 1.2 | 75.0 ± 1.0 |
| 3 | 60 °C; 200 bar; 10% EtOH | 20.6 ± 0.4 | 21.2 ± 0.4 | 44.2 ± 3.3 | 88.0 ± 0.3 |
| 4 | 70 °C; 300 bar; 10% EtOH | 20.8 ± 0.6 | 30.9 ± 0.6 | 44.5 ± 2.8 | 97.2 ± 0.5 |
| 5 | 70 °C; 300 bar; 12% CO ₂ for 45 min, 50 °C; 300 bar; 10% EtOH | 20.0 ± 0.6 | 63.6 ± 1.8 | 25.2 ± 0.4 | 93.8 ± 0.8 |
| 6 | 50 °C; 300 bar; 10% EtOH | 18.0 ± 0.7 | 11.7 ± 0.6 | 54.2 ± 2.5 | 76.2 ± 0.8 |

Tabla 5: Análisis de composición de extractos invernizados obtenidos del quimiotipo B6 (36).

| Extracción | Condiciones | Rendimiento (%) | CBD (%) | CBDA (%) | Total, CBD + CBDA (%) |
|------------|---|-----------------|------------|------------|-----------------------|
| 7 | 50 °C; 200 bar | 10.3 ± 0.5 | 6.2 ± 0.5 | 81.7 ± 2.5 | 49.3 ± 1.0 |
| 8 | 60 °C; 300 bar | 12.7 ± 0.4 | 7.3 ± 0.5 | 81.8 ± 2.5 | 62.4 ± 1.1 |
| 9 | 60 °C; 200 bar; 10% EtOH | 15.7 ± 0.6 | 9.3 ± 0.6 | 78.4 ± 2.7 | 79.7 ± 1.5 |
| 10 | 60 °C; 300 bar; 10% EtOH | 17.5 ± 0.4 | 4.9 ± 0.9 | 97.6 ± 2.9 | 95.4 ± 1.0 |
| 11 | 60 °C; 300 bar; 10% EtOH, 120 °C for 45 min | 14.6 ± 0.6 | 50.8 ± 1.4 | 2.9 ± 0.3 | 48.7 ± 1.1 |

Por último, en el trabajo de Rovetto y colaboradores (38), las mejores condiciones para el rendimiento de extracción sin el uso de co-solvente se determinaron a 340 bar y 55°C, en este trabajo se reitera la dependencia del rendimiento y perfil de cannabinoides según la variedad de material vegetal utilizado. Los rendimientos oscilaron entre 8,8% y 19,15%, en tanto la composición de cannabinoides varió, teniendo resultados de THC total entre 56,6% a 69,4% (38) (Tabla 6).

Tabla 6: Rendimientos del extracto y composición de cannabinoides a 340 bar y 55°C (38).

| Rendimientos y concentración | | | | | |
|------------------------------|---------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Muestra | Rendimiento | CBDA% | THCA% | THC% | THCtotal% |
| Muestra A | 0,185 ± 0,005 | 1,09 ± 0,93 | 49,75 ± 2,54 | 25,78 ± 1,82 | 69,41 ± 2,87 |
| Muestra B | 0,191 | 1,66 | 46,37 | 20,55 | 61,21 |
| Muestra C | 0,152 | 0,97 | 39,68 | 23,07 | 57,86 |
| Muestra D | 0,088 | 0,01 | 32,35 | 27,69 | 56,06 |

En lo que considera a PLE, si bien no hay muchos antecedentes de la aplicación de esta metodología de extracción en flores de Cannabis, según el trabajo de Serna-Loaiza y colaboradores (39), las mejores condiciones para la extracción de CBD y THC con etanol son a 50 bar y 50 °C, con una eficiencia de extracción de 92,6% y 96,8% respectivamente (39).

3.- METODOLGÍAS DE EXTRACCIÓN

3.1- Maceración

La maceración es una de las técnicas de extracción más antiguas utilizadas para extraer cannabinoides y otros fitoquímicos de diferentes matrices vegetales y por tanto de la planta de cannabis. Este método (extracción del tipo sólido/líquido) implica dejar en contacto el material vegetal en un solvente, generalmente a temperatura ambiente, durante un tiempo determinado con o sin agitación periódica (36).

Para optimizar el proceso de maceración primero se puede realizar un pre-tratamiento que consiste en moler el material vegetal para aumentar la superficie de contacto con el solvente, seguido de su inmersión en un solvente adecuado (como por ejemplo etanol o metanol) durante un tiempo variable. Posteriormente, la mezcla se filtra para separar el extracto líquido del residuo sólido y el solvente se evapora generalmente a presión reducida, obteniendo un extracto concentrado de cannabinoides (36) (40).

La maceración es un método simple y rentable, pero tiene algunas limitaciones como por ejemplo la selectividad de los compuestos a extraer y la cantidad de solvente utilizada (40).

La creciente demanda por parte de la industria impone la necesidad de desarrollar métodos de extracción más eficientes, con el máximo rendimiento/selectividad, en un corto período de tiempo, generando un menor impacto ambiental (41). Así, en los últimos años, existe interés en cuanto al diseño y desarrollo de "Tecnologías Verdes", para lograr resultados similares o superiores a los obtenidos por los métodos convencionales de extracción. En este sentido, la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la extracción con líquidos presurizados (PLE) son las dos técnicas más empleadas para obtener compuestos bioactivos (42).

3.2- Extracciones con CO₂ en estado supercrítico

Los fluidos supercríticos se caracterizan por tener una viscosidad relativa baja y un coeficiente de difusión alto si se los compara con los solventes orgánicos convencionales, lo que favorece su desempeño como solvente para procesos de extracción. A su vez, la densidad y difusividad de estos fluidos se puede ajustar mediante variaciones de temperatura y presión. Este hecho permite ajustar sus propiedades de selectividad frente a varios compuestos. En particular, el dióxido de carbono es el solvente más comúnmente usado en el área alimentaria y farmacéutica debido a su seguridad, disponibilidad y bajo costo. En estado supercrítico, el CO₂ posee un gran poder solvente y selectividad en la extracción de compuestos como terpenos, ácidos grasos y otros. El punto crítico del CO₂ es en condiciones de temperatura y presión relativamente bajas

(31,1 °C y 73,9 bar) lo cual permiten utilizar condiciones de extracción moderadas protegiendo así los productos termolábiles de interés. Además, es considerado una sustancia GRAS (Generally Recognized as Safe) en la industria alimentaria (42).

La SFE es una técnica moderna para la extracción de compuestos de fuentes naturales, con ventajas sobre otros métodos, incluidas su flexibilidad, una alta eficiencia de extracción, selectividad para diferentes compuestos (por ejemplo los cannabinoides) y la capacidad de producir extractos de alta pureza sin el uso de solventes potencialmente tóxicos. Sin embargo, la SFE requiere una inversión inicial más alta en comparación con las técnicas tradicionales, aunque es un proceso que se puede escalar fácilmente a nivel industrial (45).

El proceso de SFE se inicia con la preparación del material vegetal, donde el mismo se muele para aumentar la superficie de contacto. Luego se coloca en un recipiente de extracción y se bombea CO₂ supercrítico al recipiente a alta presión y temperatura, lo que hace que penetre en la matriz de la planta y disuelva los cannabinoides (44,45). La mezcla de CO₂ y cannabinoides pasa a través de un separador donde se reduce la presión, lo que hace que el CO₂ vuelva a su estado gaseoso y precipiten los cannabinoides extraídos (46). El gas CO₂ a menudo se recicla nuevamente al sistema, lo que hace que el proceso sea más económico y respetuoso con el medio ambiente (43) (Figuras 4 y 5).

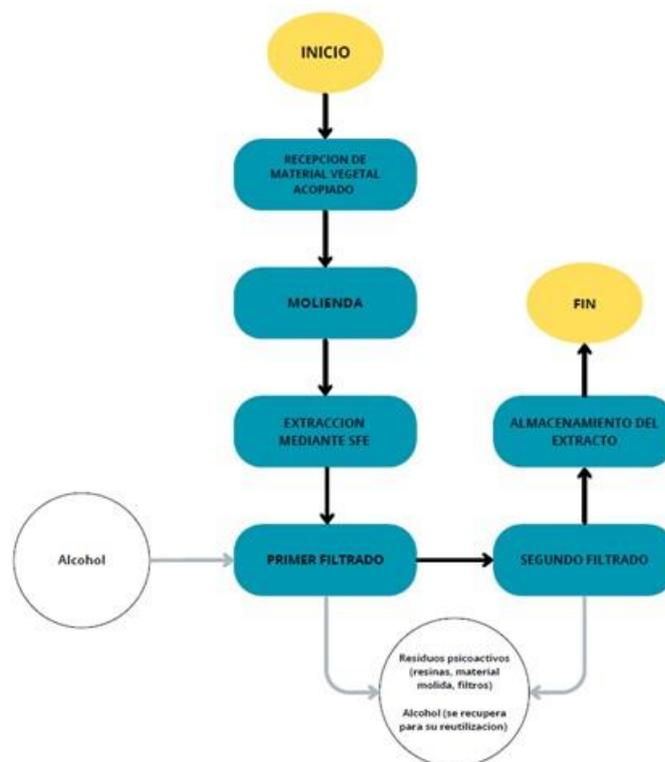


Figura 4: Diagrama de flujo del proceso de extracción: desde la recepción del material vegetal y molienda hasta el almacenamiento del extracto.

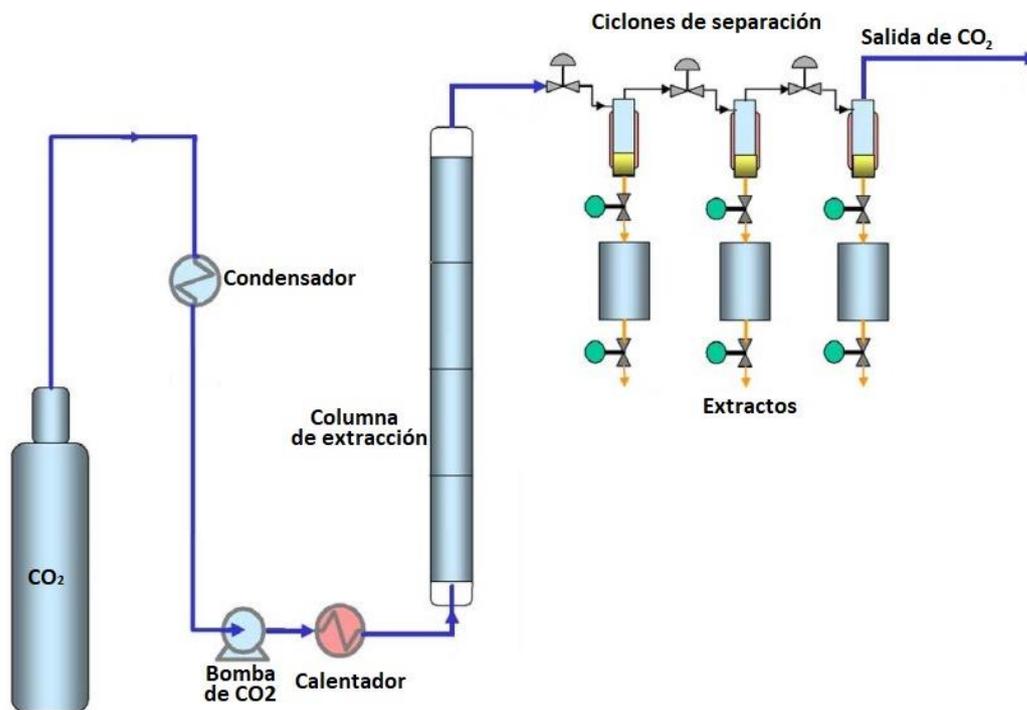


Figura 5: Esquema del sistema de extracción supercrítica con CO₂: incluye bombas, recipientes de extracción, y ciclones de recuperación para el extracto.

3.3- Extracciones PLE

La extracción con líquidos presurizados (PLE) es una técnica automatizada y asociada a la química verde para extraer compuestos de diferentes matrices. Esta tecnología utiliza solventes a temperaturas mayores a su punto de ebullición (y menores a su punto crítico), a una presión suficiente para que se mantenga en estado líquido durante todo el proceso de extracción. Estas condiciones resultan en extracciones más rápidas, en las que se obtienen altos rendimientos de extracción con bajos volúmenes de solvente. Esto se debe a que, en las condiciones de temperatura y presión elevadas mejora la cinética de transferencia de masa. La alta temperatura aumenta la solubilidad de los analitos en el solvente, mientras que la viscosidad y la tensión superficial del solvente disminuyen, permitiendo una mayor penetración en la matriz. La posibilidad de extraer a temperaturas más altas mejora la cinética de extracción al mejorar la solubilidad y la transferencia de masa entre la matriz y el solvente de extracción. Desde el punto de vista de la química verde, esta técnica ofrece varias ventajas, tales como la reducción de los volúmenes de residuos orgánicos utilizados, la capacidad de realizar la limpieza simultáneamente en la propia celda de extracción, la alta eficiencia de extracción lograda al trabajar con solventes líquidos por encima de su temperatura de ebullición y la capacidad de procesar las muestras automáticamente (47).

El proceso normalmente se inicia también con la molienda de la planta de cannabis hasta obtener un determinado tamaño de partícula para aumentar la superficie de extracción. Durante el proceso de extracción el material vegetal se somete a solventes líquidos a alta

presión que penetran en la matriz vegetal y disuelven los cannabinoides. Posteriormente se elimina el solvente, generalmente por rotaevaporación a presión reducida, obteniendo un extracto concentrado de cannabinoides (45).

4.- OBJETIVOS

4.1-Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue ensayar diferentes métodos de extracción de inflorescencias provenientes de dos variedades de *C. sativa* para analizar el rendimiento, el perfil de cannabinoides y terpenos de los extractos resultantes.

4.2-Objetivos específicos

- 1.- Obtener extractos mediante distintos métodos: maceración, scCO₂ y PLE, y comparar los rendimientos obtenidos.
- 2.- Determinar las concentraciones de los principales cannabinoides presentes en cada variedad vegetal y en los extractos obtenidos en cada extracción.
- 3.- Establecer los perfiles terpénicos de los extractos seleccionados de cada variedad obtenidos por SFE.

5.- MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1- Materiales y equipos

El material vegetal utilizado en este estudio fue suministrado por la empresa GrüneLabs y corresponde a dos variedades específicas de *C. sativa*: la variedad BB (Anexo 1), caracterizada por su alto contenido de THC y la variedad P3 (Anexo 2 y 3), con una proporción 2:1 de CBD:THC. Tras la cosecha y secado, el material vegetal fue almacenado en bolsas al vacío, asegurando que la humedad estuviera por debajo del 15%. Antes de iniciar las extracciones, este material fue conservado en freezer a -30°C, con el fin de mantener su estabilidad durante todo el proceso experimental. En este punto quisiera expresar mi agradecimiento a la empresa, a su Directora técnica (QF. Romina Espinosa) y mis compañeros (Qco. Felipe Costa, TQ. Irina Borges y Qco. Martín Haget) por la disponibilidad de tiempo brindada o por el apoyo en mis tareas laborales para que pueda realizar este trabajo.

Cada extracción estuvo precedida por la caracterización fisicoquímica del material para determinar tanto el contenido de humedad previo a la extracción como la concentración de los principales cannabinoides presentes en las flores de *C. sativa*. Para la determinación de la humedad se utilizó un analizador de humedad Sartorius MA37

(Anexo 4), mientras que la cuantificación de los cannabinoides se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-DAD), utilizando un equipo Shimadzu LC-2050c (Anexo 5), se utilizó una columna con fase estacionaria C18 (250 mm x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula) (Purospher STAR RP-18endcapped, Merck).

5.2- Métodos analíticos y de extracción

5.2.1- Análisis de cannabinoides por HPLC-DAD

La técnica de análisis tanto para flores como para extractos pertenece a la empresa que donó el material vegetal, las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: flujo 1,2 mL/min, temperatura del horno 30 °C, volumen de inyección 10 µL, tiempo de análisis 20 min por muestra, longitud de onda 228 nm para cannabinoides neutros y 270 nm para cannabinoides ácidos. La fase móvil fue un gradiente entre la fase móvil A (formiato de amonio (Carlo Erba) 20mM + ácido fórmico (98%-100%, Merck) 0,25% en agua) y fase móvil B (acetonitrilo grado HPLC, Carlo Erba). El gradiente utilizado se describe en la Tabla 7:

Tabla 7: Gradiente de fase móvil para el análisis de cannabinoides por HPLC-DAD.

| Tiempo (min) | Fase móvil A | Fase móvil B |
|--------------|--------------|--------------|
| 0 | 50 | 50 |
| 11,00 | 5 | 95 |
| 14,00 | 5 | 95 |
| 14,01 | 50 | 50 |
| 20,00 | 50 | 50 |

Se construyeron curvas de calibración lineales para todos los cannabinoides disponibles a partir de una mezcla de estándares analizados en el rango de 2 µg/mL a 100 µg/mL. El etanol de grado técnico (95% vol/vol) se obtuvo de Droguería Industrial Uruguaya, el metanol de grado HPLC fue de Carlo Erba. El CO₂ (99,90%-99,95% de pureza) fue comprado a Linde (Montevideo, Uruguay). Las soluciones estándar de CBDA, CBD, CBN, Δ9-THC, THCA fueron adquiridas en Restek (Cayman Chemical Company).

5.2.2- Maceración

Las inflorescencias se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm y se prepararon 60 gramos de material vegetal para cada extracción. Este material se puso en contacto con 600 mL de etanol 95° a temperatura ambiente y se agitó durante 40 segundos, posteriormente se filtró y se almacenó en congelador (Anexo 6). Luego de esto comienza el proceso conocido como invernización o winterizado en el que tras un período de reposo de al menos 40 horas a -30°C aproximadamente, el extracto se filtró utilizando un embudo Büchner (Anexo 7) y posteriormente el etanol se recuperó mediante un proceso de evaporación en rotavapor (Büchi R-3, proporcionado por el Laboratorio de Química Fina del Polo Tecnológico de Pando), obteniendo así el extracto final (Anexo 8).

5.2.3- Extracción supercrítica

Las extracciones mediante scCO₂ se llevaron a cabo utilizando el sistema Waters Bio-Botanical Extraction System (BBES) (Anexo 9,10,11). Se comenzó con la variedad BB y se establecieron como variables principales la temperatura y la presión, manteniéndose constante la cantidad de material vegetal (1300 g aproximadamente) y el flujo (180 g/min). Las extracciones realizadas se identificaron como BBE1, BBE2, BBE4, BBE5, BBE6, BBE7 y BBE7BIS. Al material vegetal utilizado en la extracción BBE7 se le realizaron 2 extracciones, una primera con condiciones de temperatura y presión menores respecto a las demás extracciones, buscando extraer mayoritariamente terpenos. Al material vegetal remanente de esa extracción se le realizó una segunda extracción en las mismas condiciones que BBE1.

Las condiciones específicas para cada extracción de la variedad BB fueron las siguientes:

BBE1: Rampa de presión descendente en 10 bar, comenzando en 350 bar y finalizando en 300 bar, en 6 etapas de 20 min. a 50°C.

BBE2: 120 min. a 380 bar y 50°C.

BBE4: 120 min. a 350 bar y 60°C.

BBE5: 120 min. a 300 bar y 50°C.

BBE6: 120 min. a 380 bar y 60°C.

BBE7: Dos etapas: la primera a 60 min., 35°C y 100 bar y la segunda a 60 min., 40°C y 140 bar.

BBE7 BIS: Luego de la extracción BBE7, al mismo material vegetal se le realizó otra extracción en las siguientes condiciones: Rampa de presión descendente en 10 bar, comenzando en 350 bar y finalizando en 300 bar, en 6 etapas de 20 min. a 50°C.

En función de los resultados obtenidos con la variedad BB, se realizaron tres extracciones SFE con la variedad P3:

-en dos de ellas se reprodujeron condiciones previamente aplicadas en la variedad BB.

-en una extracción adicional se exploró la recolección de extractos en tres ciclones por separado bajo diferentes parámetros de temperatura y presión en cada uno de ellos

Por lo tanto, se decidió repetir las condiciones de la extracción BBE1 en la extracción P3E1 y las de la extracción BBE6 en la P3E6. Además, se realizó una extracción adicional P3E1a en las mismas condiciones que P3E1, pero dado que el equipo tiene 3 ciclones de recolección en diferentes condiciones Ciclón 1 (50°C, 100bar), Ciclón 2 (45°, 70bar), Ciclón 3 (40°, 55bar) se recolectaron los extractos por separado (Tabla 8).

Tabla 8: Condiciones de extracción variedad P3.

| Extracción | Descripción |
|------------|--|
| P3E1 | Rampa de presión descendente en 10 bar, comenzando en 350 bar y finalizando en 300 bar, en 6 etapas de 20 min. a 50°C. |
| P3E1a | Rampa de presión descendente en 10 bar, comenzando en 350 bar y finalizando en 300 bar, en 6 etapas de 20 min. a 50°C. |
| P3E6 | 120 min. a 380 bar y 60°C. |

Una vez obtenido cada extracto, se procedió a su invernización. Una vez obtenido el extracto crudo, se procede a su homogenización con etanol al 95% en una proporción de aproximadamente 1 litro de etanol por cada 300 gramos de extracto, asegurando una mezcla uniforme. Esta solución se almacena en un freezer a -30 °C durante al menos 40 horas, lo que permite la precipitación de ceras y otros compuestos indeseables.

Transcurrido este tiempo, se realiza un primer filtrado utilizando un embudo Büchner con filtro de papel. Durante la filtración, las ceras retenidas en el filtro se lavan con 1 litro adicional de etanol al 95%. La solución filtrada se vuelve a almacenar en el freezer a -30 °C por al menos otras 40 horas, permitiendo una segunda etapa de precipitación de impurezas residuales.

Después de este segundo período de enfriamiento, se lleva a cabo un segundo filtrado bajo las mismas condiciones que el anterior. En esta ocasión, el lavado de las ceras retenidas se realiza con 0,5 litros de etanol al 95%. Finalmente, la solución filtrada se somete a un proceso de rotavaporado a 55 °C y 0,9 bar de presión, eliminando completamente el etanol hasta que no se observe más condensación del solvente.

WEV-1010) (Anexo 12). Finalmente, los extractos se envasaron en frascos ámbar tipo Schott, los cuales se almacenan en freezer, hasta el posterior análisis de los mismos.

5.2.4- Extracciones con líquidos presurizados

Para PLE se realizó un diseño experimental, evaluándose tres temperaturas (80°C, 110 °C, 140 °C) y tres composiciones de solvente (etanol-agua: 100:0, 60:40, 20:80). Se llevaron a cabo un total de nueve extracciones para cada variedad, más dos repeticiones del punto central para asegurar la precisión de los resultados (Tabla 9).

El equipo utilizado fue PD-Basic (Anexo 13). En cuanto al material vegetal para esta metodología también se iniciaron las extracciones con la variedad BB. Cada extracción se realizó bajo condiciones controladas, manteniendo constantes variables como el tamaño de la muestra (3 g), el tiempo de extracción (10 minutos de extracción estática y 20 minutos de extracción dinámica) y la presión (100 bar). Los extractos obtenidos se almacenaron en un congelador a -30°C durante al menos 40 horas.

Posteriormente, se evaporó el solvente de extracción utilizando un rotavapor. Dado que las muestras con un mayor porcentaje de agua presentaron dificultades para obtener un extracto seco, se decidió agregar 300mL de metanol a todas las muestras, incluidas las que contenían 100% etanol y se rotavaporaron hasta alcanzar la sequedad, obteniendo así un extracto crudo. A continuación, se disolvió el extracto en metanol y se almacenó nuevamente en el congelador durante al menos 40 horas. Luego de este tiempo, se filtró utilizando un embudo Büchner y se realizó una nueva rotavaporación para obtener el extracto final purificado.

Debido a las complicaciones observadas en el tratamiento de muestras, para la variedad P3 se adoptó un enfoque ligeramente diferente tras la extracción. En este caso, después del almacenamiento en freezer durante al menos 40 horas, se añadió 300mL de metanol y la mezcla se filtró dos veces utilizando un embudo Büchner con un filtro de 0,45 micras. Posteriormente, se rotavaporó hasta obtener el extracto final.

Finalmente, los datos conseguidos de los extractos obtenidos PLE fueron analizados utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM) para identificar las condiciones óptimas que maximizaran tanto el rendimiento como la extracción de cannabinoides.

Tabla 9: Condiciones de extracción por PLE. Variación de la temperatura (T) y la proporción de solventes (mezcla EtOH/H₂O).

| Muestra | T (°C) | Solvente (mezcla EtOH/H ₂ O) |
|---------|--------|--|
| EX1 | 80 | 100/0 |
| EX2 | 110 | 100/0 |
| EX3 | 140 | 100/0 |
| EX4 | 80 | 60/40 |
| EX5 | 110 | 60/40 |
| EX5rep1 | 110 | 60/40 |
| EX5rep2 | 110 | 60/40 |
| EX6 | 140 | 60/40 |
| EX7 | 80 | 20/80 |
| EX8 | 110 | 20/80 |
| EX9 | 140 | 20/80 |

5.2.5-Análisis por GC-MS

Como se mencionó anteriormente, para el lote BBE7 se realizaron dos extracciones al mismo material vegetal. La primera extracción generó un total de cinco muestras. Tres de estas muestras fueron extractos supercríticos obtenidos en cada uno de los tres ciclones de recolección, mientras que las dos muestras restantes se obtuvieron mediante trampas de volátiles, en las que el CO₂ fue burbujeado en hexano. Una de estas trampas estaba conectada a la salida del CO₂ al ambiente, mientras que la otra se instaló en cada uno de los ciclones al momento de recolectar el extracto (Figura 6 y 7). Estos extractos fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) para identificar y cuantificar la presencia de compuestos volátiles. También, se analizaron los extractos obtenidos en BBE1, BBE6, P3E1 y P3E6. Dichos análisis se realizaron con la colaboración de Dr.QF.Eduardo Dellacasa y Lic.Quim. Juliana Viera, a quienes agradezco por su valiosa contribución en esta etapa del trabajo. Su tiempo, dedicación y sugerencias fueron fundamentales, no solo aportando su conocimiento, sino también su disposición y compromiso.

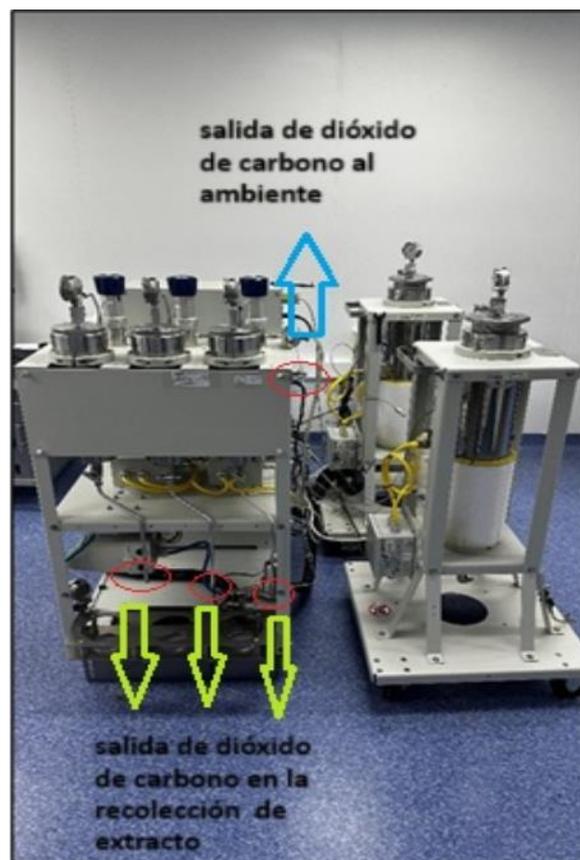


Figura 6: Puntos de conexión de trampa de hexano en las salidas de CO₂.



Figura 7: Trampas de hexano conectadas en las salidas de CO₂. 1-Salida de CO₂ en la recolección del extracto, 2-recolección de extracto, 3-Salida de CO₂ al ambiente.

Las condiciones analíticas para el análisis de volátiles en hexano fueron establecidas en un equipo GC-MS 2010 (Shimadzu, Tokyo) utilizando una columna de fase estacionaria 5%-fenil-metilpolisiloxano (30 m x 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de film). El programa de temperatura fue: 60 °C (6 min), de 60 a 180 °C a 2 °C/ min, 180 °C (2 min), de 180 a 300 °C a 20 °C/min, 300 °C (6 min), con un tiempo total de corrida de 80 minutos. La inyección se realizó en modo split-splitless, con una relación de split

de 1:40, y una temperatura del inyector de 300 °C. Tanto la interfase como la fuente de ionización se mantuvieron a 300 °C, con Helio como fase móvil (1 mL/min). El análisis de masas cubrió el rango de 35 a 500 u.m.a y se utilizó un volumen de inyección de 1 µL. Para el análisis de volátiles en los extractos supercríticos se utilizó la técnica de GC-MS en espacio de cabeza (HS-SPME-GC-MS) utilizando un inyector automático AOAC-6000 Shimadzu, de acuerdo con la metodología expuesta por Garde-Cerdán y colaboradores (48) y una fibra SPME (1 cm), DVB/Carbon-WR/PDMS, (50/30 µm) (Agilent Technologies J&W, Santa Clara, CA, EE. UU.). Para realizar la cuantificación de volátiles de las diferentes muestras, se añadió a cada una de ellas una solución de estándar interno (timol a 18,3 mg/mL en metanol) como se detalla en la (Tabla 10). Las muestras se acondicionaron durante 15 min a 60 °C, manteniendo una agitación constante de 250 rpm. Posteriormente, se realizó la extracción a la misma temperatura y agitación durante 105 min. Una vez concluido el proceso de extracción, la fibra SPME fue desorbida en el puerto de inyección del GC a 250 °C durante 2 min (50).

Tabla 10: Preparación de muestras de extractos para la determinación de volátiles.

| Extracción | Muestra(mg) | Estándar de timol (µL) | Etanol absoluto (µL) | Volumen total (µL) |
|-------------|-------------|------------------------|----------------------|--------------------|
| BBE1 | 28,0 | 80 | 3720 | 3800 |
| BBE6 | 30,6 | 200 | 9800 | 10000 |
| P3E1 | 36,0 | 50 | 1950 | 2000 |
| P3E6 | 41,5 | 50 | 1950 | 2000 |
| BBE7Ciclon1 | 34,9 | 50 | 2750 | 2800 |
| BBE7Ciclon2 | 25,8 | 50 | 3950 | 4000 |
| BBE7Ciclon3 | 30,4 | 100 | 5900 | 6000 |

Los análisis GC-MS se realizaron utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-20 Plus acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu QP 2020 con una columna capilar con fase estacionaria DW-Wax 30 (Agilent Technologies J&W, Santa Clara, CA, EE. UU.), recubierta con polientilenglicol 20M. Las condiciones experimentales se realizaron según Dellacassa y colaboradores (49): temperatura de la columna, 40 °C (8 min), 40 a 180 °C a 3 °C/min, 180 a 220 °C a 5 °C/min, 220 a 235 °C a 20 °C/min; temperatura del inyector, 240 °C; temperatura del detector, 250 °C; modo de inyección: splitless (2 min); gas portador, Hidrógeno (30 kPa).

Los compuestos se identificaron mediante comparación de los patrones de fragmentación observados en los espectros de masas con los almacenados en bases de datos (FFNSC 3.0) (50).

5.3- Análisis estadísticos

En este trabajo de investigación se utilizaron dos herramientas para el análisis de datos: R Studio (GNU Affero General Public License) y Minitab (Minitab Inc.).

R Studio se utilizó para llevar a cabo el análisis de superficies de respuesta (RSM). Este análisis ayudó a encontrar las mejores combinaciones de variables para maximizar el

rendimiento de los extractos de *C. Sativa*. Esta herramienta permite visualizar estas relaciones mediante gráficas 3D, facilitando la identificación de las condiciones óptimas para cada método de extracción. Aprovecho este apartado para expresar mi agradecimiento a Ing.Alim. Cecilia Dauber, quien inicialmente me instruyó en el manejo del equipo de extracción por líquidos a presión (PLE) y además me brindó su apoyo en el uso de R Studio para la elaboración de las gráficas correspondientes al análisis de superficies de respuesta. Minitab se empleó para llevar a cabo análisis estadísticos orientados a posibles diferencias entre las extracciones realizadas por duplicado en el caso de la maceración etanólica (Anexo 14). Si bien la aplicación de pruebas estadísticas con tan solo dos repeticiones por grupo limita la solidez de las conclusiones, los resultados obtenidos fueron interpretados bajo el umbral convencional de significancia estadística ($\alpha=0,05$). El test de Grubbs se utilizó para evaluar la presencia de valores atípicos en las repeticiones correspondientes al punto central del diseño experimental en la extracción con líquidos presurizados (Anexos 15 y 16).

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1- Humedad de las flores previo a la extracción

Antes de cada extracción se llevó a cabo un análisis de humedad en las flores de *C. sativa* para asegurar que cumplieran con los requisitos del proceso. Según la Farmacopea Herbal Americana (51), el criterio establecido para la extracción fue que el contenido de humedad de las flores no excediera el 15%.

Todas las muestras analizadas cumplieron con la especificación de humedad ($\leq 15\%$), lo que permitió proceder con las extracciones sin complicaciones relacionadas con el exceso de agua en el material vegetal, los valores oscilaron entre 9,82% y 14,05%, lo que indica que las flores se encontraban en un rango adecuado para garantizar una extracción eficiente (Tabla 11 y 12).

Tabla 11: Determinación de humedad en flores de Cannabis sativa variedad BB antes de la extracción.

| Extracción | N° de planta | Peso muestra inicial | Peso muestra final | % Humedad | Promedio (%) |
|------------------|--------------|----------------------|--------------------|-----------|--------------|
| BBE1 | 265334 | 1,904 | 1,711 | 10,14 | 10,5 |
| | 265340 | 1,962 | 1,739 | 11,37 | |
| | 265347 | 2,052 | 1,824 | 11,11 | |
| | 265357 | 1,853 | 1,667 | 10,04 | |
| | 265360 | 1,884 | 1,699 | 9,82 | |
| | 265396 | 2,001 | 1,759 | 12,34 | |
| BBE2 | 265325 | 1,956 | 1,691 | 13,55 | 12,48 |
| | 265344 | 1,918 | 1,677 | 12,57 | |
| | 265346 | 1,838 | 1,609 | 12,46 | |
| | 265356 | 1,908 | 1,675 | 12,21 | |
| | 265358 | 1,812 | 1,602 | 11,59 | |
| | 265393 | 1,892 | 1,669 | 11,79 | |
| BBE4 | 265328 | 1,985 | 1,76 | 11,34 | 11,18 |
| | 265349 | 1,993 | 1,75 | 12,19 | |
| | 265354 | 2,025 | 1,814 | 10,42 | |
| | 265381 | 1,952 | 1,729 | 11,42 | |
| | 265398 | 1,95 | 1,745 | 10,51 | |
| | 265403 | 2,005 | 1,745 | 12,97 | |
| BBE5 | 265343 | 2,028 | 1,758 | 13,31 | 12,34 |
| | 265368 | 1,906 | 1,687 | 11,49 | |
| | 265376 | 1,974 | 1,733 | 12,21 | |
| | 265394 | 1,958 | 1,7 | 13,18 | |
| | 265405 | 1,861 | 1,647 | 11,5 | |
| | 265406 | 1,812 | 1,597 | 11,87 | |
| BBE6 | 265377 | 1,938 | 1,677 | 13,47 | 12,91 |
| | 265386 | 2,003 | 1,751 | 12,58 | |
| | 265387 | 1,976 | 1,725 | 12,7 | |
| | 265388 | 1,846 | 1,62 | 13,22 | |
| | 265404 | 1,999 | 1,732 | 12,59 | |
| | 265408 | 2,096 | 1,83 | 12,69 | |
| Maceración y PLE | 265329 | 1,948 | 1,75 | 10,16 | 10,33 |
| | 265342 | 1,997 | 1,8 | 9,86 | |
| | 265353 | 1,831 | 1,629 | 11,03 | |
| | 265363 | 2,04 | 1,826 | 10,49 | |
| | 265379 | 1,944 | 1,747 | 10,13 | |
| | 265402 | 1,898 | 1,679 | 11,54 | |
| BBE7 | 265352 | 1,876 | 1,639 | 12,63 | 12,87 |
| | 265369 | 2,04 | 1,78 | 12,75 | |
| | 265374 | 1,956 | 1,699 | 13,14 | |
| | 265382 | 1,845 | 1,602 | 13,17 | |

| | | | | | |
|--|--------|-------|-------|-------|--|
| | 265397 | 1,897 | 1,657 | 12,65 | |
| | 265401 | 2,011 | 1,757 | 12,63 | |

Tabla 12: Determinación de humedad en flores de Cannabis sativa variedad P3 antes de la extracción.

| Extraccion | N° de planta | Peso muestra inicial | Peso muestra final | % Humedad | Promedio (%) |
|------------|--------------|----------------------|--------------------|-----------|--------------|
| P3E1 | 127157 | 2,03 | 1,796 | 11,53 | 11,93 |
| | 127158 | 1,919 | 1,685 | 12,19 | |
| | 127172 (2/2) | 1,901 | 1,663 | 12,52 | |
| | 127197 | 2,056 | 1,824 | 11,28 | |
| | 127229 | 1,919 | 1,686 | 12,14 | |
| P3E1a | 127172 (1/2) | 1,986 | 1,707 | 14,05 | 12,89 |
| | 127184 | 1,988 | 1,744 | 12,27 | |
| | 127194 | 1,837 | 1,592 | 13,34 | |
| | 127204 | 1,937 | 1,695 | 12,49 | |
| | 127205 | 1,983 | 1,739 | 12,3 | |
| P3E6 | 127186 | 2,091 | 1,841 | 11,96 | 12,55 |
| | 127195 | 1,803 | 1,557 | 13,64 | |
| | 127198 | 1,827 | 1,6 | 12,42 | |
| | 127199 | 1,923 | 1,683 | 12,48 | |
| | 127207 | 1,966 | 1,725 | 12,26 | |
| Maceración | 127201 | 1,92 | 1,664 | 13,33 | 12,88 |
| | 127203(1/2) | 1,923 | 1,663 | 13,52 | |
| | 127203(2/2) | 1,923 | 1,669 | 13,21 | |
| | 127207 | 1,843 | 1,614 | 12,43 | |
| | 127208 (1/2) | 1,859 | 1,622 | 12,75 | |
| | 127208 (2/2) | 1,859 | 1,635 | 12,05 | |
| PLE | 127220 | 1,823 | 1,606 | 11,9 | 13,33 |
| | 127221 | 1,911 | 1,646 | 13,87 | |
| | 127223 (1/2) | 1,859 | 1,608 | 13,5 | |
| | 127223 (2/2) | 1,802 | 1,554 | 13,76 | |
| | 127232 | 1,873 | 1,616 | 13,72 | |
| | 127233 | 1,856 | 1,61 | 13,25 | |

6.2- Análisis de flores previo a la extracción

Antes de realizar las extracciones, se analizó la composición de cannabinoides en las flores de *Cannabis sativa* con el objetivo de obtener una referencia inicial del perfil químico de partida. Este análisis no tuvo como finalidad evaluar la eficiencia de extracción, ni se estableció una comparación directa entre los contenidos de cannabinoides en las flores y en los extractos. Sin embargo, contar con estos datos preliminares permite contextualizar los resultados y justificar el uso de las concentraciones en los extractos como valores relativos válidos para comparar entre condiciones. Por lo tanto se asume que ante diferencias en los contenidos obtenidos en los extractos, dichas diferencias reflejan efectivamente una mayor o menor presencia de los compuestos, sin necesidad de referenciar a los valores iniciales en la materia vegetal. Tanto los resultados de flores (Tablas 13 a 18). como de extractos se expresaron en porcentaje masa a masa, lo que permitió visualizar de forma cualitativa las condiciones que favorecen una mayor concentración de cannabinoides en el extracto final. Para futuras investigaciones, sería recomendable realizar un número de extracciones estadísticamente representativo que permita extraer conclusiones más acertadas.

El contenido total de CBD y THC en una muestra de cannabis se basa en la conversión de sus formas ácidas, CBDA y THCA, en sus formas activas, CBD y THC, a través del proceso de descarboxilación. Dado que las formas ácidas tienen un peso molecular mayor que sus correspondientes formas neutras, es necesario aplicar un factor de corrección al calcular el contenido total de los cannabinoides.

Para determinar el CBD total se suma la cantidad de CBD ya presente en la muestra con la cantidad de CBDA multiplicada por un factor de 0,877. Lo mismo ocurre con el THC total, que se obtiene sumando el THC presente más el THCA multiplicado por 0,877. Este factor surge de la relación entre los pesos moleculares de las formas ácidas y neutras de los cannabinoides, ya que el THCA tiene un peso molecular de 358.48 g/mol y el THC de 314.47 g/mol, lo que da como resultado una proporción de aproximadamente 0,877. Esta misma relación se aplica al CBDA y al CBD.

Tabla 13: Análisis de cannabinoides por HPLC-DAD en flores previo a las maceraciones-variedad BB.

| Concentración de cannabinoides en flores variedad BB | | | |
|--|---------|----------|--------------|
| Extracción | THC (%) | THCA (%) | THCtotal (%) |
| BB-Maceración1 | 0,41 | 15,67 | 14,15 |
| BB-Maceración2 | 0,46 | 18,05 | 16,29 |

Los resultados obtenidos corresponden al análisis de cannabinoides por HPLC-DAD en flores de la variedad BB antes de ser sometidas a los procesos de maceración. Los valores reflejan la composición inicial de THC, THCA y THCtotal en la materia prima, proporcionando un punto de referencia previo a la extracción.

El promedio de las concentraciones determinadas fue de $0,435 \pm 0,035$ % para THC, $16,86 \pm 1,68$ % para THCA y $15,22 \pm 1,51$ % para THCtotal. La baja variabilidad en los

datos podría indicar una composición homogénea en las muestras analizadas dentro de esta variedad.

Tabla 14: Análisis de cannabinoides por HPLC-DAD en flores previo a las extracciones por SFE-variedad BB.

| Concentraciones de cannabinoides en flores variedad BB | | | |
|---|---------|----------|-------------|
| Extracción | THC (%) | THCA (%) | THCtotal(%) |
| BBE1 | 0,39 | 18,07 | 16,24 |
| BBE2 | 0,43 | 18,54 | 16,69 |
| BBE4 | 0,45 | 19,40 | 17,46 |
| BBE5 | 0,43 | 18,72 | 16,85 |
| BBE6 | 0,53 | 18,27 | 16,56 |
| BBE7 | 0,40 | 17,62 | 15,86 |

En este caso, se analizaron distintas muestras de la variedad BB antes de ser sometidas a extracción con CO₂ supercrítico.

El promedio de las concentraciones determinadas fue de $0,44 \pm 0,05$ % para THC, $18,37 \pm 0,65$ % para THCA y $16,61 \pm 0,58$ % para THCtotal. Nuevamente, la baja variabilidad en las concentraciones de THCA y THCtotal sugiere una composición homogénea en las muestras analizadas.

Tabla 15: Análisis de cannabinoides por HPLC-DAD en flores previo a las extracciones por PLE-variedad BB.

| Concentración de cannabinoides en flores variedad BB | | | |
|---|---------|----------|--------------|
| Extracción | THC (%) | THCA (%) | THCtotal (%) |
| BBEX1 | 0,38 | 18,12 | 16,27 |
| BBEX2 | 0,38 | 18,12 | 16,27 |
| BBEX3 | 0,38 | 18,12 | 16,27 |
| BBEX4 | 0,38 | 18,99 | 17,03 |
| BBEX5 | 0,38 | 18,99 | 17,03 |
| BBEX5rep1 | 0,38 | 18,99 | 17,03 |
| BBEX5rep2 | 0,38 | 18,99 | 17,03 |
| BBEX6 | 0,38 | 18,99 | 17,03 |
| BBEX7 | 0,38 | 19,72 | 17,68 |
| BBEX8 | 0,38 | 19,72 | 17,68 |
| BBEX9 | 0,38 | 19,72 | 17,68 |

Los resultados aquí presentados corresponden al análisis de flores de la variedad BB utilizadas en PLE.

Es importante señalar que los datos que se repiten no necesariamente reflejan la reproducibilidad del método analítico, sino que corresponden a muestras provenientes del mismo pool de material vegetal. BBEX1, BBEX2 y BBEX3 pertenecen a un mismo lote

homogéneo; del mismo modo, BBEX4, BBEX5, BBEX5rep1, BBEX5rep2 y BBEX6 derivan de un segundo pool y BBEX7, BBEX8 y BBEX9 constituyen un tercer grupo homogéneo, todos generados a partir del mismo material vegetal.

En consecuencia, los cálculos de concentración promedio y su variabilidad se realizaron considerando únicamente un valor representativo por pool. Los valores promedio fueron de $0,38 \pm 0,00$ % para THC, $18,94 \pm 0,80$ % para THCA y $16,99 \pm 0,71$ % para THCtotal.

Tabla 16: Análisis de cannabinoides por HPLC-DAD en flores previo a las maceraciones-variedad P3.

| Concentración de cannabinoides en flores variedad P3 | | | | | | |
|--|----------|---------|--------------|---------|----------|-------------|
| Extracción | CBDA (%) | CBD (%) | CBDtotal (%) | THC (%) | THCA (%) | THCtotal(%) |
| P3-Maceración1 | 10,67 | 0,72 | 10,07 | 0,74 | 5,46 | 5,53 |
| P3-Maceración2 | 10,59 | 0,72 | 10,01 | 0,70 | 5,31 | 5,36 |

Las flores de la variedad P3 analizadas antes de la maceración mostraron un predominio de CBDA, con una media de $10,63 \pm 0,06$ %, mientras que el CBD se mantuvo constante en $0,72$ %, y CBDtotal $10,04 \pm 0,04$ %. En cuanto a los compuestos psicoactivos, se detectaron concentraciones de THCA ($5,39 \pm 0,11$ %) y de THC ($0,72 \pm 0,03$ %), resultando en un THCtotal promedio de $5,53 \pm 0,10$ %. Estos resultados reflejan una composición estable entre ambas muestras, lo cual es fundamental para interpretar los resultados de los extractos obtenidos posteriormente.

Tabla 17: Análisis de cannabinoides por HPLC-DAD en flores previo a las extracciones por SFE-variedad P3.

| Concentración de cannabinoides en flores variedad P3 | | | | | | |
|--|----------|---------|-------------|---------|----------|-------------|
| Extracción | CBDA (%) | CBD (%) | CBDtotal(%) | THC (%) | THCA (%) | THCtotal(%) |
| P3E1 | 10,35 | 0,71 | 9,79 | 0,75 | 5,18 | 5,29 |
| P3E1aCiclon1 | 10,71 | 0,69 | 10,09 | 0,70 | 5,61 | 5,62 |
| P3E1aCiclon2 | 10,71 | 0,69 | 10,09 | 0,70 | 5,61 | 5,62 |
| P3E1aCiclon3 | 10,71 | 0,69 | 10,09 | 0,70 | 5,61 | 5,62 |
| P3E6 | 10,40 | 0,68 | 9,80 | 0,69 | 5,17 | 5,23 |

Las muestras de flores de P3 destinadas a extracción con CO₂ supercrítico mostraron una distribución estable de cannabinoides, destacándose el CBDA con $10,58 \pm 0,17$ % como el compuesto más abundante. El CBDtotal calculado fue de $9,97 \pm 0,14$ %, mientras que los niveles de THC y THCA fueron de $0,71 \pm 0,03$ % y $5,44 \pm 0,23$ %.

Tabla 18: Análisis de cannabinoides por HPLC-DAD en flores previo a las extracciones por PLE-variedad P3.

| Concentración de cannabinoides en flores variedad P3 | | | | | | |
|--|----------|---------|-------------|---------|----------|-------------|
| Extracción | CBDA (%) | CBD (%) | CBDtotal(%) | THC (%) | THCA (%) | THCtotal(%) |
| P3EX1 | 9,79 | 0,96 | 9,55 | 0,85 | 4,96 | 5,20 |
| P3EX2 | 9,79 | 0,96 | 9,55 | 0,85 | 4,96 | 5,20 |
| P3EX3 | 9,79 | 0,96 | 9,55 | 0,85 | 4,96 | 5,20 |
| P3EX4 | 9,99 | 0,76 | 9,53 | 0,72 | 5,03 | 5,13 |
| P3EX5 | 9,99 | 0,76 | 9,53 | 0,72 | 5,03 | 5,13 |
| P3EX5rep1 | 9,99 | 0,76 | 9,53 | 0,72 | 5,03 | 5,13 |
| P3EX5rep2 | 9,99 | 0,76 | 9,53 | 0,72 | 5,03 | 5,13 |
| P3EX6 | 9,99 | 0,76 | 9,53 | 0,72 | 5,03 | 5,13 |
| P3EX7 | 11,00 | 0,78 | 10,43 | 0,78 | 2,28 | 2,77 |
| P3EX8 | 11,00 | 0,78 | 10,43 | 0,78 | 2,28 | 2,77 |
| P3EX9 | 11,00 | 0,78 | 10,43 | 0,78 | 2,28 | 2,77 |

De la misma manera que los casos anteriores antes de realizar las extracciones por PLE, se analizó el contenido de cannabinoides en las flores de P3.

Es importante destacar que en este caso se procedió de la misma manera que para la variedad BB también en la metodología PLE por lo tanto las repeticiones idénticas observadas no son indicativas de la reproducibilidad del método analítico, sino que corresponden a muestras provenientes de un mismo pool de material vegetal. En particular, P3EX1, P3EX2 y P3EX3 pertenecen a un mismo lote homogéneo; P3EX4, P3EX5, P3EX5rep1, P3EX5rep2 y P3EX6 corresponden a un segundo grupo y P3EX7, P3EX8 y P3EX9 representan un tercer grupo también derivado del mismo material vegetal que el primero.

Para el cálculo de los valores promedio y su desviación estándar, se consideró un valor representativo por pool. Las concentraciones medias resultantes fueron: $10,26 \pm 0,57$ % para CBDA, $0,83 \pm 0,10$ % para CBD, $9,84 \pm 0,52$ % para CBDtotal, $0,78 \pm 0,06$ % para THC, $4,09 \pm 1,58$ % para THCA y $4,47 \pm 1,31$ % para THCtotal.

Se observó una mayor variabilidad en las concentraciones de THCA y THCtotal en comparación con los demás compuestos, lo que podría estar asociado a diferencias en la maduración de las flores o en su manejo previo al análisis. En particular, las muestras del tercer grupo (P3EX7 a P3EX9) presentaron un aumento en CBDA (11,00 %) y una disminución en THCA (2,28 %), en contraste con los valores observados en los primeros dos grupos.

6.3- Rendimientos maceración etanólica

La metodología de maceración etanólica se utilizó como base para comparar con los otros métodos de extracción y como comparativo con otros trabajos realizados por otros investigadores.

Para la variedad BB, los rendimientos de extracción obtenidos por maceración etanólica se observan en la Figura 8, donde el rendimiento promedio de estas extracciones para fue de $(18,63 \pm 0,47) \%$.

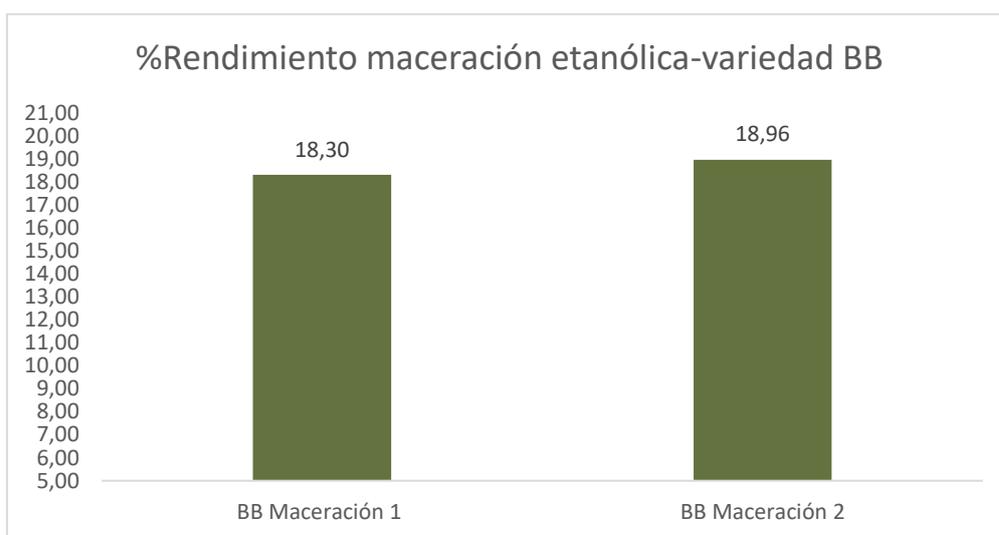


Figura 8. Rendimiento porcentual de la variedad BB obtenido por maceración etanólica.

Para la variedad P3, los rendimientos obtenidos por maceración etanólica se presentan en la Figura 9:

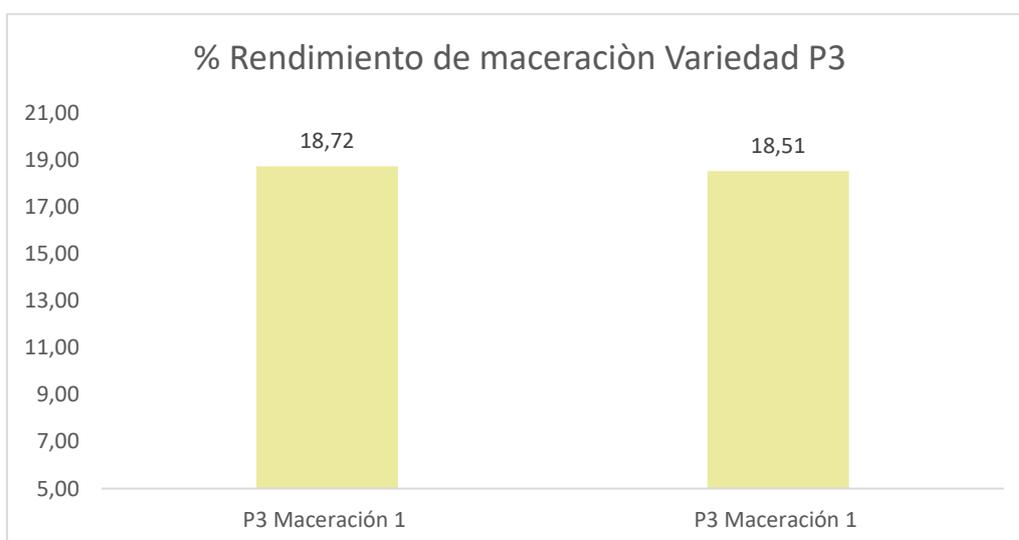


Figura 9. Rendimiento porcentual de la variedad P3 obtenido por maceración etanólica.

El rendimiento promedio de estas extracciones para la variedad P3 fue de $(18,62 \pm 0,15)$ %.

El análisis estadístico de las maceraciones para la variedad BB y P3 determinó estadístico t: 0.04, Valor p: 0.97(Anexo 14), no hay una diferencia estadísticamente significativa en los rendimientos entre las variedades BB y P3, por lo tanto, los rendimientos de las extracciones para ambas variedades son estadísticamente similares.

Estos resultados de rendimiento muestran resultados intermedios en comparación con otras trabajos consultados, por ejemplo en el de Fernández y colaboradores (36) donde el rendimiento obtenido en la maceración etanólica fue notoriamente menor a los rendimientos obtenidos en el presente trabajo donde para el quimiotipo A (rico en THC) fue del 6.8%, y para el quimiotipo B (rico en CBD) fue del 5.2%, sin embargo en otro trabajo donde se aplicó también maceración etanólica realizado por Moreno-Sanz y colaboradores (52) se obtuvo un rango de resultados que variaron desde los 8,2% hasta los 28%, lo cual da un indicio de que el rendimiento dependen de la variedad utilizada.

6.4- Rendimientos extracciones por SFE

6.4.1-Rendimientos extracciones por SFE variedad BB

Los resultados obtenidos para la metodología SFE de la variedad BB se observan en la Figura 10:

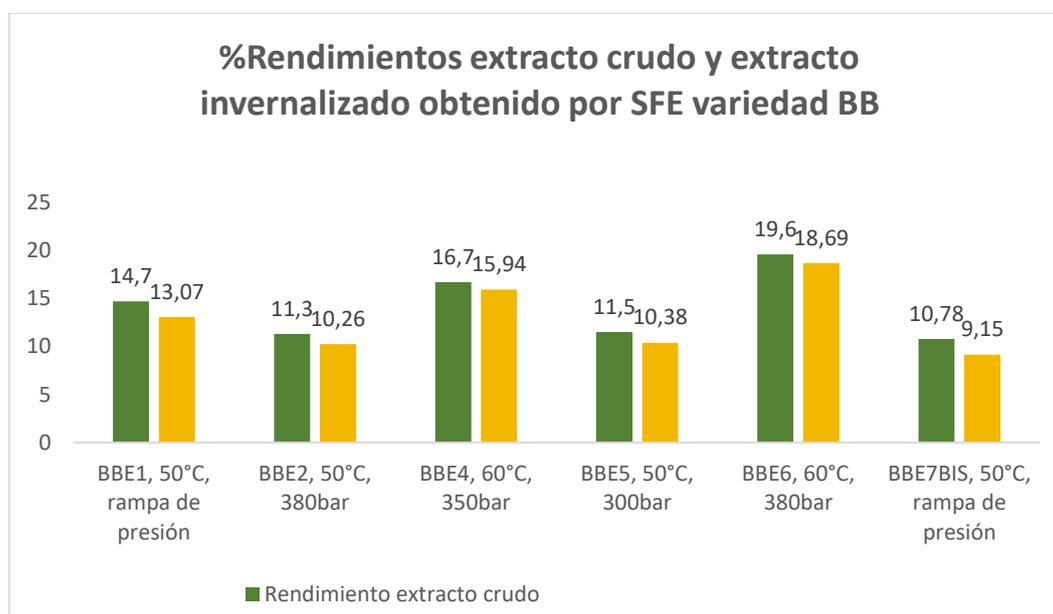


Figura 10: Rendimiento porcentual de extracto crudo y extracto invernalizado de la variedad BB obtenido por SFE.

Al analizar los resultados de las extracciones por metodología SFE en la variedad BB, se observan algunas tendencias interesantes. La variabilidad introducida por la rampa de

presión (BBE1) mostró un rendimiento de extracto invernalizado del 13,07% (Figura 10), ubicándose en un punto intermedio en comparación con otras condiciones de presión fija.

El aumento de la temperatura a 60°C parece mejorar el rendimiento del extracto en comparación con una temperatura de 50°C. Este resultado sugiere que explorar temperaturas aún más altas podría ser beneficioso, siempre y cuando se considere cuidadosamente el riesgo potencial de comprometer la estabilidad y la calidad del extracto.

La combinación de 60°C con una presión de 380 bar produjo el mayor rendimiento obtenido con un valor de 18,69%, (Figura 10). Esta combinación entre los valores de presión y de temperatura indica que podrían existir otras combinaciones de estas variables de la extracción que maximicen aún más el rendimiento.

Asimismo, a la temperatura de 60°C permitió obtener el rendimiento promedio de extracto invernalizado más alto (17,32%) en comparación con 50°C (11,24%). Cuando la presión en la extracción fue de 380 bar produjo un rendimiento promedio de 14,48%, este resultado promedio es menor que el valor obtenido a 350 bar y 60°C, por lo tanto, se evidencia que el rendimiento estaría más influenciado por la temperatura. Las extracciones a 380 bar se realizaron tanto a 50°C como a 60°C, mientras que la extracción a 350 bar se realizó a 60°C, lo que podría explicar la diferencia. Además, con la condición de rampa de presión (350-300 bar) se obtuvo un rendimiento de 13,07% (Figura 10), que es mayor en comparación con el rendimiento más bajo de 10,38% obtenido a una presión fija de 300 bar, (Figura 10). Estos resultados destacan la complejidad de la interacción entre temperatura y presión.

Al comparar los resultados obtenidos mediante la metodología SFE y maceración etanólica en la variedad BB, se encontró que la maceración etanólica demostró ser un proceso eficiente en términos de rendimiento, alcanzando un promedio de extracto invernalizado de 18,63% (Figura 8). Sin embargo, se debe notar que la mejor condición de SFE alcanzada a 60°C y 380 bar produjo un rendimiento de 18,69%, (Figura 10), similar al rendimiento promedio de la maceración etanólica

Esto sugiere que aunque en general la maceración etanólica ofrece un mayor rendimiento que algunas de las extracciones estudiadas para SFE, también en ciertas condiciones SFE se puede igualar los valores de rendimiento obtenidos.

Al comparar los rendimientos de los extractos crudos e invernalizados obtenidos por SFE en los distintos lotes de la variedad BB (Figura 10), los resultados para el lote BBE7BIS con condiciones de extracción idénticas a BBE1 fueron, rendimiento crudo: 10,78%, invernalizado: 9,15%.

El bajo rendimiento obtenido en el lote BBE7BIS en comparación con los demás lotes de la variedad BB (Figura 10) se debe en gran medida al hecho de que el material vegetal ya había sido sometido a una extracción previa bajo condiciones más suaves de presión y temperatura (BBE7ciclón 1, BBE7ciclón 2, BBE7ciclón 3) (ver 5.2.3). Esta extracción inicial, aunque no se analiza su rendimiento, pero si su composición de volátiles en la sección 6.9.2, tuvo un impacto evidente al haber removido previamente parte de los compuestos solubles en CO₂. Al aplicar la segunda extracción bajo las mismas

condiciones que el lote BBE1, es previsible que el rendimiento sea menor, ya que parte del material ya había sido retirado en la primera extracción.

6.4.2-Rendimientos de las extracciones por SFE para la variedad P3

Es importante tener en cuenta que para la variedad P3 no se pudo mantener la condición de flujo en 180 g/min ya que el equipo sufrió reparaciones previo a las extracciones y una vez resueltas se pudo mantener un flujo máximo de 150 g/min, lo cual es posible que explique la obtención de menores rendimientos respecto a la variedad BB.

Una vez más el mayor rendimiento para extracto invernalizado se obtuvo para la condición de extracción realizada a mayor temperatura (60 °C) y presión (380 bar) (15,00%) (Figura 11).

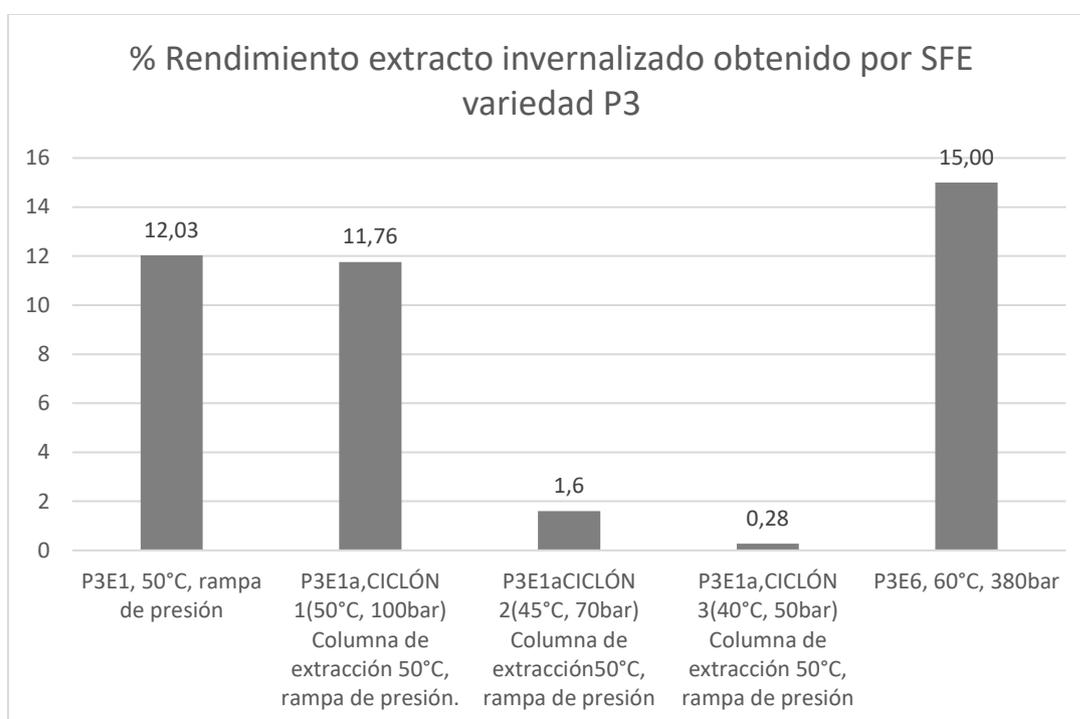


Figura 11: Rendimiento porcentual de la variedad P3 de extracto invernalizado obtenido por SFE.

Los resultados obtenidos en la extracción por la metodología de SFE de la variedad P3 permiten realizar varias observaciones, especialmente en comparación con la extracción SFE de la variedad BB.

Se observó que la rampa de presión P3E1 produjo un rendimiento de extracto invernalizado inferior al de la extracción P3E6 (60°C, 380 bar), un patrón similar al observado con la variedad BB. Este comportamiento sugiere que al igual que con BB la rampa de presión es menos eficiente en maximizar el rendimiento obtenido, especialmente en comparación con condiciones de extracción de mayor presión y temperatura.

Un mayor rendimiento al aumentar la temperatura de extracción se confirma nuevamente con la variedad P3, donde realizar la extracción a 60°C resultó en un mayor rendimiento de extracto invernizado en comparación con 50°C. Esto refuerza la idea de que temperaturas de extracción más elevadas pueden ser beneficiosas para el proceso, siempre y cuando se mantenga la estabilidad del extracto. Además, la combinación de 60°C y 380 bar que produjo un rendimiento del 15,00%, (Figura 11) sugiere una interacción favorable entre alta presión y temperatura, indicando una posible sinergia que maximiza la eficiencia del SFE bajo estas condiciones para incrementar los rendimientos obtenidos.

Cuando se comparan los resultados obtenidos por SFE en la variedad P3 con los obtenidos mediante maceración etanólica, se puede observar que la maceración etanólica mostró un rendimiento promedio relativo de extracto invernizado más alto (18,62%) (Figura 9) que la mejor condición lograda por SFE (60°C y 380 bar), que alcanzó un 15,00% (Figura 11). Es importante considerar que para la variedad P3 no se pudo trabajar a un flujo de 180 g/min tal como sucedió con la variedad BB, por lo tanto, la diferencia puede estar afectado por este motivo.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con la bibliografía consultada, como el estudio de Fernández y colaboradores (36), se observa una relación entre el incremento de la temperatura y la presión con el aumento en los rendimientos de extracción. Por ejemplo, en el trabajo de Fernández y colaboradores (36) el material vegetal definido como quimiotipo A se obtuvieron rendimientos del 9,3% y 17,2% para extracciones realizadas a 60°C y 70°C respectivamente, con presiones de 200 y 300 bar. Mientras que en el quimiotipo B, los rendimientos fueron de 10,3% a 50°C y 12,7% a 60°C bajo las mismas condiciones de presión (36).

Por otro lado, en nuestro trabajo, la variedad BB alcanzó su mayor rendimiento de extracto invernizado, un 18,69%, a 60°C y 380 bar (Figura 3). Sin embargo, a 50°C y presiones de extracción más bajas, los rendimientos disminuyeron, promediando un valor de 13,67% en varias condiciones de extracción. La variedad P3, por su parte, obtuvo su mayor rendimiento de extracto invernizado, un 15,00%, también a 60°C y 380 bar, (Figura 11), mientras que las condiciones con temperaturas y presiones de extracción más bajas produjeron rendimientos inferiores.

Tanto en los quimiotipos A y B estudiados por Fernández y colaboradores (36), como en las variedades BB y P3 de este trabajo, es evidente que la combinación de alta temperatura y presión resulta ser fundamental para maximizar los rendimientos de extracción.

6.5- Rendimientos extracciones por PLE

6.5.1- Rendimientos extracciones por PLE variedad BB

A medida que la temperatura de extracción se incrementó de 80 °C a 140 °C, se observó una leve tendencia a la disminución en el rendimiento del extracto final, independientemente del solvente utilizado (Figura 12). Al analizar los rendimientos de las extracciones del punto central y sus repeticiones realizadas bajo las mismas condiciones (36,69%, 36,90%, 33,64%) (Figura 12), se decidió utilizar el test de Grubbs para identificar si el valor 33,64% es un valor atípico relativo a los otros dos. Al realizar esta prueba estadística se obtuvo un valor p de 0,110 (Anexo 15), lo cual no rechaza la hipótesis nula. No hubo diferencias significativas entre los rendimientos obtenidos en el punto central los resultados son reproducibles, lo cual es una señal de que las condiciones estarían controladas y el método sería fiable.

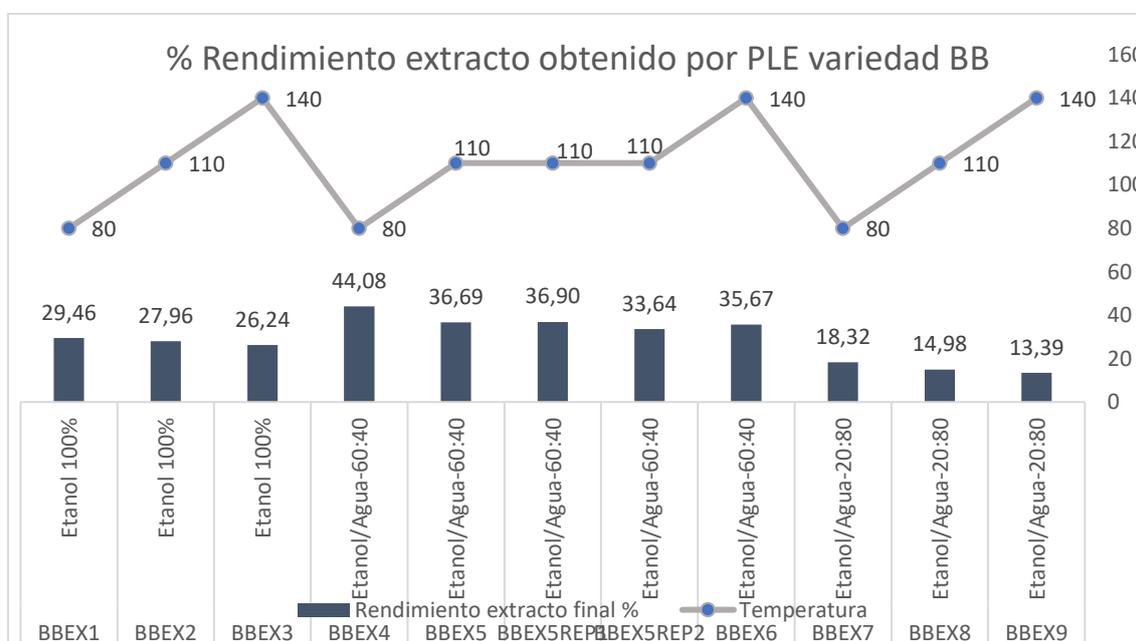


Figura 12: Rendimiento porcentual de la variedad BB de extracto invernalizado obtenido por PLE.

A partir de las representaciones gráficas tridimensionales y de contorno, se identificó una región óptima de extracción localizada en torno a una proporción de etanol/agua del 60:40 combinada con una temperatura cercana a los 80 °C. Esta condición específica ofreció el mayor rendimiento (44,08%) (Figura 12), superando tanto el valor obtenido con etanol puro como con mezclas más diluidas (por ejemplo, 20:80), lo que muestra la importancia de ajustar cuidadosamente la composición del solvente.

La gráfica tridimensional muestra una cúspide en esa zona óptima, mientras que el gráfico de contorno evidencia curvas cerradas alrededor de dicho punto, lo que indica que no se trata de una meseta amplia, sino de una condición bien definida y sensible a pequeñas variaciones. Este comportamiento sugiere que el rendimiento del proceso es particularmente dependiente de la proporción de solvente utilizada, siendo este el factor

con mayor impacto sobre la eficiencia extractiva dentro del rango estudiado. (zona intermedia de la Figuras 13 y 14).

Con respecto a la temperatura se observó una leve tendencia decreciente del rendimiento al aumentar este parámetro desde 80 °C hasta 140 °C, independientemente de la composición del solvente. Esta disminución podría deberse a fenómenos como la degradación térmica de compuestos sensibles. La gráfica de contorno refuerza esta observación, mostrando curvas prácticamente horizontales a lo largo del eje de temperatura, lo cual indica que su efecto es menor en comparación con el del solvente. Cabe destacar que no se evidencia una interacción sinérgica o antagonista fuerte entre los factores evaluados. La forma de la superficie no muestra deformaciones ni torsiones complejas, lo que indica que las variables actúan de manera relativamente independiente dentro del rango experimental analizado.

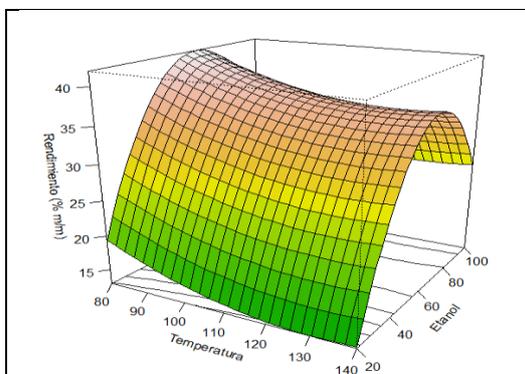


Figura 13: Representación gráfica RSM de condición óptima para rendimiento de extracto de la variedad BB obtenido por PLE.

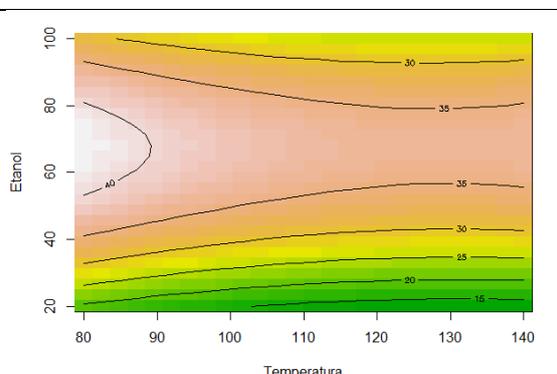


Figura 14: Representación gráfica RSM de contorno de condición óptima para rendimiento de extracto de la variedad BB obtenido por PLE.

Aunque no se dispone de réplicas suficientes para aplicar un análisis estadístico comparativo formal entre las distintas metodologías de extracción, las diferencias observadas en los rendimientos son lo suficientemente marcadas como para sugerir que el proceso de extracción por PLE resulta más eficiente para la variedad BB. En particular, bajo condiciones óptimas, el rendimiento alcanzado mediante PLE (44,08%) duplicó ampliamente los valores obtenidos por maceración etanólica (18,96%) y extracción con CO₂ supercrítico (18,69%). Este permite considerar a PLE como el método más eficaz en términos de recuperación de extracto, dentro del marco experimental desarrollado. Sin embargo, sería irresponsable concluir de forma categórica sobre la superioridad de un método frente a otro con esta cantidad limitada de datos y sin replicación sistemática en todas las condiciones. En este sentido, sería altamente recomendable que en futuros trabajos se contemple la disponibilidad de una mayor cantidad de material vegetal, lo que permitiría incluir réplicas adecuadas para cada tratamiento y realizar análisis estadísticos robustos. Esto permitiría validar con mayor precisión si las diferencias observadas entre métodos son estadísticamente significativas y, por ende, si es posible

concluir con mayor certeza cuál resulta más eficiente en términos de rendimiento extractivo.

6.5.2- Rendimientos extracciones por PLE variedad P3

Al analizar los resultados obtenidos mediante la metodología PLE en la variedad P3, se observan tendencias relacionadas con la influencia de la temperatura de extracción y el solvente utilizado en el rendimiento del extracto final. Observamos que a medida que la temperatura se incrementa de 80°C a 140°C, el rendimiento del extracto tiende a disminuir independientemente del solvente de extracción (Figura 15), tendencia ya observada en la variedad BB.

De igual manera que para la variedad BB, al analizar los resultados de las extracciones del punto central (35,44%, 33,09%, 34,55%) (Figura 15), encontramos que la media de estos rendimientos es del 34,36%.

Nuevamente haciendo un test de Grubbs para identificar valores atípicos, se obtuvo un valor p de 0,734 (Anexo 16), por lo tanto, nuevamente, el proceso de extracción parece ser reproducible.

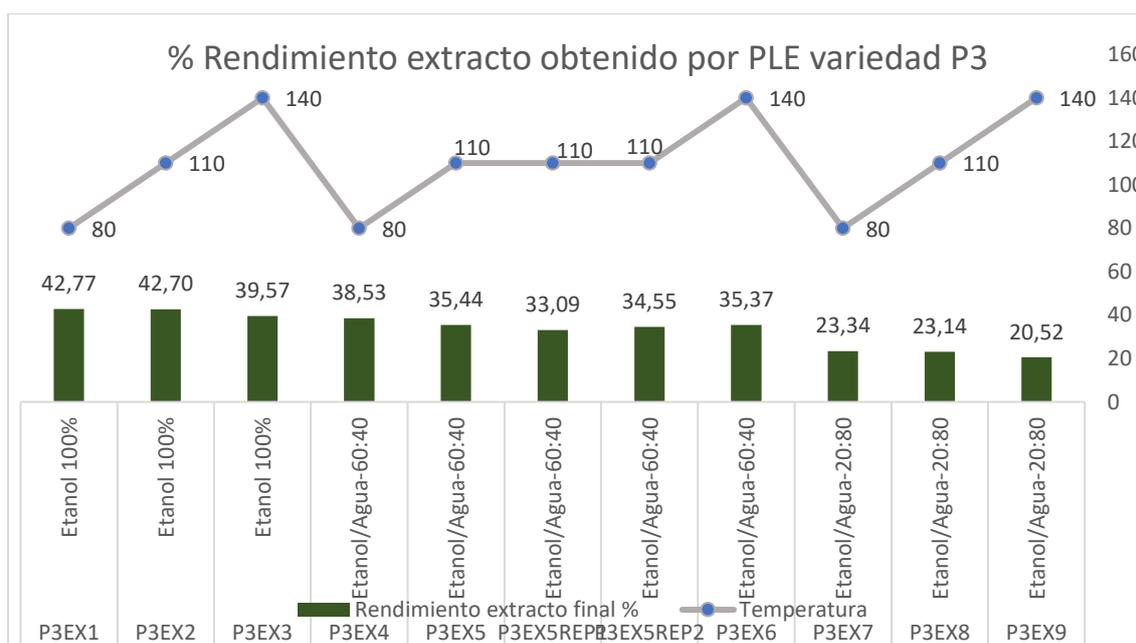


Figura 15: Rendimiento porcentual de la variedad P3 de extracto invernalizado obtenido por PLE.

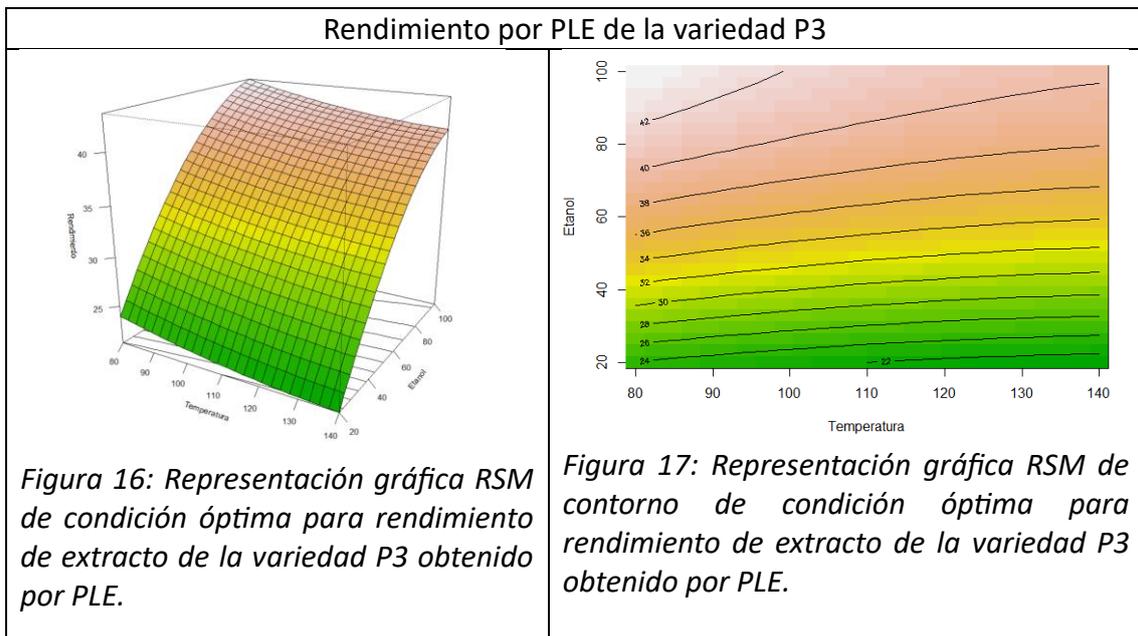
El análisis de la superficie de respuesta obtenida para la variedad P3 sugiere un comportamiento diferente al observado en la variedad BB. En dicha representación tridimensional se observa que el rendimiento aumenta significativamente con el incremento en la proporción de etanol. El gráfico de contorno refuerza esta tendencia mostrando

curvas elevadas en esa misma dirección, sin evidencia de un punto óptimo claramente definido dentro del rango experimental. Esta forma sugiere que el sistema no alcanza una meseta de rendimiento en las condiciones ensayadas, y que potencialmente el óptimo podría encontrarse más allá de los límites de temperatura y composición solvente evaluados (Figura 16 y 17).

El mayor rendimiento para la variedad P3 (42,77%) se obtuvo utilizando etanol puro a 80 °C (Figura 15), condición que supera a todas las demás combinaciones evaluadas, incluso aquellas con temperaturas más elevadas o con mezclas de etanol y agua. A medida que se incorpora agua al solvente, el rendimiento disminuye de forma sostenida, alcanzando los valores más bajos en las condiciones de etanol/agua 20:80. Este patrón indica que en el caso de esta variedad, el uso de un solvente más apolar como el etanol puro resulta más efectivo, y que el aumento de temperatura no logra compensar el efecto negativo de la dilución con agua.

En este caso particular, es probable que el modelo no haya captado adecuadamente el rendimiento elevado registrado con etanol puro a baja temperatura debido a la escasez de puntos extremos en esa zona.

Los resultados permiten sugerir que al igual que en la variedad BB, en P3 la proporción de solvente es el factor de mayor impacto, mientras que la temperatura presenta un efecto secundario, pero no despreciable.



En lo que respecta al análisis comparativo del rendimiento de las diferentes metodologías de extracción aplicadas a la variedad P3 de *Cannabis sativa*, se observaron diferencias importantes entre los métodos evaluados. A pesar de que no se cuenta con réplicas en todas las condiciones que permitan realizar un análisis estadístico formal, los resultados obtenidos permiten establecer ciertas tendencias preliminares.

PLE con etanol puro a 80 °C ofreció el rendimiento más alto registrado para esta variedad, alcanzando un 42,77%. Esta condición superó ampliamente a todas las demás combinaciones evaluadas dentro de la misma metodología, incluyendo aquellas que utilizaban mezclas de etanol y agua o temperaturas más elevadas. El comportamiento observado en los datos reales indicó que la incorporación de agua al solvente provocó una disminución progresiva del rendimiento, siendo notoria en la mezcla 20:80 (etanol/agua), que generó los valores más bajos.

SFE mostró rendimientos menores en comparación con PLE. Las condiciones aplicadas a esta variedad, que incluyeron presiones de hasta 380 bar y temperaturas de 60 °C, proporciono un rendimiento máximo de 15%, similares a los obtenidos con la maceración etanólica (máximo de 18.72%), pero por debajo de los logrados mediante PLE.

Si bien los resultados indican que PLE bajo condiciones optimizadas proporciona el mayor rendimiento para la variedad P3, es importante aclarar que estas conclusiones deben considerarse preliminares. La falta de replicación en las condiciones de extracción y sobre todo en aquellas que indican inicialmente mayores rendimientos limita la posibilidad de establecer afirmaciones categóricas desde el punto de vista estadístico. En este sentido, sería irresponsable concluir de manera definitiva que un método es superior a otro sin disponer de un conjunto de datos más robusto y replicado.

Por lo tanto, para futuras investigaciones sería altamente recomendable contar con una mayor cantidad de material vegetal que permita realizar extracciones replicadas de forma sistemática para cada condición evaluada. Esto permitiría aplicar herramientas estadísticas comparativas más sólidas y concluir con mayor certeza si las diferencias observadas en los rendimientos entre metodologías son estadísticamente significativas. Aun así, dentro del marco experimental desarrollado, los resultados obtenidos posicionan a PLE como la metodología más eficiente en términos de recuperación de extracto para la variedad P3.

6.6- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por maceración etanólica.

6.6.1- Concentración de cannabinoides en los extractos obtenidos por maceración etanólica variedad BB.

El análisis de los extractos obtenidos por maceración etanólica a partir de la variedad BB muestra un perfil marcado por la predominancia del THCA sobre el THC.

En lo que respecta al THCA, ambas replicas mostraron concentraciones con valores de, 69,97% en BB Maceración 1 y de 68,52% en BB Maceración 2, (Figura 18).

El promedio obtenido fue de 69,30 % \pm 0,96, con un coeficiente de variación (CV) del 1,38 %, lo que indicaría reproducibilidad del proceso para este compuesto.

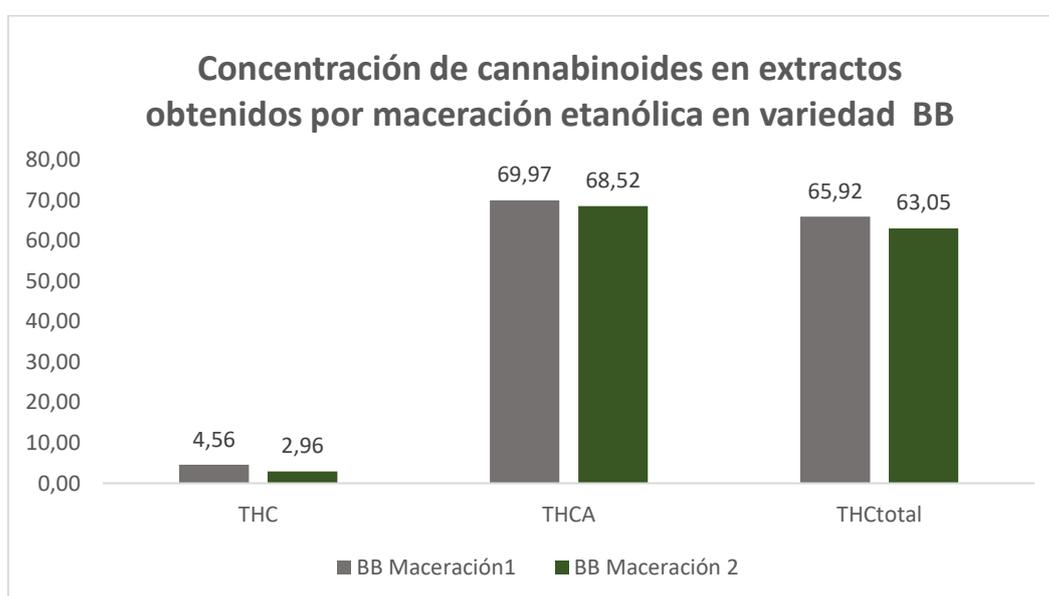


Figura 18: Concentración porcentual de cannabinoides de la variedad BB obtenidos por maceración etanólica.

Para THC, los datos presentados en el Anexo 18 muestran la existencia de una diferencia en la concentración entre las dos réplicas de maceración etanólica para la variedad BB donde para BB Maceración 1 se obtuvo 4,56 % frente a 2,96 % en BB Maceración 2 (Figura 18), lo que representa una diferencia relativa del 35 %. El valor promedio fue de 3,76 % \pm 1,13, con un CV elevado de 30,08 %, lo cual sugiere que aunque el proceso tiende a conservar THCA, la proporción que se encuentra descarboxilada puede depender de factores no controlados.

El análisis del THCtotal mostró valores de 65,92 % (BB Maceración 1) y 63,05 % (BB Maceración 2) (Figura 18), con una diferencia relativa del 4 %. Si bien se aplicó una prueba t entre ambas réplicas, obteniendo un valor de $t = 7,41$ y $p = 5,99 \times 10^{-10}$, el escaso número de réplicas ($n = 2$) limita la validez de este resultado. Por tanto, estos

valores deben interpretarse exclusivamente como un indicador cuantitativo de la diferencia observada, sin asumir significancia estadística en sentido estricto.

Estos resultados reflejan que bajo condiciones estandarizadas la maceración etanólica permitiría obtener extractos reproducibles en términos de contenido de THCA, mientras que el contenido de THC parece más variable al menos para esta variedad de material vegetal.

Por último, al comparar con el trabajo de Fernández et al. (36), donde se obtuvieron valores de 5,63 % de THC y 77,0 % de THCA bajo condiciones experimentales similares, se observa una diferencia cuantitativa notable.

En conclusión, la maceración etanólica se presenta como una técnica efectiva para la extracción de cannabinoides en su forma ácida, con buena reproducibilidad para el THCA, pero cierta variabilidad en la proporción de THC. La estandarización del procedimiento y la caracterización detallada del material vegetal serán claves para mejorar la consistencia del proceso, especialmente si se busca escalar la técnica hacia aplicaciones farmacéuticas o industriales.

6.6.2 Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por maceración etanólica variedad P3.

Por su parte los extractos obtenidos por maceración etanólica de la variedad P3 muestra una alta proporción de cannabinoides en su forma ácida, particularmente CBDA y THCA, lo cual concuerda con el perfil fitoquímico esperado para esta variedad y con la naturaleza del proceso extractivo, en línea con lo observado también para la variedad BB. Si bien se cuenta con dos réplicas experimentales independientes, el reducido número de repeticiones limita la posibilidad de realizar tratamientos estadístico robustos. Por tanto, la interpretación de los resultados se basa en un análisis comparativo preliminar.

Los cannabinoides predominantes en ambos extractos fueron el CBDA y el THCA, con valores muy similares entre las dos maceraciones: 37,44 % (P3 Maceración 1) y 37,37 % (P3 Maceración 2) para el CBDA, y 19,01 % y 19,02 % para el THCA, respectivamente (Figura 19). Esta mínima diferencia relativa se traduce en coeficientes de variación (CV) de 0,13 % para el CBDA y 0,04 % para el THCA, lo que parece sugerir una excelente reproducibilidad del proceso para estos compuestos.

En cuanto a los cannabinoides neutros, CBD y THC, sus concentraciones también mostraron escasa variabilidad entre réplicas comportamiento contrario al obtenido en la variedad BB, el CBD fue de 2,25 % y 2,08 %, con un CV de 4,3 %, mientras que el THC alcanzó 2,47 % y 2,31 %, con un CV de 4,1 % (Figura 19). Estos valores si bien más bajos en términos absolutos, se mantienen consistentes entre extracciones, lo que da como indicio que la maceración la idea de que la metodología de maceración etanólica podría ofrecer un buen control del perfil fitoquímico del extracto.

Respecto al contenido total de cannabinoides, el CBDtotal presentó valores de 35,09 % y 34,85 % (CV = 0,48 %), mientras que el THCtotal fue de 19,14 % y 18,98 % (CV = 0,56 %) (Figura 19).

Desde el punto de vista comparativo, los resultados reafirman que la maceración etanólica permite preservar de forma eficiente los cannabinoides en su forma ácida, esto

posiblemente puede atribuirse a la ausencia de etapas térmicas significativas, lo que minimiza la descarboxilación espontánea durante la extracción.

Al considerar publicaciones previas, como el estudio de Fernández et al. (36), donde se utilizó una variedad rica en CBD y se obtuvieron valores elevados de CBDA y bajos niveles de descarboxilación, se observa un patrón coincidente.

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente discutidos para la variedad P3, estos indican que bajo las condiciones empleadas, la maceración etanólica es un método reproducible y eficiente para preservar CBDA y THCA, y que también permite mantener constantes las proporciones de sus formas neutras. De todas maneras será necesario replicar experimentalmente estos resultados con mayor número de extracciones independientes para poder confirmar estadísticamente la robustez del proceso y validar su aplicación a mayor escala.

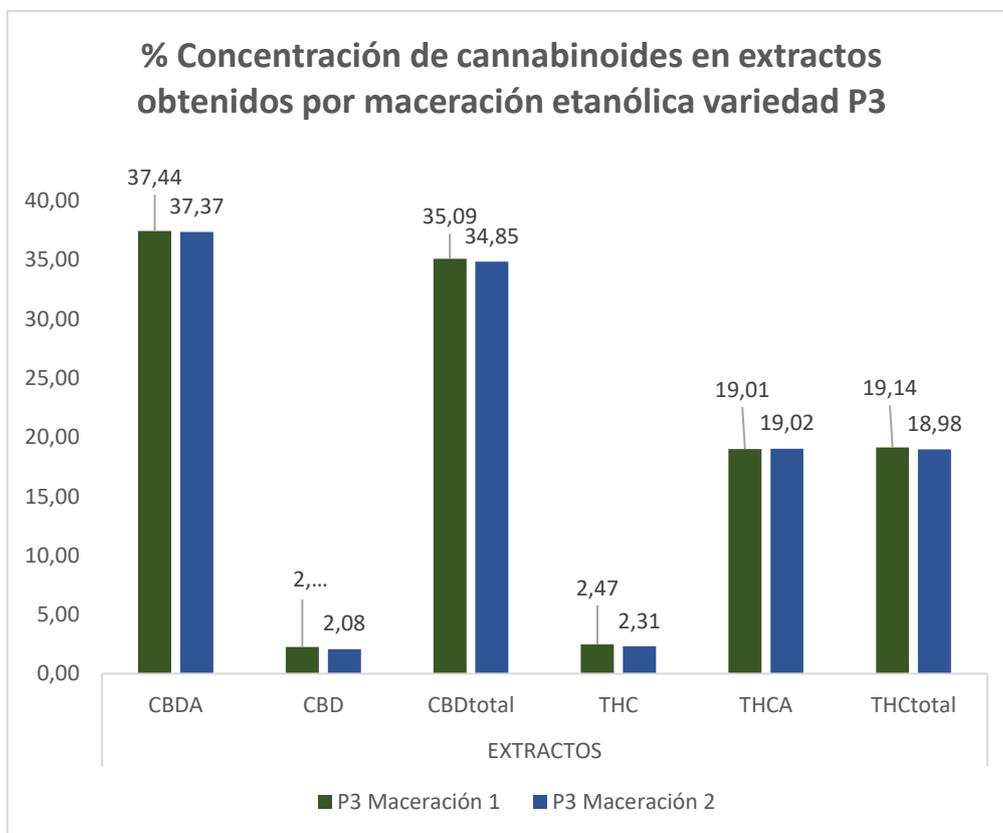


Figura 19: Concentración porcentual de cannabinoides de la variedad P3 obtenidos por maceración etanólica.

6.7- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por SFE.

6.7.1- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por SFE variedad BB.

El análisis del perfil de cannabinoides en los extractos de la variedad BB obtenidos mediante extracción con SFE revela diferencias con respecto a los resultados obtenidos por maceración etanólica.

Es importante destacar que las extracciones realizadas no cuentan con réplicas experimentales independientes, por lo cual no es posible establecer conclusiones estadísticamente válidas. La discusión debe interpretarse como un análisis comparativo preliminar, centrado en tendencias relativas entre métodos y condiciones de extracción. En primer lugar, se observa que las concentraciones de THC obtenidas mediante SFE son más altas que aquellas logradas por maceración. En SFE, el THC varió entre 22,95 % (BBE2) y 38,10 % (BBE7BIS) (Figura 20) mientras que en maceración los valores estuvieron entre 2,96 % y 4,56 % (Figura 18). Esta diferencia es muy probable que este dada por la temperatura empleada en el proceso supercrítico favorece la descarboxilación del THCA a THC, resultando en extractos con mayor proporción de la forma neutra del cannabinoide. Esta característica puede ser deseable cuando el objetivo es maximizar la concentración de THC en el producto final.

En contrapartida, los niveles de THCA fueron superiores en los extractos obtenidos por maceración (68,52 % a 69,97 %) (Figura 18), frente a los obtenidos por SFE (25,40 % a 37,75 %) (Figura 20). Este resultado respalda la hipótesis de que el THCA es más susceptible a la descarboxilación durante el proceso SFE, ya sea por el efecto de la temperatura, o por el solvente utilizado en fluido supercrítico.

A pesar de estas diferencias en la distribución entre formas ácidas y neutras, el contenido de THCtotal (calculado como $\text{THC} + 0,877 \times \text{THCA}$) fue similar en ambos métodos, en SFE se alcanzaron valores entre 54,65 % (BBE2) y 71,20 % (BBE7BIS) (Figura 20), mientras que en maceración los valores oscilaron entre 63,05 % y 65,92 % (Figura 18). Esta similitud sugiere que desde el punto de vista del rendimiento global de cannabinoides descarboxilables, ambos métodos son eficaces, aunque ofrecen perfiles distintos en términos de la proporción relativa entre THCA y THC.

Un caso interesante es el lote BBE7BIS, en el cual se registraron las concentraciones más altas de THC (38,10 %), THCA (37,75 %) y THCtotal (71,20 %) (Figura 20). Esta extracción correspondió a una segunda pasada sobre el mismo material vegetal, y se realizó bajo condiciones operativas más severas que la extracción original (temperaturas más elevadas y mayor presión). Es posible que la primera extracción, realizada a menor temperatura y presión (Dos etapas: la primera a 60 min., 35°C y 100 bar y la segunda a 60 min., 40°C y 140 bar), haya eliminado preferentemente otros componentes más volátiles o polares, dejando una matriz enriquecida en cannabinoides para la segunda etapa.

Por otra parte, al comparar estos resultados con publicaciones previas, como las de Fernández et al. (2021), se observa que los rendimientos obtenidos en este trabajo son comparables, aunque algo inferiores al THCtotal reportado por esos autores (hasta 75 %)

cuando emplearon temperaturas de hasta 70 °C. Esto refuerza la importancia de la temperatura como variable crítica en la eficiencia de recuperación de cannabinoides en SFE, posiblemente con mayor impacto que la presión, al menos en el rango operativo considerado.

Los resultados indican que la extracción supercrítica permite obtener extractos con alto contenido de THCtotal, pero con un perfil más descarboxilado que el logrado por maceración. Por tanto, la selección del método debe guiarse por el perfil fitoquímico deseado. Si se busca preservar THCA, la maceración etanólica resulta más adecuada. En cambio, para maximizar THC, la SFE se presenta como la mejor alternativa. Cualquiera sea la elección, será necesario validar estos resultados con ensayos replicados si se pretende escalar el proceso o definir especificaciones técnicas del producto final.

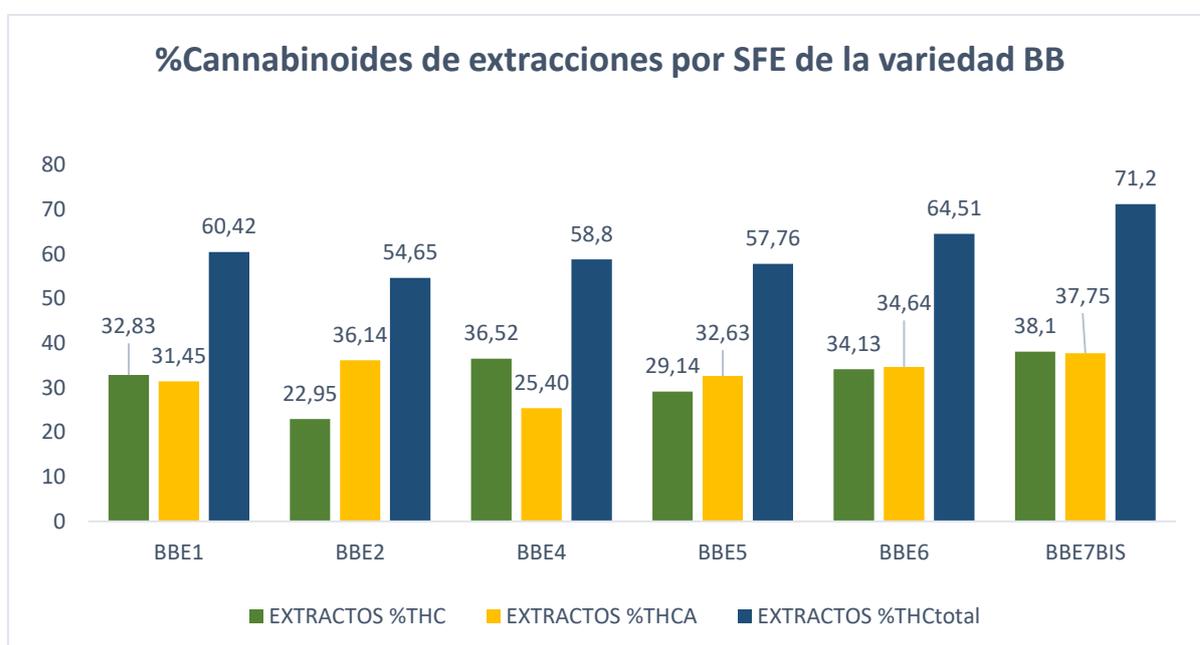


Figura 20: Concentración porcentual de cannabinoides de la variedad BB obtenidos por SFE.

6.7.2 Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por SFE variedad P3

Al analizar la concentración de cannabinoides en los extractos de la variedad P3 obtenidos mediante extracción SFE, se observan diferencias con respecto a los obtenidos por maceración etanólica. Nuevamente es importante destacar que estos resultados no permiten realizar inferencias estadísticas sólidas, ya que no se cuenta con réplicas independientes para las extracciones. Por tanto, la discusión que sigue se basa en observaciones comparativas preliminares, orientadas a explorar tendencias relativas entre distintos métodos y condiciones de extracción.

En particular se destacan diferencias en la preservación de los cannabinoides en su forma ácida. En el caso del CBDA, se alcanzó un valor máximo de 38,83 % en el extracto P3E1a ciclón 1 (Figura 21), similar o incluso levemente superior al máximo obtenido por maceración (37,44 %) (Figura 19). Esto sugeriría que bajo ciertas condiciones la SFE con recuperación fraccionada puede preservar eficazmente formas ácidas como el CBDA. También hay que destacar la concentración máxima de CBDA obtenida por SFE cuando la extracción no fue fraccionada donde se obtuvo un 35,76 % (Figura 21), valor comparable al promedio de 37,41 % obtenido por maceración (Figura 19). Por el contrario, el THCA mostró una marcada disminución en todos los extractos por SFE, con un máximo de apenas 9,39 % en P3E1 (Figura 21), en comparación con valores de hasta 19,02 % observados por maceración (Figura 19). Este comportamiento sugiere una mayor susceptibilidad del THCA a la descarboxilación o transformación durante el proceso supercrítico, aunque este tipo de afirmaciones debe tomarse con cautela, al tratarse de una comparación entre condiciones únicas y no replicadas.

La diferencia en el grado de preservación entre CBDA y THCA es particularmente llamativa, la concentración de THCA se reduce aproximadamente a la mitad al pasar de maceración a SFE, mientras que la de CBDA se mantiene prácticamente constante. Esta observación, aunque preliminar, sugeriría una estabilidad diferencial entre ambos compuestos.

Además, la distribución de cannabinoides entre los tres ciclones en el extracto fraccionado P3E1a mostró tendencias interesantes: el CBDA disminuye del ciclón 1 al 3 (38,83 %, 22,07 %, 11,39%), mientras que el CBD muestra una tendencia opuesta (10,91%, 16,62%, 17,29%) (Figura 21). Este patrón sugiere que la fracción fraccionada permite separar cannabinoides en función de su polaridad y grado de descarboxilación, lo cual podría aprovecharse como estrategia tecnológica para ajustar el perfil fitoquímico del extracto. Sin embargo, dado que cada ciclón corresponde a una única extracción sin replicación, estas tendencias deben interpretarse como indicios y no como conclusiones definitivas.

Por otro lado, los cannabinoides neutros como CBD y THC presentaron concentraciones comparables o incluso superiores a las obtenidas por maceración. El CBDtotal alcanzó un máximo de 44,96 % en el ciclón 1 de P3E1a, mientras que el THCtotal llegó a 21,12 % en P3E3 (Figura 21), en línea con los valores obtenidos mediante maceración. Esto indica que desde el punto de vista del rendimiento global de compuestos activos, SFE podría ser tan eficaz como la maceración etanólica. Sin embargo, nuevamente, estas comparaciones se basan en observaciones individuales, por lo que no es posible establecer afirmaciones generalizables sin contar con replicación experimental y análisis estadístico formal.

Estos resultados destacan que aunque SFE presenta limitaciones en la preservación del THCA su selectividad, capacidad de fraccionamiento y perfil de extracción la posicionan como una técnica versátil. La elección del método de extracción debería considerar no solo el rendimiento total, sino también la estabilidad relativa de los cannabinoides de interés, el perfil fitoquímico deseado, y la necesidad de validación con ensayos replicados si se busca escalar o estandarizar el proceso.

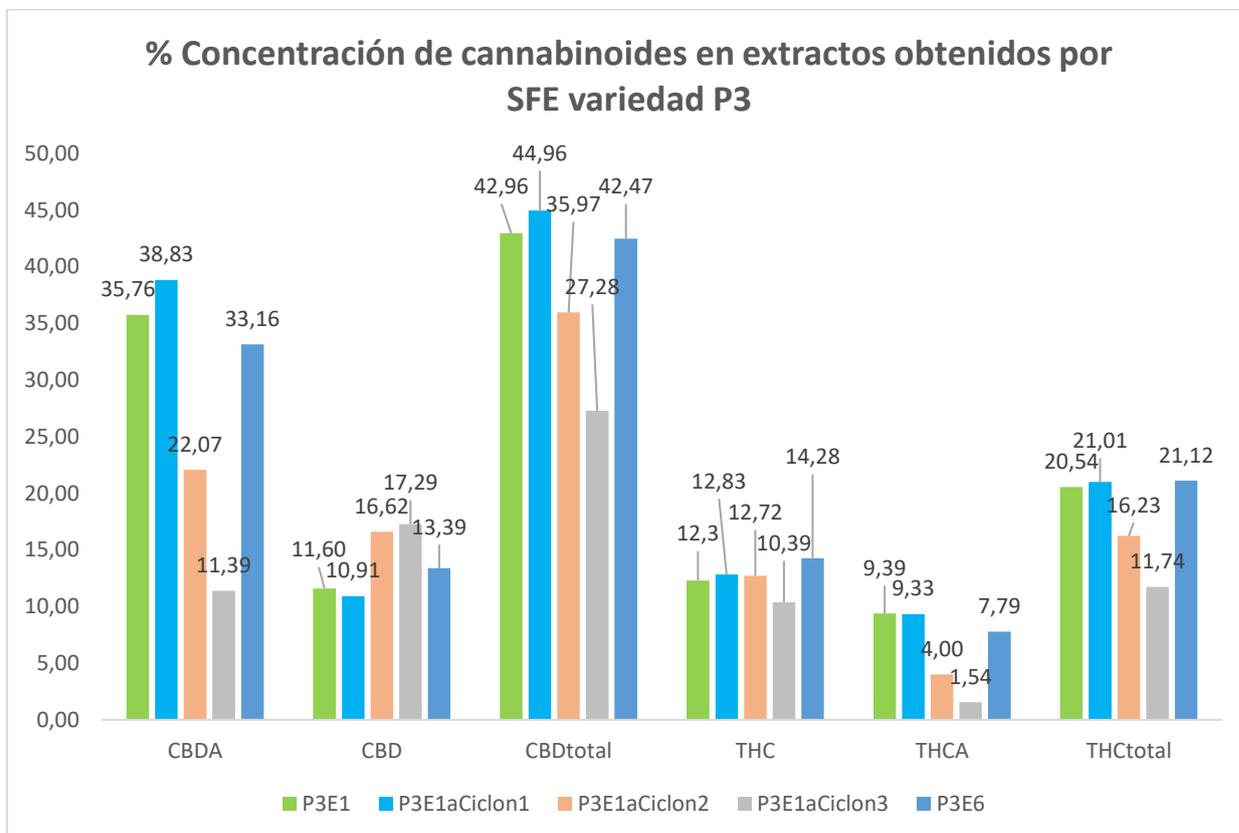


Figura 21: Concentración porcentual de cannabinoides de la variedad P3 obtenidos por SFE.

6.8- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por PLE.

6.8.1- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por PLE variedad BB.

El análisis de las concentraciones de THC, THCA y THCtotal en los extractos de la variedad BB obtenidos mediante PLE muestra tendencias generales asociadas a las condiciones operativas (Tabla 19).

El THCA alcanzó sus valores más altos en BBEX1 y BBEX2 (35,74 % y 29,34 %, respectivamente Tabla 19), ambas con etanol puro, pero a diferentes temperaturas, 80°C y 110°C respectivamente.

A medida que aumenta la proporción de agua en el solvente se observa una disminución en la concentración de este cannabinoide, el cual a la temperatura de 140°C ya no se detecta su presencia por motivo de la descarboxilación y conversión a THC.

Por otro lado, en el caso del THC, las mayores concentraciones se registraron en las extracciones BBEX3 y BBEX6, ambas realizadas a 140 °C, lo que respalda el efecto de la temperatura como principal impulsor de la descarboxilación del THCA. Sin embargo, al comparar con P3EX9, también a 140 °C pero con una mezcla etanol/agua 20:80 se observa una reducción evidente respecto a BBEX3 y BBEX6 en el contenido de THC, lo que indica que la presencia de agua en el solvente reduce la extracción de THC incluso cuando la temperatura es elevada.

Al observar la evolución del THCtotal se evidencia un comportamiento más estable, con valores máximos en torno al 45 %, y descensos progresivos en extracciones con menor proporción de etanol. Por lo tanto, se deduce que las condiciones que combinan etanol puro con temperaturas intermedias parecen ofrecer una sinergia favorable entre eficiencia extractiva y preservación de cannabinoides. Por el contrario, las extracciones realizadas con una mezcla de etanol y agua al 20:80 independientemente de la temperatura aplicada resultaron en valores muy bajos tanto para THC como para THCA, lo que parece indicar que la presencia de un mayor contenido agua respecto al etanol disminuye la solubilidad y la recuperación de estos compuestos.

Sería necesario aumentar el número experimental para confirmar si estas variaciones reflejan una tendencia real o responden a la variabilidad inherente del proceso.

Con el número actual de réplicas, carece de sentido realizar análisis más profundos, pero si establecemos las bases preliminares para profundizar en el tema si se dispone de material vegetal suficiente lo cual ayudara a aumentar el número de replicas y analizar los datos desde otros puntos de vista como el rendimiento masico de cannabinoides y la eficiencia de extracción de cada compuesto en estas condiciones no es posible establecer una relación estadística responsable.

Tabla 19: Concentración porcentual de cannabinoides de la variedad BB obtenidos por PLE.

| Extracción | Concentración de cannabinoides en extracto de la variedad BB obtenido por PLE (%) | | |
|------------|---|-------|----------|
| | THC | THCA | THCtotal |
| BBEX1 | 14,15 | 35,74 | 45,50 |
| BBEX2 | 19,83 | 29,34 | 45,55 |
| BBEX3 | 40,13 | 0,32 | 40,41 |
| BBEX4 | 17,21 | 19,65 | 34,44 |
| BBEX5 | 26,71 | 14,62 | 39,53 |
| BBEX5rep1 | 27,39 | 14,53 | 40,13 |
| BBEX5rep2 | 34,75 | 3,97 | 38,23 |
| BBEX6 | 40,53 | nd | 40,53 |
| BBEX7 | 0,49 | 5,55 | 5,36 |
| BBEX8 | 0,43 | 0,79 | 1,13 |
| BBEX9 | 1,85 | nd | 1,85 |

La evolución de la concentración de THC en función de la temperatura y la proporción de etanol queda representada en la superficie de respuesta tridimensional mostrada en la Figura 22. En dicha gráfica se observa un incremento hacia temperaturas más elevadas y solventes con mayor proporción de etanol, conformando una superficie convexa en ascenso. La región de máximos se ubica hacia el vértice superior derecho del gráfico, correspondiente a la combinación de 140 °C y etanol absoluto (100%), lo cual sugiere una contribución positiva de ambos factores. Esta tendencia puede atribuirse a la sinergia entre la descarboxilación térmica del THCA, promovida por la temperatura, y la eficiencia del etanol 100% para solubilizar el THC formado, asegurando su recuperación sin pérdida o degradación.

Esta interpretación se ve reforzada por la representación bidimensional de contorno presentada en la Figura 23, donde se aprecia un patrón de curvas que ascienden progresivamente desde la zona inferior izquierda hacia la superior derecha.

Ambas representaciones coinciden en que la formación y recuperación de THC se ven favorecidas por condiciones de extracción más extremas realizadas en este trabajo, tanto térmicas como solventes.

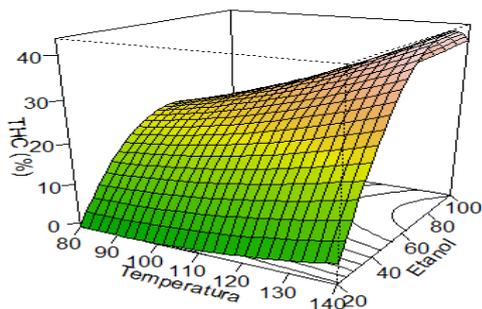


Figura 22: Representación gráfica RSM de condición óptima para extracción de THC de extracto de la variedad BB obtenido por PLE.

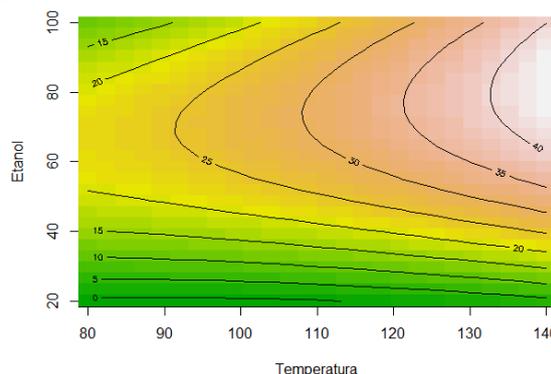


Figura 23: Representación gráfica RSM de contorno de condición óptima para extracción de THC de extracto de la variedad BB obtenido por PLE.

Las superficies correspondientes al THCA (Figuras 24 y 25) muestran un perfil respecto a la temperatura opuesto al del THC. El modelo tridimensional presenta un máximo en la región de baja temperatura (80 °C) y etanol puro, con una pendiente descendente pronunciada hacia condiciones donde aumenta la temperatura. La gráfica de contorno lo refleja mediante curvas fuertemente curvadas que se aproximan rápidamente a concentraciones mínimas conforme se incrementa la temperatura o aumenta la proporción de agua en el solvente agua. Esto confirma que el THCA es altamente termolábil y que su extracción eficiente requiere condiciones controladas.

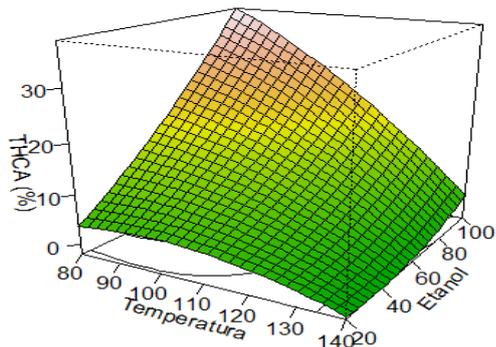


Figura 24: Representación gráfica RSM de condición óptima para extracción de THCA de extracto de la variedad BB obtenido por PLE.

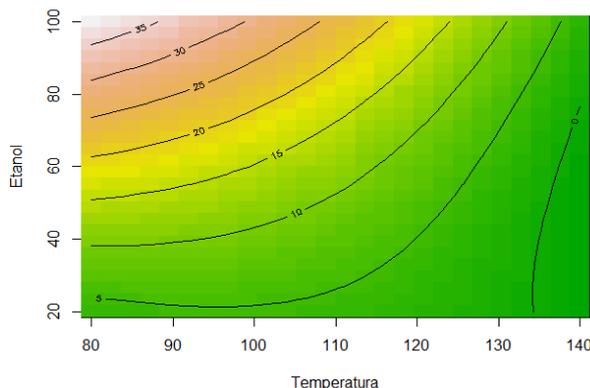


Figura 25: Representación gráfica RSM de contorno de condición óptima para extracción de THCA de extracto de la variedad BB obtenido por PLE.

El comportamiento del THCtotal (Figuras 26 y 27) se sitúa entre ambos extremos. La superficie 3D muestra una meseta amplia y elevada en la región de etanol puro, con poca variación a lo largo del eje de temperatura entre 110–140 °C. Este perfil indica que bajo estas condiciones, la extracción de THCtotal es eficiente y relativamente independiente de la temperatura una vez completada la descarboxilación del THCA. La gráfica de contorno evidencia esta estabilidad mediante líneas de concentración casi horizontales, lo que sugiere que la proporción de etanol en el solvente es el factor más determinante para maximizar el THCtotal, más que la temperatura en sí.

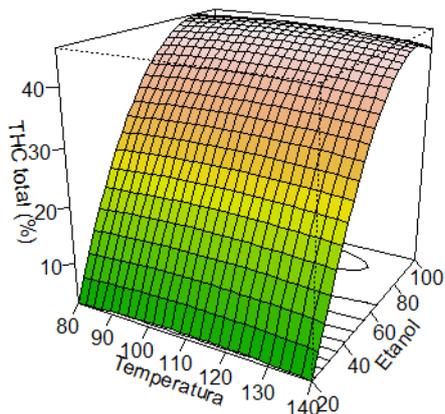


Figura 26: Representación gráfica RSM de condición óptima para extracción de THCTotal de extracto de la variedad BB obtenido por PLE.

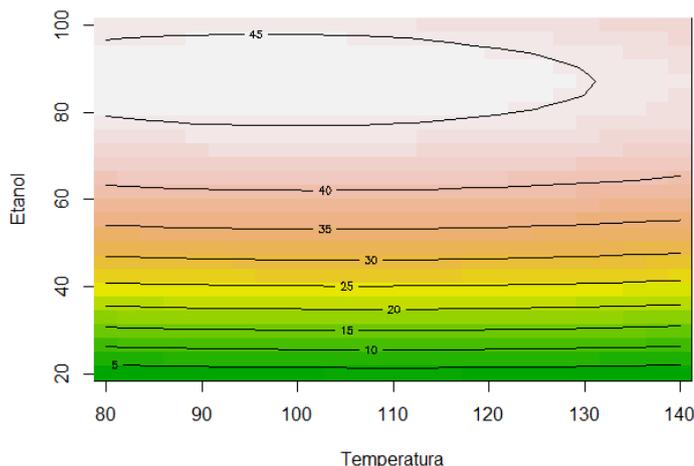


Figura 27: Representación gráfica RSM de contorno de condición óptima para extracción de THCTotal de extracto de la variedad BB obtenido por PLE.

La comparación entre THC, THCA y THCTotal destaca que cada compuesto responde de forma diferencial a las variables operativas. Mientras el THC se favorece con temperaturas elevadas, el THCA exige condiciones de temperatura bajas, y el THCTotal depende mayormente del solvente utilizado. Este análisis pone de manifiesto que la PLE es una técnica ajustable, cuyo perfil fitoquímico puede orientarse según las necesidades del producto final.

No obstante, las limitaciones del diseño experimental particularmente la falta de replicación en condiciones extremas obliga a considerar estos modelos como herramientas orientativas. El valor atípico en una réplica de THCA(BBEX5rep2) también subraya la necesidad de incluir un mayor número de réplicas experimentales en futuras investigaciones, para afinar la precisión estadística y validar la robustez de los modelos.

6.8.2- Concentración de cannabinoides en extractos obtenidos por PLE variedad P3.

Es importante tener en cuenta que todas estas interpretaciones deben considerarse como tendencias relativas, derivadas del análisis de una sola extracción por condición sin replicación experimental. Por lo tanto, los resultados permiten explorar patrones comparativos, pero no pueden asumirse como conclusiones definitivas desde un punto de vista estadístico.

En la Tabla 20 se detallan los contenidos de CBD, CBDA y CBDtotal en extractos obtenidos bajo diferentes condiciones de temperatura (80 °C, 110 °C y 140 °C) y proporciones de solvente etanol/agua (100/0, 60/40 y 20/80). Al analizar las extracciones realizadas con etanol 100% se observan variaciones en la composición de los extractos en función de la

temperatura. A 80 °C (P3EX1), se obtuvo un contenido de CBD de 2,50%, CBDA de 22,65% y CBDtotal de 22,36%. Al aumentar la temperatura a 110 °C (P3EX2), el CBD aumentó a 4,53% mientras que el CBDA disminuyó a 19,59%, con un CBDtotal de 21,71%. A 140 °C (P3EX3), el CBD ascendió a 20,77% y el CBDA descendió a 0,50%, lo que se tradujo en un CBDtotal de 21,21%. Estos resultados permiten describir una tendencia en la que el aumento de temperatura produce una disminución del CBDA y un aumento del CBD, manteniéndose el CBDtotal en valores próximos entre los tres niveles de temperatura, aunque con una leve disminución en el caso de 110 °C y 140 °C respecto a 80 °C.

Cuando se empleó una mezcla 60/40 de EtOH/H₂O, a 80 °C (P3EX4) se obtuvo un CBD de 2,23%, un CBDA de 22,78% y un CBDtotal de 22,21%. Este perfil es muy similar al observado con etanol 100% a la misma temperatura (P3EX1), lo que indica que en estas condiciones la composición del solvente prácticamente no modificó los valores obtenidos. A 110 °C (P3EX5, P3EX5rep1 y P3EX5rep2), el CBD se ubicó entre 6,81% y 8,41%, mientras que el CBDA varió entre 13,91% y 18,61%, alcanzando valores de CBDtotal de 19,01% (P3EX5), 24,73% (P3EX5rep1) y 19,47% (P3EX5rep2). La presencia de réplicas en esta condición permite caracterizar la variabilidad de los resultados. El promedio de CBD fue de 7,38%, con una desviación estándar de 0,90% y un rango de 6,81% a 8,41%, el promedio de CBDA fue de 15,61%, con una dispersión mayor (desviación estándar de 2,60%) y un rango de 13,91% a 18,61%; en cuanto al CBDtotal, se obtuvo un promedio de 21,07%, con una desviación estándar de 3,27% y un rango entre 19,01% y 24,73%, siendo E5rep1 el que presentó el valor más alto. A 140 °C (P3EX6), el CBD alcanzó 20,97%, el CBDA fue 1,58% y el CBDtotal 22,36%. Se observa que el aumento de temperatura en esta proporción de solvente se asocia con una reducción progresiva de CBDA y un aumento de CBD, manteniéndose los valores de CBDtotal dentro del rango observado en otras condiciones.

En el caso de la mezcla con mayor proporción de agua (EtOH/H₂O 20/80), se observan concentraciones más bajas de CBD y CBDtotal en dos de los niveles de temperatura evaluados. A 80 °C (P3EX7), el CBD fue 0,15%, el CBDA 20,15% y el CBDtotal 17,82%. A 110 °C (P3EX8), el CBD aumentó a 2,97%, mientras que el CBDA disminuyó a 15,98%, con un CBDtotal de 16,98%. A 140 °C (P3EX9), se registró un CBD de 11,51%, un CBDA de 9,50% y un CBDtotal de 19,84%. En este último caso se observa un comportamiento particular respecto a las otras condiciones aplicadas a 140 °C, si bien la temperatura fue la misma, el contenido de CBDA fue considerablemente mayor que en P3EX3 (0,50%) y P3EX6 (1,58%), lo cual sugiere una menor eficiencia de descarboxilación bajo una alta proporción de agua. Asimismo, el CBDtotal en P3EX9 (19,84%) resultó menor que en esas otras dos condiciones, lo que podría indicar que el elevado contenido acuoso del solvente no solo limita la transformación del CBDA, sino también reduce la capacidad de extracción del CBD formado. Esta combinación de factores nos proporciona una condición en la que el proceso extractivo y la conversión térmica se ven afectados por el solvente.

A partir de los resultados presentados en la Tabla 20, se puede inducir que tanto la temperatura como la proporción de solvente influyen en la composición de los extractos en relación con CBD y CBDA. El aumento de temperatura se acompaña de una reducción de CBDA y un aumento del CBD, lo cual es coherente con la transformación térmica de las formas ácidas en sus correspondientes formas neutras.

Por otro lado, los valores de CBDtotal no muestran incrementos proporcionales al aumento de temperatura, y en algunos casos presentan leves reducciones. Además, una mayor proporción de etanol en el solvente se asocia con valores más altos de CBDtotal, mientras que al aumentar el contenido de agua, los valores de CBDtotal disminuyen en todos los niveles de temperatura evaluados. La condición en la que se obtuvo el mayor valor de CBDtotal fue a 110 °C con una mezcla EtOH/H₂O 60/40, específicamente en la réplica P3EX5rep1, con un valor de 24,73%.

Tabla 20: Concentración porcentual de cannabinoides de la variedad P3 obtenidos por PLE.

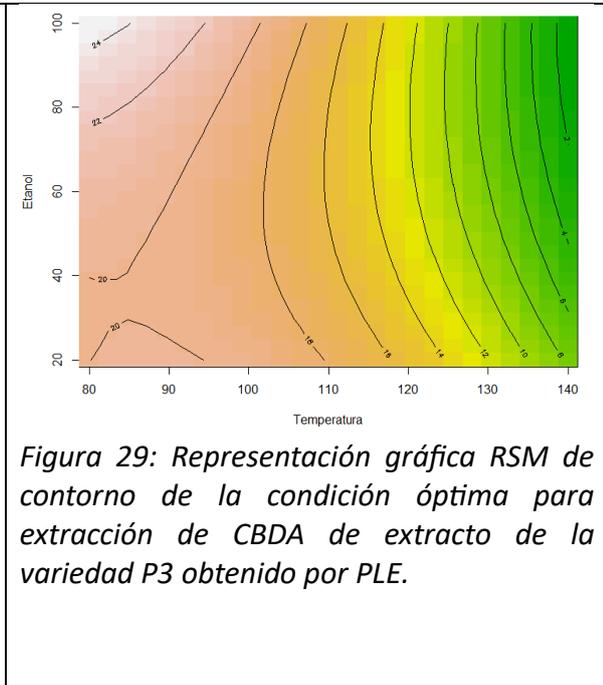
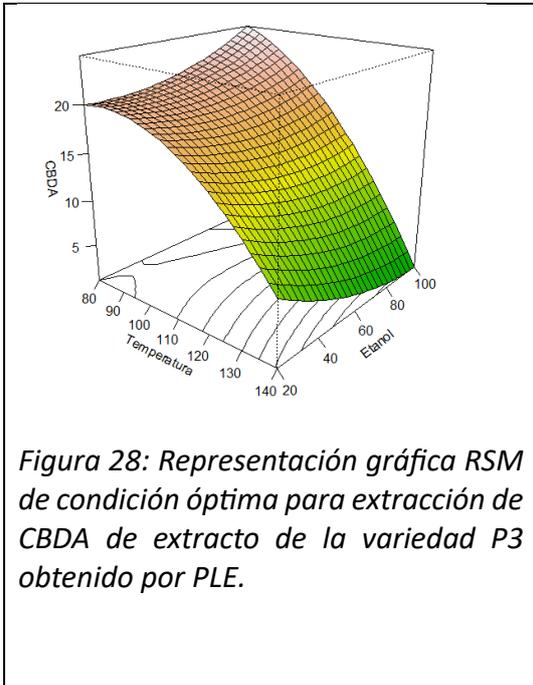
| Extracción | Extractos | | | | | |
|------------|-----------|-------|----------|------|-------|----------|
| | CBD | CBDA | CBDtotal | THC | THCA | THCtotal |
| P3EX1 | 2,50 | 22,65 | 22,36 | 2,44 | 10,48 | 11,63 |
| P3EX2 | 4,53 | 19,59 | 21,71 | 3,61 | 8,78 | 11,31 |
| P3EX3 | 20,77 | 0,50 | 21,21 | 9,69 | nd | 9,69 |
| P3EX4 | 2,23 | 22,78 | 22,21 | 2,42 | 10,66 | 11,77 |
| P3EX5 | 6,81 | 13,91 | 19,01 | 4,05 | 6,2 | 9,49 |
| P3EX5rep1 | 8,41 | 18,61 | 24,73 | 5,21 | 8,11 | 12,32 |
| P3EX5rep2 | 6,92 | 14,31 | 19,47 | 4,12 | 6,37 | 9,71 |
| P3EX6 | 20,97 | 1,58 | 22,36 | 9,29 | 0,01 | 9,30 |
| P3EX7 | 0,15 | 20,15 | 17,82 | 0,05 | 9,64 | 8,50 |
| P3EX8 | 2,97 | 15,98 | 16,98 | 0,81 | 10,09 | 9,66 |
| P3EX9 | 11,51 | 9,50 | 19,84 | 5,39 | 1,91 | 7,07 |

Las gráficas de superficie de respuesta correspondientes al CBDA muestran un comportamiento condicionado por la temperatura de extracción y en menor medida por la proporción de etanol en el solvente. La superficie tridimensional (Figura 28) presenta una pendiente descendente pronunciada a lo largo del eje de temperatura, indicando una pérdida progresiva de CBDA a medida que se incrementa este parámetro. Este comportamiento es consistente con la susceptibilidad del CBDA a la descarboxilación térmica, transformándose en CBD cuando se expone a condiciones de alta temperatura. La forma curva de la superficie confirma la existencia de una región óptima localizada en los valores más bajos del rango térmico (entorno a 80 °C), donde se mantiene la integridad del compuesto ácido.

La gráfica de contorno (Figura 29) refuerza esta interpretación. Las curvas están espaciadas de forma regular y tienden a concentrarse hacia las zonas de menor temperatura y mayor proporción de etanol, lo que sugiere que en esas condiciones la extracción de CBDA es más eficiente. El patrón observado no muestra una meseta estable ni una cúspide aguda, lo que indica que el contenido no se mantiene constante por un amplio intervalo, sino que es sensible a pequeñas variaciones en las condiciones operativas. Esto indica la necesidad de un control preciso del proceso si se pretende preservar CBDA como objetivo principal.

Si bien la proporción de etanol también influye, su efecto es menos marcado que el de la temperatura. El gradiente vertical en la figura de contorno es más suave, lo que indica que el cambio en el porcentaje de etanol modifica la capacidad de extracción de CBDA,

pero sin provocar una variación tan drástica como la temperatura. La zona óptima parece ubicarse en el extremo de etanol puro o cercano al 100 %. Considerando ambas condiciones variables, las superficies modeladas muestran que la preservación del CBDA en la variedad P3 mediante PLE requiere condiciones suaves, con temperaturas cercanas al mínimo del rango estudiado (80 °C) y etanol 100% como solvente. Cualquier desviación hacia temperaturas más altas compromete rápidamente la recuperación de este compuesto por conversión térmica.



Las representaciones gráficas de la extracción de THCA en la variedad P3 (Figuras 30 y 31) muestran un comportamiento coherente con lo observado previamente para CBDA, lo cual resulta esperable considerando que ambos compuestos son formas ácidas y termolábiles de sus respectivos cannabinoides neutros. La superficie tridimensional (Figura 30) presenta una inclinación general descendente a lo largo del eje de temperatura, evidenciando que el incremento térmico afecta negativamente la concentración de THCA extraída. Esta pendiente se acentúa aproximadamente a partir de los 110 °C, lo que sugiere una intensificación del proceso de descarboxilación térmica hacia THC, reduciendo de manera progresiva la presencia de la forma ácida en el extracto.

La Figura 31, correspondiente a la representación de contorno permite observar con mayor precisión la distribución de los valores máximos de THCA en el plano de temperatura y proporción de etanol. La gráfica muestra dos zonas bien definidas de mayor concentración de THCA a bajas temperaturas, una en el vértice superior izquierdo (etanol absoluto, 100%) y otra en el vértice inferior izquierdo (etanol muy diluido, 20%). Este patrón sugiere que la preservación del THCA no depende exclusivamente de la proporción de etanol, sino que puede lograrse bajo condiciones de solventes muy distintos, siempre que la temperatura de extracción se mantenga baja, mientras que el aumento de temperatura tiene un efecto claramente negativo y sostenido, el efecto del etanol es más complejo y no lineal en esta variedad.

Estas representaciones confirman que la variable crítica para conservar el THCA es la temperatura y que su incremento incluso dentro del rango evaluado conduce a una pérdida progresiva del compuesto por descarboxilación. La superficie tridimensional no muestra mesetas amplias ni zonas de estabilidad, lo que implica que el control fino de las condiciones operativas resulta esencial y que pequeñas desviaciones térmicas pueden traducirse rápidamente en pérdidas. La similitud en la morfología general entre las superficies de THCA y CBDA refuerza la idea de que ambos compuestos comparten una sensibilidad térmica comparable y que su preservación requiere condiciones controladas.

Por lo tanto, las superficies de respuesta para THCA en la variedad P3 obtenidas por PLE indican que este cannabinoide se preserva mejor bajo condiciones de baja temperatura, preferentemente inferiores a 100 °C, y que la proporción de etanol óptima puede no ser única, ya que se observaron concentraciones elevadas tanto en medios altamente alcohólicos como altamente acuosos. Estas condiciones deben considerarse prioritarias cuando el objetivo del proceso extractivo sea conservar la forma ácida del THC, ya sea por motivos farmacológicos o regulatorios.

En este punto es importante realizar algunos comentarios para los resultados obtenidos para la extracción de THCA en ambas variedades de material vegetal utilizados. Se esperaría que independientemente de la variedad la capacidad de extracción del mismo compuesto sea similar, sin embargo, ambos modelos coinciden en destacar la temperatura como el factor determinante para preservar el THCA, pero divergen en cuanto al rol que juega la proporción de etanol. La variedad BB responde de manera más predecible, mostrando una condición óptima (etanol absoluto y baja temperatura), mientras que P3 exhibe un comportamiento más atípico, con zonas óptimas tanto en condiciones hidroalcohólicas como acuosas, siempre que se controle la variable térmica. Estas diferencias remarcan como se mencionó en otros casos la necesidad de adaptar las condiciones de extracción no solo al tipo de compuesto, sino también a la genética vegetal utilizada. Si bien ambas para ambas variedades la temperatura es la condición en común, P3 exige una comprensión demás detallada en cuanto a su comportamiento según el solvente.

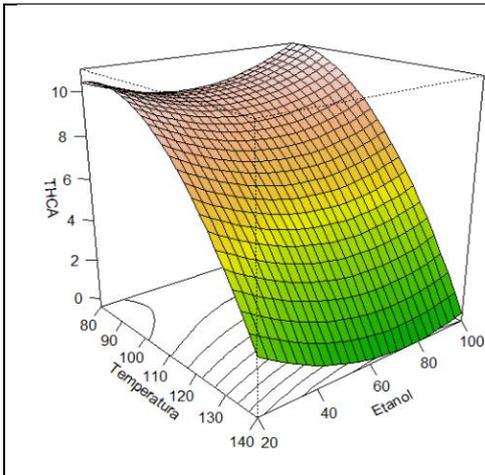


Figura 30: Representación gráfica RSM de condición óptima para extracción de THCA de extracto de la variedad P3 obtenido por PLE.

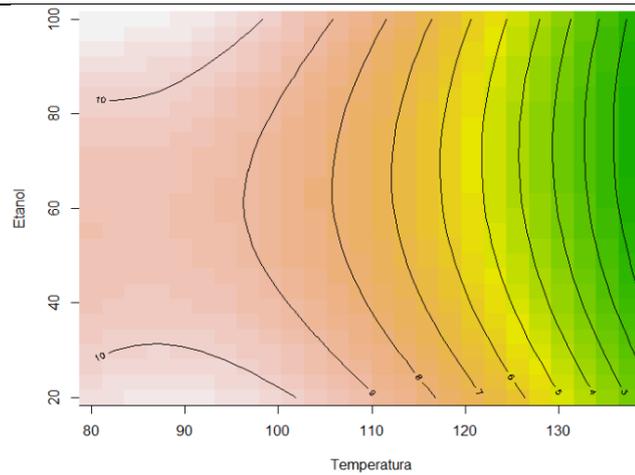


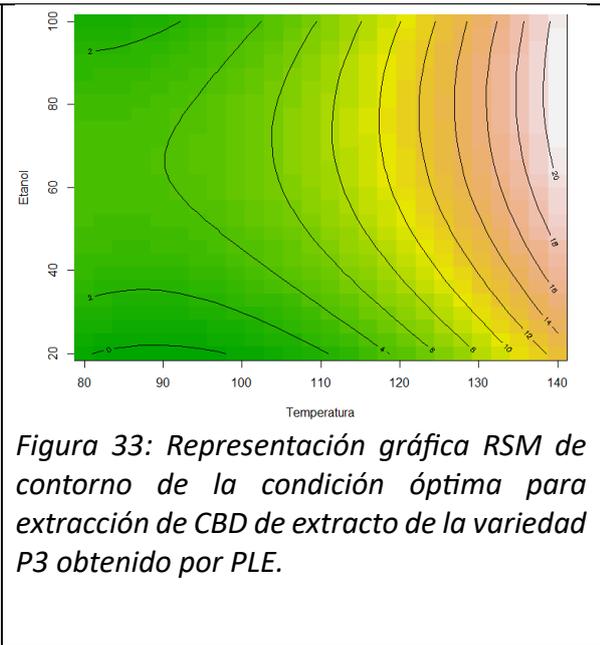
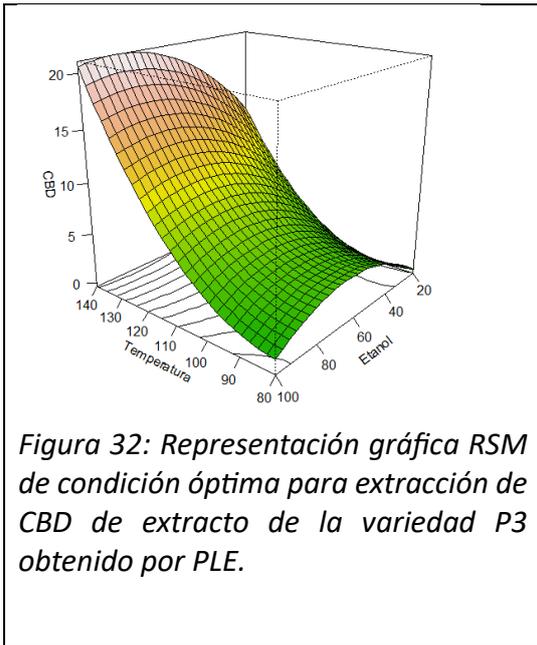
Figura 31: Representación gráfica RSM de contorno de la condición óptima para extracción de THCA de extracto de la variedad P3 obtenido por PLE.

La superficie tridimensional para CBD (Figura 32) muestra una pendiente ascendente hacia la región de mayor temperatura (140 °C) y etanol 100%, lo que indica que el CBD se favorece bajo condiciones térmicas intensas y en un solvente menos polar. Esta tendencia es consistente con el comportamiento esperado para un cannabinoide neutro, cuya recuperación se potencia tras la descarboxilación del CBDA. A diferencia de lo observado para CBDA y THCA, donde las curvas descendían con la temperatura, en este caso se verifica lo contrario.

La gráfica de contorno (Figura 33) remarca esta interpretación al mostrar curvas bien definidas que tienden a agruparse hacia el extremo superior derecho, donde se concentran los mayores valores. Las curvas son relativamente paralelas al eje del etanol, lo que indica que la temperatura es la variable que más influye sobre la extracción de CBD. La proporción de etanol si bien es relevante presenta un efecto más gradual, aunque claramente se observa que la dilución con agua reduce la eficiencia extractiva, lo cual concuerda con la menor solubilidad de los compuestos lipofílicos en mezclas acuosas.

Este comportamiento refleja una complementariedad respecto a lo observado en CBDA y THCA. Mientras estos últimos requieren bajas temperaturas para su preservación, el CBD se beneficia del entorno térmico alto. Esta diferencia puede aprovecharse estratégicamente para orientar la extracción hacia un perfil descarboxilado.

La superficie del CBD no presenta irregularidades ni mesetas abruptas, lo que indica una respuesta progresiva y predecible ante el aumento de las condiciones. Esta linealidad relativa del modelo permite una optimización más sencilla, al no requerir un ajuste fino de parámetros dentro de una zona estrecha. De todas maneras esta aparente facilidad de extracción debe interpretarse con cautela ya que un exceso de temperatura también podría inducir la degradación secundaria del CBD si se sobrepasan ciertos límites no explorados en este diseño experimental.



La Figura 34 presenta la superficie de respuesta tridimensional correspondiente a la concentración de THC en el extracto, en función de la temperatura y la proporción de etanol en el solvente. La morfología de la superficie es claramente ascendente, con los valores más bajos de THC localizados en la región de menor temperatura y menor proporción de etanol y un aumento progresivo hacia el vértice opuesto, donde se combinan temperaturas elevadas y etanol 100%. Esta distribución indicaría que ambos factores contribuyen de manera positiva a la concentración de THC, actuando de forma complementaria en el rango experimental evaluado.

El incremento en la temperatura favorece el proceso de descarboxilación de THCA, generando THC, mientras que el etanol en alta proporción optimiza la solubilización del compuesto formado, permitiendo una recuperación más eficiente en el extracto. La superficie es continua, levemente curvada, lo que sugiere que no se ha alcanzado un punto de saturación dentro del rango experimental.

La pendiente más pronunciada se observa en dirección al eje de la temperatura, especialmente por encima de los 110 °C, donde se intensifica la acumulación de THC. Aunque la proporción de etanol también aporta un efecto positivo, su influencia es más gradual. Esta relación puede explicarse por la naturaleza termolábil del THCA y por el rol secundario del solvente en la generación del compuesto.

La gráfica de contorno (Figura 35) muestra la representación de contorno correspondiente a la concentración de THC en el extracto, en función de la temperatura de extracción y la proporción de etanol. Las curvas presentan una disposición casi paralela al eje del etanol, lo que indica que la temperatura es el factor con mayor influencia sobre la concentración de THC. A medida que se avanza hacia la derecha del gráfico se observa un aumento progresivo y sostenido en los valores de THC, alcanzando los máximos en la región correspondiente a 140 °C y alta proporción de etanol.

El patrón de colores refuerza esta interpretación los tonos verdes y amarillos, asociados a concentraciones medias o bajas, se sitúan en la zona izquierda del gráfico (temperaturas ≤ 110 °C), mientras que los tonos naranjas se concentran en la zona de

alta temperatura. Este comportamiento sugiere que la descarboxilación térmica del THCA a THC se ve fuertemente favorecida por el aumento de temperatura, lo cual se refleja en una acumulación progresiva de THC en el extracto. El etanol también contribuye, aunque su efecto es secundario respecto a la variable térmica presencia en altas proporciones facilita la solubilización del THC ya generado, pero no parece ser el principal factor del aumento observado.

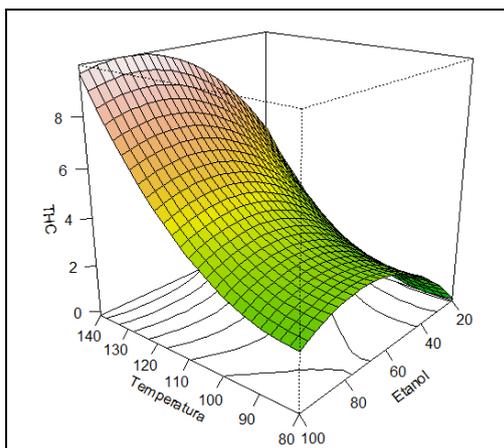


Figura 34: Representación gráfica RSM de condición óptima para extracción de THC de extracto de la variedad P3 obtenido por PLE.

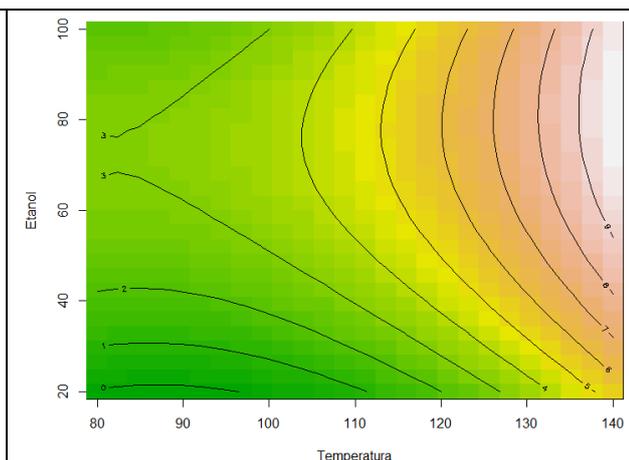


Figura 35: Representación gráfica RSM de contorno de la condición óptima para extracción de THC de extracto de la variedad P3 obtenido por PLE.

6.9- Contenido de volátiles analizados por GC

6.9.1-Contenido de volátiles en trampas de hexano

Es importante considerar que si bien el análisis cromatográfico permitió la detección de un mayor número de compuestos, únicamente se consideraron aquellos cuya área relativa superó el 0,1 %, con el propósito de limitar el estudio a una referencia de los componentes más representativos del perfil. No se buscó en este caso realizar una cuantificación absoluta de los terpenos presentes en los extractos, sino describir su perfil y proporciones relativas, así como analizar las diferencias entre muestras obtenidas bajo distintas condiciones de extracción. Este enfoque fue meramente informativo y no pretendió alcanzar un nivel exhaustivo de detalle, sino que se planteó como un primer paso metodológico que sirva de base para orientar y enriquecer futuros trabajos de investigación más específicos.

En cuanto a los resultados obtenidos en las muestras de hexano de la extracción BBE7 evaluados mediante GC-MS, se observó una similitud en la composición de volátiles al comparar el CO₂ con destino al ambiente barboteado en hexano, con el CO₂ recolectado a la salida de los ciclones de recolección. (Figura 6,7 y 36).

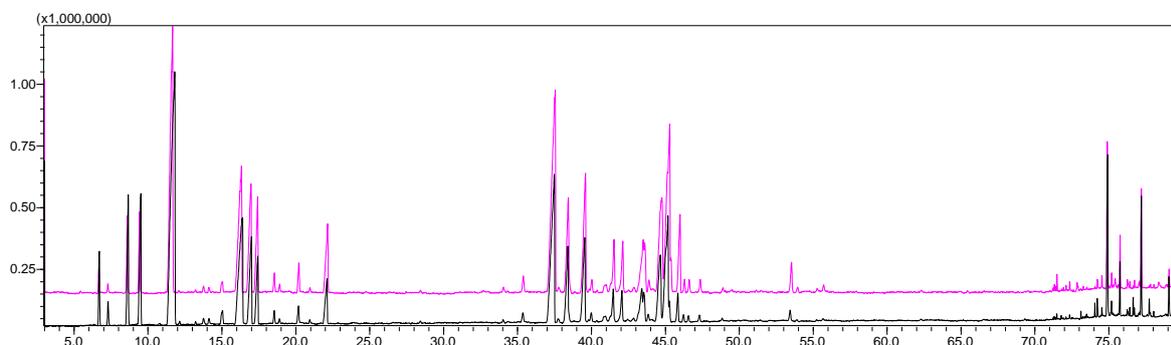


Figura 36: superposición de cromatogramas de las muestras en trampas de hexano (En negro: Muestra de trampa de hexano.CO₂ del barboteo al ambiente. En rosado: Muestra de trampa en hexano.CO₂ recolectado a la salida de los ciclones).

Los compuestos mayoritarios identificados en ambas trampas fueron limoneno, linalol y β -cariofileno, con proporciones relativas del 24,70 %, 10,30 % y 12,33 % respectivamente en la muestra recolectada a la salida del CO₂ al ambiente (Tabla 21), y del 15,34 %, 8,52 % y 16,18 % en la muestra capturada a la salida de los ciclones (Tabla 22).

Al analizar los grupos de terpenos, se observa que los monoterpenos (incluyendo compuestos como α -pineno, β -pineno, mirceno y terpineol) representan aproximadamente un 55 % del total de volátiles en la muestra recolectada a la salida del CO₂ al ambiente, mientras que los sesquiterpenos constituyen aproximadamente el 37 %. En la fracción capturada a la salida de los ciclones, en cambio, la proporción de monoterpenos desciende aproximadamente al 37 %, mientras que los sesquiterpenos aumentan aproximadamente al 56 %.

Estas diferencias pueden estar relacionadas con la volatilidad de los compuestos y la posición de las trampas en el sistema de extracción. Los monoterpenos, más volátiles, tienden a encontrarse en mayor proporción en la muestra recolectada a la salida del CO₂ al ambiente, mientras que los sesquiterpenos, de menor volatilidad, se concentran relativamente más en la fracción capturada en los ciclones.

Otro aspecto relevante es la presencia de cannabinoides. La fracción a la salida del CO₂ al ambiente presentó una mayor concentración de THC (4,36 % frente a 2,00 %) y CBC (0,32 % frente a 0,14 %), mientras que en la fracción capturada en los ciclones se identificó la presencia de cannabigerol (CBG) en un 0,14 %, compuesto ausente en la otra muestra.

Tabla 21: Muestra de trampa de hexano.CO₂ del barboteo al ambiente.

| LRI ^a | compuesto | % area ^c | LRI | compuesto | % area |
|------------------|----------------------------------|---------------------|------|--------------------------------------|--------|
| 932 | α-pineno | 1,85 | 1434 | γ-elemeno | 4,01 |
| 946 | canfeno | 0,60 | 1452 | δ-elemeno | 4,57 |
| 974 | β-pineno | 4,22 | 1454 | (E)-β-farneseno | 0,31 |
| 988 | mirceno | 4,98 | 1471 | 4,5-di-epi-aristoloqueno | 0,05 |
| 1014 | α-terpineno | 0,06 | 1483 | α-amorfeno | 0,19 |
| 1024 | limoneno | 24,70 | 1489 | β-selineno | 1,29 |
| 1044 | trans-β-ocimeno | 0,07 | 1498 | α-selineno | 1,30 |
| 1054 | γ-terpineno | 0,08 | 1505 | β-bisaboleno | 0,24 |
| 1065 | hidrato de trans-sabineno | 0,20 | 1505 | α-farneseno | 1,14 |
| 1067 | óxido de cis-linalol (furanóide) | 0,19 | 1496 | valenceno | 4,56 |
| 1083 | fenchona | 0,27 | 1545 | selina-3,7(11)-dieno | 3,62 |
| 1086 | terpinoleno | 0,29 | 1559 | germacreno B | 1,01 |
| 1095 | linalol | 10,30 | 1543 | eudesma-5,7(11)-dieno | 0,24 |
| 1114 | alcohol 2-feniletílico | 4,64 | 1561 | trans-nerolidol | 0,19 |
| 1119 | hidrato de cis-pineno | 2,93 | 1582 | óxido de cariofileno | 0,23 |
| 1139 | hidrato de trans-pineno | 0,39 | 1608 | epóxido de humuleno II | 0,07 |
| 1145 | hidrato de canfeno | 0,13 | 1685 | α-bisabolol | 0,39 |
| 1165 | borneol | 0,61 | 1696 | Juniper camphor | 0,09 |
| 1174 | terpinen-4-ol | 0,12 | 1577 | espatulenol | 0,06 |
| 1209 | α-terpineol | 2,25 | 1698 | (2Z,6Z)-farnesol | 0,09 |
| 1284 | acetato de bornilo | 0,09 | 1845 | fitona | 0,05 |
| 1373 | α-ylangene | 0,12 | 1942 | fitol | 0,08 |
| 1374 | α-copaene | 0,10 | 2486 | cannabichromene | 0,32 |
| 1417 | β-cariofileno | 12,33 | 2200 | Δ ⁹ -tetrahidrocannabinol | 4,36 |

LRI^a, índices de retención lineal (Kovats); % área^c, contenido expresado como porcentaje del cociente del área de cada componente dividido el área de todos los componentes considerando todos los factores de respuesta como igual a 1.

Tabla 22: Muestra de trampa en hexano.CO₂ recolectado a la salida de los ciclones.

| LRI ^a | compuesto | % area ^c | LRI | compuesto | % area |
|------------------|------------------------------------|---------------------|------|--------------------------------------|--------|
| 901 | heptanal | 0,07 | 1442 | guaia-6,9-dieno | 0,06 |
| 932 | α-pineno | 0,46 | 1452 | α-humuleno | 6,00 |
| 946 | canfeno | 0,16 | 1442 | Allo-aromadendreno | 0,09 |
| 974 | β-pineno | 1,66 | 1454 | (E)-β-farneseno | 0,39 |
| 988 | mirceno | 1,80 | 1471 | 4,5-di-epi-aristoloqueno | 0,06 |
| 1024 | limoneno | 15,34 | 1490 | isogermacreno D | 0,23 |
| 1044 | trans-β-ocimeno | 0,08 | 1489 | α-selineno | 0,29 |
| 1054 | γ-terpineno | 0,04 | 1492 | δ-selineno | 1,95 |
| 1065 | hidrato de trans sabineno | 0,18 | 1498 | β-selineno | 1,85 |
| 1067 | óxido de cis-linalol (furanoide) | 0,17 | 1505 | α-farneseno | 0,08 |
| 1083 | fenchone | 0,16 | 1483 | δ-amorfeno | 0,14 |
| 1086 | terpinoleno | 0,24 | 1496 | valenceno | 6,94 |
| 1098 | hidrato de cis-sabineno | 0,03 | 1522 | α-maaliene | 5,26 |
| 1095 | linalol | 8,52 | 1545 | selina-3,7(11)-dieno | 4,34 |
| 1114 | alcohol 2-feniletílico | 5,12 | 1506 | (Z)-α-bisaboleno | 0,66 |
| 1119 | hidrato de cis-pineno | 3,58 | 1559 | germacreno B | 2,94 |
| 1139 | hidrato de trans-pineno | 0,50 | 1416 | β-maaliene | 0,38 |
| 1145 | hidrato de canfeno | 0,19 | 1561 | trans nerolidol | 0,36 |
| 1165 | borneol | 0,90 | 1582 | óxido de cariofileno | 0,38 |
| 1174 | terpinen-4-ol | 0,11 | 1608 | epóxido de humuleno II | 0,16 |
| 1209 | α-terpineol | 3,17 | 1685 | α-bisabolol | 1,02 |
| 1284 | acetato de bornilo | 0,07 | 1696 | Juniper camphor | 0,18 |
| 1345 | α-cubebeno | 0,05 | 1577 | espatulenol | 0,11 |
| 1373 | α-ylangene | 0,14 | 1698 | (2Z,6Z)-farnesol | 0,18 |
| 1374 | α-copaeno | 0,04 | 1845 | fitona | 0,06 |
| 1417 | β-cariofileno | 16,18 | 1942 | fitol | 0,19 |
| 1434 | γ-elemento | 0,19 | 1742 | (2E,6E)-farnesol | 0,09 |
| 1434 | δ- elemene | 4,07 | 2486 | cannabicromeno | 0,14 |
| 1432 | α-trans-bergamoteno | 0,12 | 2200 | Δ ⁹ -tetrahidrocannabinol | 2,00 |
| | | | 2496 | cannabigerol | 0,14 |

LRI^a, índices de retención lineal (Kovats); % área^c, contenido expresado como porcentaje del cociente del área de cada componente dividido el área de todos los componentes considerando todos los factores de respuesta como igual a 1.

6.9.2-Contenido de volátiles en muestras de extracto (BBE1, BBE6, P3E1, P3E6, BBE7 ciclón 1, BBE7 ciclón 2, BBE7 ciclón 3)

En el análisis de los extractos obtenidos se observó que el perfil de compuestos volátiles presentes es en términos generales similar entre extractos de una misma variedad obtenidos bajo diferentes condiciones de extracción. Cabe aclarar que los porcentajes reportados en este estudio corresponden al área relativa de cada compuesto respecto al total del área integrada del cromatograma.

Las muestras BBE1 y BBE6, cuyos perfiles de terpenos se presentan en la Tabla 23 y la Tabla 24 respectivamente, fueron obtenidas mediante extracción con CO₂ supercrítico bajo condiciones diferentes, lo que se refleja en su composición química.

BBE1 (Tabla 23) fue extraída con una rampa de presión descendente de 350 a 300 bar a 50 °C durante 120 minutos, mientras que BBE6 (Tabla 24) se obtuvo a presión constante de 380 bar y temperatura más elevada (60 °C), también durante 120 minutos.

Ambas muestras comparten una serie de terpenos sesquiterpénicos, entre los que destacan β-cariofileno, (Z)-cariofileno, β-selineno, α-selineno, β-gurjuneno, β-bisaboleno, óxido de cariofileno, cis-nerolidol, (Z)-14-hidroxicariofileno, α-humuleno y

elemento, pero lo destacable de la comparación son las proporciones relativas de estos compuestos. Por ejemplo, β -cariofileno disminuye de 4,01 % en la Tabla 23 a 1,91 % en la Tabla 24; elemeno desciende de 14,01 % a 6,38 %; y (Z)-cariofileno de 1,64 % a 0,76 %, lo que sugiere que la condición de mayor temperatura y presión durante la extracción de BBE6 no favorecieron la conservación de estos terpenos. Variaciones similares se observan en otros compuestos como β -selineno, α -selineno y β -gurjuneno, todos con menor presencia en BBE6, probablemente por volatilización.

Neo-intermedeol, en cambio, se mantiene como el componente mayoritario en ambas muestras: 52,61 % en la Tabla 23 y 56,18 % en la Tabla 24.

Un aspecto que puede ser importante es la presencia de numerosos compuestos en BBE1 (Tabla 23) que están ausentes en BBE6 (Tabla 24). Entre ellos se encuentran limoneno (0,33 %), hidrato de pineno (0,36 %), α -terpineol (0,22 %), aromandreno (0,23 %), cis- α -bisaboleno (0,18 %), citronelol (0,82 %), germacreno B (1,19 %), pogostol (0,17 %), γ -gurjuneno (0,16 %), y α -bisabolol (0,11 %). Muchos de estos compuestos son monoterpenos o sesquiterpenos oxigenados de menor peso molecular o mayor sensibilidad térmica, lo que explica su ausencia en la muestra BBE6, ya que las condiciones de mayor presión y temperatura pueden favorecer su degradación.

Por otro lado, todos los compuestos identificados en BBE6 (Tabla 24) están también presentes en BBE1 (Tabla 23), por lo que no se evidencian terpenos exclusivos generados o extraídos únicamente bajo condiciones de mayor presión y temperatura. Esto refuerza la idea de que la rampa de presión descendente empleada en BBE1 no solo preserva una mayor diversidad terpénica, sino que también evita la pérdida de componentes volátiles que aportan a la complejidad química del extracto.

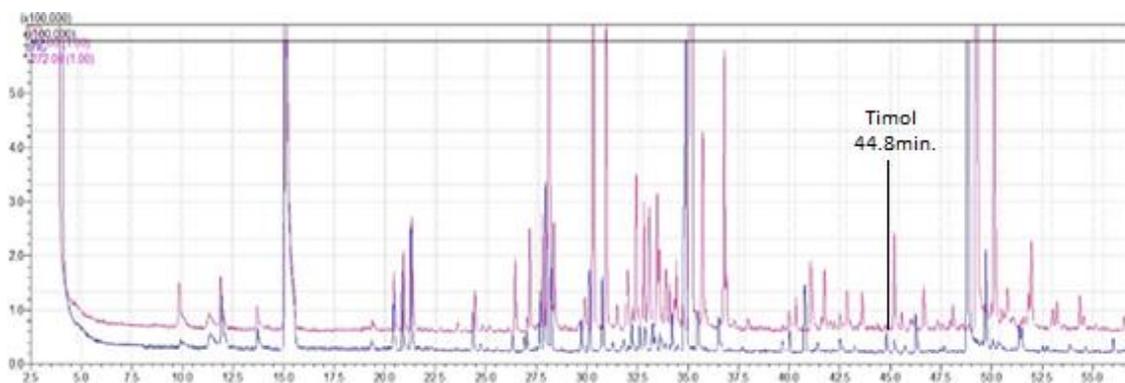


Figura 37: Superposición de cromatogramas de la variedad BB. (En rojo: BBE1. En azul: BBE6).

Tabla 23: Compuestos mayor a 0,1% respecto al estándar interno obtenidos en muestra de extracto BBE1.

| Tiempo de retención | Nombre | %Área |
|---------------------|---------------------------|-------|
| 9.940 | limoneno | 0.33 |
| 26.336 | hidrato de pineno | 0.36 |
| 27.042 | linalol | 0.38 |
| 27.995 | β -cariofileno | 4.01 |
| 30.784 | (Z)-cariofileno | 1.64 |
| 31.820 | α -terpineol | 0.22 |
| 32.242 | β -selineno | 0.65 |
| 32.618 | α -selineno | 0.51 |
| 32.876 | β -gurjuneno | 0.60 |
| 33.261 | β -bisaboleno | 0.57 |
| 33.685 | aromandreno | 0.23 |
| 33.865 | cis- α -bisaboleno | 0.18 |
| 34.958 | elemeno | 14.01 |
| 35.483 | citronelol | 0.82 |
| 36.536 | Germacreno B | 1.19 |
| 36.646 | pogostol | 0.17 |
| 41.424 | óxido de cariofileno | 0.28 |
| 42.516 | Cis-nerolidol | 0.18 |
| 43.262 | γ -gurjuneno | 0.16 |
| 47.697 | α -bisabolol | 0.11 |
| 48.860 | Neo intermedeol | 52.61 |
| 49.730 | (Z)-14-hidroxicariofileno | 1.85 |
| 51.519 | α -humuleno | 0.33 |

Tabla 24: Compuestos mayor a 0,1% respecto al estándar interno obtenidos en muestra de extracto BBE6.

| Tiempo de retención | Nombre | %Área |
|---------------------|---------------------------|-------|
| 27.031 | linalol | 0.15 |
| 27.972 | β -cariofileno | 1.91 |
| 30.767 | (Z)-cariofileno | 0.76 |
| 32.236 | β -selineno | 0.24 |
| 32.607 | α -selineno | 0.25 |
| 32.870 | β -gurjuneno | 0.25 |
| 33.246 | β -bisaboleno | 0.26 |
| 34.894 | elemeno | 6.38 |
| 41.418 | óxido de cariofileno | 0,10 |
| 42.515 | Cis-nerolidol | 0.13 |
| 48.843 | Neo intermedeol | 56.18 |
| 49.724 | (Z)-14-hidroxicariofileno | 0.99 |
| 51.502 | α -humuleno | 0.25 |

Las muestras P3E1 y P3E6, correspondientes a la variedad P3 y presentadas en las Tablas 25 y 26 respectivamente, fueron obtenidas mediante extracción con CO₂ supercrítico bajo condiciones distintas entre sí pero siguiendo la misma línea que las condiciones para la variedad BB analizada anteriormente. P3E1 fue extraída con una rampa de presión descendente entre 350 y 300 bar a 50 °C durante 120 minutos, mientras que P3E6 se obtuvo a presión constante de 380 bar y temperatura más alta, 60 °C, durante el mismo tiempo. Estas diferencias operativas se reflejan en sus perfiles terpénicos, que muestran variaciones tanto en diversidad de compuestos como en proporciones relativas.

Uno de los aspectos más destacables es la dominancia de aromandreno, que representa un 15,06 % del área total en P3E1 y asciende en P3E6, alcanzando un 17,39 %. Este sesquiterpeno es el componente principal en ambas muestras, lo que indica que su extracción es favorecida por ambas condiciones.

Algo similar ocurre con β -cariofileno, 3,89 % y 4,05 %, y con (Z)- α -bisaboleno, 3,05 % y 3,84 % respectivamente.

Dentro de otros compuestos compartidos entre ambas muestras y de contenido relativo similar a pesar de las diferentes condiciones de extracción tenemos sesquiterpenos oxigenados como α -humuleno (1,62 % y 1,73 %), óxido de cariofileno (0,54 % en ambas), y neo intermedeol (0,23 % y 0,24 %). También se conserva el perfil de terpenoles como α -terpineol, 0,65 % y 0,68 %, y linalol, en proporciones de 0,75 % y 0,89 %, dando indicio de que estas condiciones no degradan estos compuestos.

Sin embargo, P3E1 se destaca por una mayor diversidad terpénica, incluyendo compuestos ausentes en P3E6, como limoneno (0,07 %), hexanoato de etilo (0,10 %), octanoato de etilo (0,15 %), α -selineno (0,85 %), guaicol (1,72 %), epóxido de humuleno II (0,35 %), 14-hidroxi-(Z)-cariofileno (0,19 %), biciclogermacreno (0,33 %), y γ -gurjuneno (0,21 %). La presencia de estos compuestos pueden sugerir que la rampa de presión descendente en P3E1 permite una extracción con más compuestos, obteniéndose terpenos de menor peso molecular o mayor volatilidad que tienden a perderse bajo condiciones de mayor presión y temperatura como las de P3E6.

Comparando compuestos compartidos, algunos mantienen proporciones aparentemente similares (como β -gurjuneno, con 0,53 % en ambas muestras), β -bisaboleno, 1,32 % y 1,39 %, o α -bisabolol, 0,19 % y 0,23 %.

Por otro lado, algunos compuestos se detectan exclusivamente en P3E6, como 2,3-butadienol (0,17 %), trans- β -bergamoteno (0,85 %), β -longipineno (0,12 %), y 3-decen-1-ol (0,10 %).

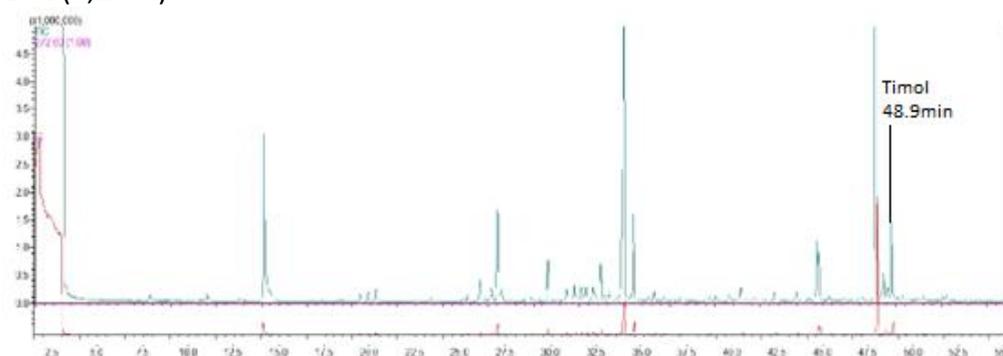


Figura 38: Superposición de cromatogramas de la variedad P3. (En rojo: P3E6. En celeste: P3E1).

Tabla 25: Compuestos mayor a 0,1% respecto al estándar interno obtenidos en muestra de extracto P3E1.

| Tiempo de retención | Nombre | %Área |
|---------------------|--|-------|
| 8.845 | β -mirceno | 0.34 |
| 10.016 | limoneno | 0.07 |
| 26.079 | 2,3-butanodiol | 0.10 |
| 26.353 | Cis-hidrato de pineno | 0.28 |
| 27.060 | linalol | 0.75 |
| 27.632 | 1,3-butanediol | 0.17 |
| 28.016 | β -cariofileno | 3.89 |
| 28.157 | trans- α -bergamoteno | 0.12 |
| 29.579 | hexanoato de etilo | 0.10 |
| 29.890 | octanoato de etilo | 0.15 |
| 30.795 | α -humuleno | 1.62 |
| 31.839 | β -trans-bergamoteno | 0.45 |
| 32.255 | α -terpineol | 0.65 |
| 32.892 | α -selineno | 0.85 |
| 33.276 | β -gurjuneno | 0.53 |
| 33.400 | biciclogermacreno | 0.33 |
| 33.710 | β -bisaboleno | 1.32 |
| 33.881 | γ -gurjuneno | 0.21 |
| 34.133 | α -bisabolol | 0.19 |
| 34.548 | cedreno | 0.17 |
| 34.982 | aromandreno | 15.06 |
| 35.128 | β -sesquifellandreno | 0.11 |
| 35.311 | citronelol | 0.11 |
| 35.510 | (Z)- α -bisaboleno | 3.05 |
| 36.329 | (E)-4-decen-1-ol | 0.15 |
| 38.093 | dec-(4Z)-en-1-ol | 0.14 |
| 41.440 | óxido de cariofileno | 0.54 |
| 42.188 | 14-hidroxi-9-epi- β -cariofileno | 0.14 |
| 43.279 | epóxido de humuleno II | 0.35 |
| 45.730 | guaiol | 1.72 |
| 47.157 | 5-epi-7-epi- α -eudesmol | 0.12 |
| 47.955 | 10-epi- γ -eudesmol | 0.10 |
| 48.107 | agarospirol | 0.12 |
| 49.746 | α -bisabolol | 3.04 |
| 50.361 | (E)-isovalencenol | 0.25 |
| 51.547 | neo intermedeol | 0.23 |
| 52.568 | 14-hidroxi-(Z)-cariofileno | 0.19 |
| 52.770 | epóxido de allo-aromandendreno | 0.22 |

Tabla 26: Compuestos mayor a 0,1% respecto al estándar interno obtenidos en muestra de extracto P3E6.

| Tiempo de retención | Nombre | %Área |
|---------------------|--|-------|
| 8.743 | β -mirceno | 0.19 |
| 26.070 | 2,3-butadienol | 0.17 |
| 26.346 | Cis-hidrato de pineno | 0.30 |
| 27.052 | linalol | 0.89 |
| 27.625 | 1,3-butanodiol | 0.35 |
| 28.012 | β -cariofileno | 4.05 |
| 28.151 | trans- α -bergamoteno | 0.18 |
| 30.791 | α -humuleno | 1.73 |
| 31.311 | γ -gurjunene | 0.10 |
| 31.832 | trans- β -bergamoteno | 0.85 |
| 32.075 | β -longipineno | 0.12 |
| 32.250 | α -terpineol | 0.68 |
| 33.270 | β -gurjunene | 0.53 |
| 33.381 | biciclogermacrene | 0.44 |
| 33.705 | β -bisabolene | 1.39 |
| 33.874 | γ -gurjunene | 0.23 |
| 34.130 | α -bisabolol | 0.23 |
| 34.550 | cedreno | 0.16 |
| 34.994 | aromandreno | 17.39 |
| 35.121 | β -sesquifellandreno | 0.12 |
| 35.306 | citronelol | 0.11 |
| 35.512 | (Z)- α -bisaboleno | 3.84 |
| 35.887 | 3-decen-1-ol | 0.10 |
| 36.326 | (E)-4-decen-1-ol | 0.16 |
| 38.085 | dec-(4Z)-en-1-ol | 0.14 |
| 41.442 | óxido de cariofileno | 0.54 |
| 42.183 | 14-hidroxi-9-epi- β -cariofileno | 0.12 |
| 43.278 | epoxido de humuleno II | 0.28 |
| 47.148 | 5-epi-7-epi- α -eudesmol | 0.17 |
| 47.949 | 10-epi- γ -eudesmol | 0.12 |
| 48.097 | agarospirol | 0.13 |
| 49.745 | α -bisabolol | 3.88 |
| 50.355 | (E)-isovalencenol | 0.19 |
| 51.531 | neo intermedeol | 0.24 |
| 52.564 | 14-hidroxi- β -cariofileno | 0.20 |
| 52.767 | epóxido de allo-aromandendreno | 0.15 |

Las muestras BBE7 ciclón 1, 2 y 3, correspondientes a las Tablas 27, 28 y 29 respectivamente, representan fracciones recolectadas a partir de una misma extracción con CO₂ supercrítico, pero con la recolección del extracto separado en tres ciclones que operaron a diferentes condiciones: 50 °C y 100 bar en el ciclón 1, 45 °C y 70 bar en el ciclón 2, y 40 °C y 55 bar en el ciclón 3. Esta diferencia en las condiciones de presión y

temperatura de recolección permitió evaluar cómo estas variables afectan la composición terpénica final del extracto, aún cuando el proceso de extracción haya sido el mismo.

Un primer aspecto a destacar es que el compuesto más abundante en las fracciones de los ciclones 1 y 2 fue aromandreno, alcanzando el 32,94 % del área en el ciclón 1 y 33,42 % en el ciclón 2. En cambio, en el ciclón 3, su proporción desciende a 9,40 %, coincidiendo con la aparición de (E,E)- α -farneseno (8,31 %), compuesto que no se detectó en los otros ciclones. Esta redistribución sugiere que una parte relevante del aromandreno se recolecta eficientemente en condiciones más altas de temperatura y presión, mientras que el descenso de estas variables en el ciclón 3 favorecería la retención de compuestos más volátiles como el farneseno.

Otro sesquiterpeno importante es β -cariofileno, que se presenta con 3,86 % en el ciclón 1 y 5,41 % en el ciclón 2, mientras que no fue detectado en la muestra del ciclón 3. Esto puede deberse a su recolección casi completa en los ciclones con mayor presión o a su escasa solubilidad en la fracción más liviana que se condensa a menor presión. De manera opuesta, limoneno, α -ylangene y varios alcoholes sesquiterpénicos menores como acetato de isolongifolol y acetato de 11-dodecin-1-ol aparecen únicamente en la fracción del ciclón 3, lo que respalda la idea de que condiciones de baja presión y temperatura favorecen la captura de componentes más volátiles y oxigenados.

En cuanto a α -bisabolol, se detecta en los tres ciclones, pero con proporciones distintas: 4,31 % en el ciclón 1, 7,23 % en el ciclón 2, y 9,23 % en el ciclón 3.

Algunos compuestos como germacreno B y (Z)- α -bisaboleno están presentes en las tres fracciones, lo que indica una distribución relativamente homogénea a lo largo del sistema de ciclones. Lo mismo ocurre con α -terpineol, que mantiene valores cercanos entre sí en todas las muestras, neo intermedeol, que también se mantiene en similares proporciones (1,03 %, 1,29 % y 1,28 % para ciclones 1, 2 y 3, respectivamente), confirmando su baja sensibilidad a las condiciones de recolección.

Al observar el contenido total de compuestos oxigenados, se destaca que el ciclón 3 presenta una mayor proporción relativa de estos, incluyendo alcoholes sesquiterpénicos como (E)-nerolidol (2,80 %), óxido de cariofileno (1,06 %), epóxido de humuleno II (0,72 %) y derivados oxigenados diversos como Germacreno D-4-ol y pachulano. Este enriquecimiento en fracciones oxigenadas está en línea con lo esperado al disminuir la presión y temperatura del ciclón, ya que las fracciones más volátiles y oxigenadas tienden a arrastrarse a los últimos ciclones por su menor peso.

Además el perfil del ciclón 3 también muestra una mayor diversidad, revelando compuestos que no aparecen en los otros dos, entre ellos varios acetatos y alcoholes con bajo porcentaje relativo. Esta diversidad química, sumada a la presencia de compuestos ausentes en los otros ciclones, convierte a la fracción del ciclón 3 en un reservorio de terpenos más volátiles y oxigenados que pueden aportar valor diferencial dependiendo del destino del extracto.

Este análisis descriptivo demuestra que a pesar de provenir de la misma extracción, las condiciones de separación en los ciclones modularon el perfil químico de cada fracción. El ciclón 1 concentró la mayor proporción de aromandreno y otros sesquiterpenos principales, el ciclón 2 enriqueció aún más esa fracción junto con altos niveles de α -bisabolol, y el ciclón 3 aportó una fracción más liviana, rica en alcoholes y terpenos oxigenados, ampliando así la diversidad general del extracto. Estos resultados permiten considerar estrategias de fraccionamiento posterior basadas en el destino del extracto.

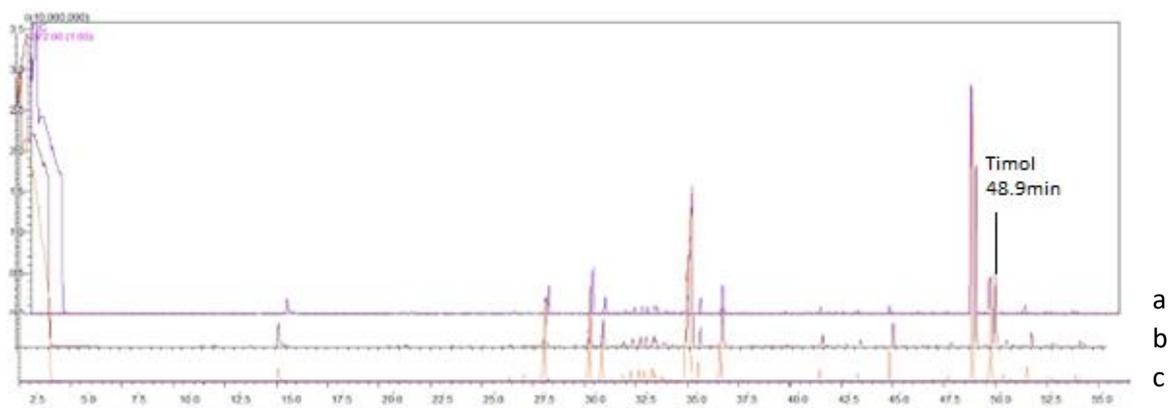


Figura 39: Superposición de cromatogramas de la variedad BB condiciones suaves. a- BBE7 ciclón1, b-BBE7 ciclón2, c-BBE7 ciclón3.

Tabla 27: Compuestos mayor a 0,1% respecto al estándar interno obtenidos en muestra de extracto BBE7 ciclón 1.

| Tiempo de retención | Nombre | %Área |
|---------------------|---|-------|
| 26.343 | β -longipineno | 0.21 |
| 27.040 | linalol | 0.10 |
| 28.028 | β -cariofileno | 3.86 |
| 30.825 | α -humuleno | 2.13 |
| 31.317 | γ -gurjuneno | 0.11 |
| 32.251 | α -terpineol | 0.68 |
| 32.642 | β -selineno | 0.83 |
| 32.905 | α -selineno | 1.00 |
| 33.289 | espatulenol | 1.70 |
| 33.722 | β -bisaboleno | 0.38 |
| 33.895 | α -gurjuneno | 0.35 |
| 35.112 | aromandreno | 32.94 |
| 35.525 | α -(Z)-bisaboleno | 1.77 |
| 36.597 | germacreno B | 4.00 |
| 37.689 | β -atlantol | 0.13 |
| 41.287 | γ -vetiveneno | 0.14 |
| 41.442 | óxido de cariofileno | 0.78 |
| 42.187 | 14-hidroxi-9-epi- β -cariofileno | 0.13 |
| 42.536 | aromadendreno | 0.34 |
| 43.133 | acetato de pachuli | 0.14 |
| 43.280 | epóxido de humuleno II | 0.50 |
| 44.838 | (E)-nerolidol | 0.95 |
| 46.962 | α -copaen-11-ol | 0.17 |
| 47.554 | fitona | 0.12 |
| 47.701 | selin-11-es-4- α -ol | 0.28 |
| 49.332 | Eudesmol | 0.14 |
| 49.567 | Allo-hedicariol | 0.23 |
| 49.764 | α -bisabolol | 4.31 |
| 50.352 | isovalencenol | 0.50 |
| 50.653 | selina-3,11-dien-6- α -ol | 0.10 |
| 51.532 | neo intermedeol | 1.03 |
| 52.562 | pachulano | 0.26 |
| 52.771 | β -acoredienol | 0.26 |
| 53.888 | espatulenol | 0.46 |
| 56.505 | germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol | 0.16 |

Tabla 28: Compuestos mayor a 0,1% respecto al estándar interno obtenidos en muestra de extracto BBE7 ciclón 2.

| Tiempo de retención | Nombre | %Área |
|---------------------|---|-------|
| 26.352 | β -longipineno | 0.25 |
| 27.054 | linalol | 0.14 |
| 28.066 | β -cariofileno | 5.41 |
| 29.514 | β -elemeno | 0.12 |
| 30.848 | α -humuleno | 2.64 |
| 31.336 | γ -gurjunene | 0.12 |
| 31.855 | trans- β -bergamoteno | 0.62 |
| 32.259 | α -terpineol | 0.59 |
| 32.658 | B-selinene | 0.91 |
| 32.919 | α -selinene | 1.09 |
| 33.308 | espatulenol | 1.73 |
| 33.741 | β -bisaboleno | 0.39 |
| 33.907 | α -gurjunene | 0.36 |
| 35.149 | aromandreno | 33.42 |
| 35.548 | (Z)- α -bisaboleno | 1.74 |
| 36.627 | germacreno B | 4.30 |
| 37.696 | β -atlantol | 0.13 |
| 41.461 | óxido de cariofileno | 1.03 |
| 42.197 | 14-hidroxi-9-epi- β -cariofileno | 0.16 |
| 42.556 | aromadendreno | 0.31 |
| 43.286 | epóxido de humuleno II | 0.51 |
| 44.393 | acetato de 11-dodecin-1-ol | 0.11 |
| 44.853 | (E)-nerolidol | 2.00 |
| 46.968 | α -copaen-11-ol | 0.20 |
| 47.567 | fitona | 0.25 |
| 47.711 | selin-11-es-4- α -ol | 0.40 |
| 48.188 | germacrene D-4-ol | 0.15 |
| 49.334 | α -eudesmol | 0.19 |
| 49.567 | allo-hedicariol | 0.32 |
| 49.794 | α -bisabolol | 7.23 |
| 50.365 | (E)-isovalencenol | 0.60 |
| 50.662 | selina-3,11-dien-6- α -ol | 0.26 |
| 51.179 | epóxido de allo-aromandendreno | 0.11 |
| 51.543 | neo intermedeol | 1.29 |
| 52.567 | pachulano | 0.42 |
| 52.771 | acoredienol | 0.32 |
| 53.892 | espatulenol | 0.58 |
| 56.513 | germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol | 0.16 |

Tabla 29: Compuestos mayor a 0,1% respecto al estándar interno obtenidos en muestra de extracto BBE7 ciclón 3.

| Tiempo de retención | Nombre | %Área |
|---------------------|---|-------|
| 9.894 | limoneno | 0.11 |
| 23.548 | α -ylangene | 0.12 |
| 26.343 | β -longipineno | 0.45 |
| 27.052 | linalol | 0.52 |
| 28.096 | β -cariofileno | 9.16 |
| 30.856 | α -humuleno | 3.62 |
| 31.330 | γ -gurjunene | 0.14 |
| 31.857 | trans- β -bergamoteno | 0.61 |
| 32.266 | α -terpineol | 0.99 |
| 32.660 | β -selinene | 1.02 |
| 32.926 | α -selinene | 1.36 |
| 33.306 | espatulenol | 1.73 |
| 33.906 | α -gurjunene | 0.39 |
| 34.962 | (E,E)- α -farneseno | 8.31 |
| 35.131 | aromandreno | 9.40 |
| 35.541 | α -(Z)-bisaboleno | 1.57 |
| 36.619 | germacreno B | 3.78 |
| 37.696 | β -atlantol | 0.14 |
| 41.455 | óxido de cariofileno | 1.06 |
| 42.199 | 14-hidroxi-9-epi- β -cariofileno | 0.18 |
| 42.564 | aromadendreno | 0.31 |
| 43.295 | epóxido de humuleno II | 0.72 |
| 44.401 | acetato de 11-dodecin-1-ol | 0.13 |
| 44.861 | (E)-nerolidol | 2.80 |
| 46.975 | α -copaen-11-ol | 0.24 |
| 47.582 | fitona | 0.32 |
| 47.717 | selin-11-es-4- α -ol | 0.45 |
| 48.198 | Germacreno D-4-ol | 0.18 |
| 49.343 | A-eudesmol | 0.19 |
| 49.583 | Allo-hedicariol | 0.39 |
| 49.808 | α -bisabolol | 9.23 |
| 50.228 | acetato de isolongifolol | 0.10 |
| 50.379 | (E)-isovalencenol | 0.84 |
| 50.677 | selina-3,11-dien-6- α -ol | 0.36 |
| 51.184 | epóxido de allo-aromandendreno | 0.14 |
| 51.548 | neo intermedeol | 1.28 |
| 52.575 | pachulano | 0.47 |
| 52.779 | β -acoredienol | 0.44 |
| 53.893 | espatulenol | 0.60 |
| 56.511 | germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol | 0.15 |

7.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El presente estudio permitió evaluar comparativamente tres metodologías de extracción, maceración etanólica, extracción con CO₂ supercrítico (SFE) y extracción con líquidos presurizados (PLE) aplicadas a inflorescencias de dos variedades de *Cannabis sativa* (BB y P3), con el objetivo de identificar condiciones óptimas de recuperación de cannabinoides y caracterizar el perfil fitoquímico de los extractos. El abordaje combinó el análisis cuantitativo de cannabinoides mediante HPLC-DAD, el perfil de volátiles por GC-MS y la aplicación de modelos de superficie de respuesta (RSM), generando una base de datos que permite interpretar tendencias y definir hipótesis para trabajos futuros.

En términos de rendimiento extractivo, PLE demostró la mayor capacidad de recuperación, alcanzando un 44,08 % para la variedad BB bajo condiciones de 80 °C, presión de 100 bar y una mezcla etanol/agua 60:40, y un 42,77 % para la variedad P3 utilizando etanol absoluto (100 %) a la misma presión y temperatura. Estos valores representaron los máximos dentro de los rangos ensayados.

Ambos rendimientos superaron a los obtenidos mediante maceración etanólica (18,6 %), realizada con etanol 95° a temperatura ambiente durante 40 segundos, y también a los alcanzados por extracción con CO₂ supercrítico, cuyo mejor resultado para la variedad BB fue de 18,69 % (60 °C, 380 bar) y para P3 alcanzó los 15 % bajo las mismas condiciones operativas.

Sin embargo, estas diferencias deben interpretarse con cautela debido a la ausencia de replicación sistemática, lo que limita la validez estadística de las comparaciones directas entre métodos.

La composición química de los extractos evidenció la influencia de las condiciones de extracción sobre la proporción de cannabinoides ácidos y neutros. La maceración etanólica se destacó por preservar los fitocannabinoides en su forma ácida, especialmente THCA y CBDA mientras que las condiciones térmicas de SFE y PLE favorecieron la descarboxilación parcial o total hacia THC y CBD. PLE mostró una gran versatilidad, permitiendo tanto la preservación de formas ácidas bajo las condiciones más bajas de temperatura utilizadas en este trabajo (80 °C) como la obtención de extractos descarboxilados bajo temperaturas más altas (140 °C).

Para la variedad BB el valor más alto de THCA se alcanzó mediante maceración etanólica (69,97 %), mientras que el mayor contenido de THC se obtuvo en la muestra BBEX6 (PLE, 140 °C, etanol absoluto), con 40,53 %. Finalmente, la muestra BBE7BIS (SFE Luego de la extracción BBE7, al mismo material vegetal se le realizó otra extracción en las siguientes condiciones: Rampa de presión descendente en 10 bar, comenzando en 350 bar y finalizando en 300 bar, en 6 etapas de 20 min. a 50°C) presentó el THCTotal más alto del estudio, con 71,20 %, Excluyendo la muestra BBE7BIS debido a que fue un caso particular el segundo valor más alto de THCTotal dentro de la variedad BB se obtuvo mediante PLE, alcanzando un 45,55 % en la muestra BBEX2, extraída a 110 °C con etanol absoluto y 100 bar de presión.

Para la variedad P3, el valor más alto de THC se obtuvo mediante extracción con CO₂ supercrítico (SFE), alcanzando un 14,28 % en la muestra P3E6, bajo condiciones de 60 °C y 380 bar. En cuanto al THCA, la mayor concentración fue registrada en la muestra P3 Maceración 2, alcanzando un 19,02 %, reflejando una excelente preservación de la

forma ácida bajo condiciones suaves de temperatura ambiente y etanol como único solvente. Por su parte, el mayor valor de THCtotal se observó en una condición de SFE alcanzando un 21,12 %. Estos resultados reafirman que la elección del método debe estar orientada según el objetivo deseado, SFE se destaca para maximizar THC y THCtotal, mientras que la maceración es superior para conservar THCA.

Respecto a los perfiles terpénicos, el análisis por GC-MS reveló que las condiciones de extracción más suaves (menor presión y temperatura, como en BBE1 o P3E1) preservaron una mayor diversidad de terpenos, incluidos monoterpenos y compuestos oxigenados. Las fracciones obtenidas mediante ciclones en SFE demostraron que la separación en distintos puntos del sistema puede aprovecharse para enriquecer el extracto final con compuestos de interés específicos, dependiendo de su volatilidad y polaridad.

Desde un enfoque crítico, las principales debilidades del trabajo radican en la falta de replicación experimental, lo cual impide aplicar análisis estadísticos robustos a todas las condiciones. Esta limitación no invalida los resultados, sino que subraya la necesidad de avanzar hacia estudios con mayor representatividad y poder estadístico, que permitan confirmar las tendencias observadas y expandir la aplicabilidad de los resultados.

A pesar de estas limitaciones, el trabajo sienta bases metodológicas y genera hipótesis fundadas para futuras investigaciones. Se propone como líneas de trabajo a desarrollar la aplicación sistemática de réplicas por condición, el estudio de la cinética de descarboxilación durante los procesos extractivos, y la exploración de cálculos de rendimientos máxicos y selectividad para cada cannabinoide, realizando balances de masas y cálculo de eficiencias de extracción. Se destaca el potencial de combinar estrategias de fraccionamiento como los ciclones en SFE o variaciones de polaridad en PLE para obtener extractos dirigidos a usos específicos (farmacéuticos, alimentarios, cosméticos).

Por último, el presente estudio no solo aporta datos valiosos sobre condiciones óptimas de extracción y composición de extractos de *Cannabis sativa*, sino que ofrece una visión crítica y estratégica sobre las capacidades y limitaciones de cada técnica. Constituye así un punto de partida para el desarrollo de procesos más eficientes, reproducibles y ajustables a objetivos terapéuticos o tecnológicos concretos, con miras a la consolidación de metodologías basadas en evidencia dentro del campo de la fitotecnología y la investigación aplicada en cannabis medicinal.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- 1- Clarke R, Merlin M. *Cannabis: Evolution and Ethnobotany*. Berkeley (CA): University of California Press; 2013. <https://doi.org/10.1525/9780520954571>.
- 2-ElSohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci*. 2005;78(5):539-48. doi:10.1016/j.lfs.2005.09.011.
- 3-Hanuš LO, Meyer SM, Muñoz E, Taglialatela-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat Prod Rep*. 2016;33(12):1357-92. doi:10.1039/c6np00074f.
- 4-Radwan MM, ElSohly MA, Slade D, Ahmed SA, Khan IA, Ross SA. Biologically active cannabinoids from high-potency *Cannabis sativa*. *J Nat Prod*. 2009;72(5):906-11. doi:10.1021/np900067k.
- 5-Aizpurua-Olaizola O, Soydaner U, Öztürk E, Schibano D, Simsir Y, Navarro P, et al. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes. *J Nat Prod*. 2016;79(2):324-31. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00949.
- 6-Jones PG, Falvello L, Kennard O, Sheldrick GM, Mechoulam R. Cannabidiol. *Acta Crystallogr B*. 1977;33:3211-4. doi:10.1107/S0567740877010577.
- 7-Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Denovan-Wright EM. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol*. 2015;172(20):4790-805. doi:10.1111/bph.13250.
- 8-Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*. 2007;150(5):613-23. doi:10.1038/sj.bjp.0707133.
- 9-Garrett ER, Hunt CA. Physicochemical properties, solubility, and protein binding of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci*. 1974;63(7):1056-64. doi:10.1002/jps.2600630705.
- 10-Elphick MR, Egertova M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356(1407):381-408. doi:10.1098/rstb.2000.0787.
- 11-Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol*. 2011;163(7):1344-64. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x.

- 12-Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Front Plant Sci.* 2016;7:19. doi:10.3389/fpls.2016.00019.
- 13-Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc.* 1964;86(8):1646-7. doi:10.1021/ja01062a046.
- 14-Pate D. Chemical ecology of Cannabis. *J Int Hemp Assoc.* 1994;2(1):32-7.
- 15-Flores-Sanchez IJ, Verpoorte R. Secondary metabolism in *Cannabis*. *Phytochem Rev.* 2008;7(3):615-39. doi:10.1007/s11101-008-9094-4.
- 16-Mechoulam R, Parker LA. The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol.* 2013;64:21-47. doi:10.1146/annurev-psych-113011-143739.
- 17-Díaz Laviada I. Sistema cannabinoide endógeno: aspectos bioquímicos e implicación fisiológica. In: Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides, editor. *Actualización sobre el potencial terapéutico de los cannabinoides*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2009. p. 9-27.
- 18-Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66(2-3):101-21. doi:10.1054/plaf.2001.0341.
- 19-Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol.* 2002;42(S1):11S-19S. doi:10.1002/j.1552-4604.2002.tb05998.x.
- 20-Raharjo TJ, Chang WT, Choi YH, Peltenburg-Looman AM, Verpoorte R. Olivetol as product of a polyketide synthase in *Cannabis sativa* L. *Plant Sci.* 2004;166(2):381-5. doi:10.1016/j.plantsci.2003.09.027.
- 21-Sirikantaramas S, Taura F, Morimoto S, Shoyama Y. Recent advances in *Cannabis sativa* research: biosynthetic studies and its potential in biotechnology. *Curr Pharm Biotechnol.* 2007;8(4):237-43. doi:10.2174/138920107781387456.
- 22-Fellermeier M, Zenk MH. Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Lett.* 1998;427(2):283-5. doi:10.1016/s0014-5793(98)00450-5.
- 23-Glivar T, Eržen J, Kreft S, Zagožen M, Čerenak A, Čeh B, et al. Cannabinoid content in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties grown in Slovenia. *Ind Crops Prod.* 2020;145:112082. doi:10.1016/j.indcrop.2019.112082.
- 24-Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(4):327-60. doi:10.2165/00003088-200342040-00003.

- 25-Koltai H, Poulin P, Namdar D. Promoting cannabis products to pharmaceutical drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2019;132:118-20. doi:10.1016/j.ejps.2019.02.027.
- 26-Ternelli M, Brighenti V, Anceschi L, Poto M, Bertelli D, Licata M, et al. Innovative methods for the preparation of medical Cannabis oils with a high content in both cannabinoids and terpenes. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;186:113296. doi:10.1016/j.jpba.2020.113296.
- 27-Lewis MA, Russo EB, Smith KM. Pharmacological foundations of cannabis chemovars. *Planta Med.* 2018;84(4):225-33. doi:10.1055/s-0043-122240.
- 28-Booth JK, Bohlmann J. Terpenes in *Cannabis sativa* – from plant genome to humans. *Plant Sci.* 2019;284:67-72. doi:10.1016/j.plantsci.2019.03.022.
- 29-Gilbert AN, Di Verdi JA. Consumer perceptions of strain differences in cannabis aroma. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192247. doi:10.1371/journal.pone.0192247.
- 30-Brenneisen R. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. In: ElSohly MA, editor. *Marijuana and the Cannabinoids*. Totowa (NJ): Humana Press; 2007. p. 17-49. doi:10.1007/978-1-59259-947-9_2.
- 31-Fischedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry.* 2010;71(17-18):2058-73. doi:10.1016/j.phytochem.2010.10.001.
- 32-Abdollahi M, Sefidkon F, Calagari M, Mousavi A, Mahomoodally MF. Impact of four hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties and stage of plant growth on yield and composition of essential oils. *Ind Crops Prod.* 2020;155:112793. doi:10.1016/j.indcrop.2020.112793.
- 33-Naim-Feil E, Elkins AC, Malmberg MM, Ram D, Tran J, Spangenberg GC, et al. The cannabis plant as a complex system: interrelationships between cannabinoid compositions, morphological, physiological and phenological traits. *Plants.* 2023;12(3):493. doi:10.3390/plants12030493.
- 34-Barba FJ, Zhu Z, Koubaa M, Sant'Ana AS, Orlie V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: a review. *Trends Food Sci Technol.* 2016;49:96-109. doi:10.1016/j.tifs.2016.01.006.
- 35-Grijó DR, Bidoia DL, Nakamura CV, Osorio IV, Cardozo-Filho L. Analysis of the antitumor activity of bioactive compounds of cannabis flowers extracted by green solvents. *J Supercrit Fluids.* 2019;149:20-5. doi:10.1016/j.supflu.2019.03.012.
- 36-Fernandez S, Carreras T, Castro R, Perelmutter K, Giorgi V, Vila A, et al. A comparative study of supercritical fluid and ethanol extracts of cannabis inflorescences: chemical

profile and biological activity. *J Supercrit Fluids*. 2021;179:105385.
doi:10.1016/j.supflu.2021.105385.

37-Ribeiro Grijó D, Vieitez Osorio IA, Cardozo-Filho L. Supercritical extraction strategies using CO₂ and ethanol to obtain cannabinoid compounds from cannabis hybrid flowers. *J CO₂ Util*. 2019;28:174-80. doi:10.1016/j.jcou.2018.12.014.

38-Rovetto LJ, Aieta NV. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *J Supercrit Fluids*. 2017;129:16-27. doi:10.1016/j.supflu.2017.03.014.

39-Serna-Loaiza S, Adamczyk J, Beisl S, Kornpointner C, Halbwirth H, Friedl A. Pressurized liquid extraction of cannabinoids from hemp processing residues: evaluation of the influencing variables. *Processes*. 2020;8(11):1334.
doi:10.3390/pr8111334.

40-Omar J, Olivares M, Alzaga M, Etxebarria N. Optimisation and characterisation of marijuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS. *J Sep Sci*. 2013;36(8):1397-404.
doi:10.1002/jssc.201201103.

41-Grand View Research. Cannabis extract market analysis. *Grand View Research* [Internet]. [citado 2025 Abr 15]. Disponible en:
<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/cannabis-extract-market>.

42-Herrero M, Castro-Puyana M, Mendiola JA, Ibañez E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends Anal Chem*. 2013;43:67-83.
doi:10.1016/j.trac.2012.12.008.

43-Reverchon E, De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J Supercrit Fluids*. 2006;38(2):146-66. doi:10.1016/j.supflu.2006.03.020.

44-Perrotin-Brunel H, Kroon MC, van Roosmalen MJE, van Spronsen J, Peters CJ, Witkamp GJ. Solubility of non-psychoactive cannabinoids in supercritical carbon dioxide and comparison with psychoactive cannabinoids. *J Supercrit Fluids*. 2010;55(2):603-8. doi:10.1016/j.supflu.2010.09.011.

45-Perrotin-Brunel H, Cabeza Perez P, van Roosmalen MJE, van Spronsen J, Witkamp GJ, Peters CJ. Solubility of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in supercritical carbon dioxide: experiments and modeling. *J Supercrit Fluids*. 2010;52(1):6-10.
doi:10.1016/j.supflu.2009.12.001.

46-Mechoulam R, Gaoni Y. Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschr Chem Org Naturst*. 1967;25:175-213. doi:10.1007/978-3-7091-8164-5_6.

- 47-Andreu V, Picó Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. *TrAC Trends Anal Chem.* 2019;118:709-21. doi:10.1016/j.trac.2019.06.038.
- 48-Garde-Cerdán T, Gutiérrez-Gamboa G, Baroja E, Rubio-Bretón P, Pérez-Álvarez EP. Influence of methyl jasmonate foliar application to vineyard on grape volatile composition over three consecutive vintages. *Food Res Int.* 2018;112:274-87. doi:10.1016/j.foodres.2018.06.048.
- 49-Dellacassa E, Trenchs O, Fariña L, Debernardis F, Perez G, Boido E, et al. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) wine production in Angola: characterisation of volatile aroma compounds and yeast native flora. *Int J Food Microbiol.* 2017;241:161-7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.014.
- 50-McLafferty FW, Stauffer DB, Loh SY. Comparative evaluations of mass spectral data bases. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1991;2(5):438-40. doi:10.1016/1044-0305(91)85011-T.
- 51-American Herbal Pharmacopoeia. *Cannabis inflorescence: Standards of identity, analysis, and quality control.* Scotts Valley (CA): U.S. Herbal Pharmacopoeia; 2014.
- 52-Moreno-Sanz G, Ferreiro Vera C, Sánchez-Carnerero C, Nadal Roura X, Sánchez de Medina Baena V. Biological activity of *Cannabis sativa* L. extracts critically depends on solvent polarity and decarboxylation. *Separations.* 2020;7(4):56. doi:10.3390/separations7040056.

9.-ANEXOS

Anexo 1: Flores trimeadas variedad BB.



Anexo 2: variedad P3 embolsada al vacío.



Anexo 3: Flores variedad P3



Anexo 4: Balanza de humedad Sartorius MA37



Anexo 5: HPLC Shimadzu- LC-2050C 3D



Anexo 6: Congelador de almacenamiento de flores y extractos.



Anexo 7: Embudo Büchner para filtración de extractos.



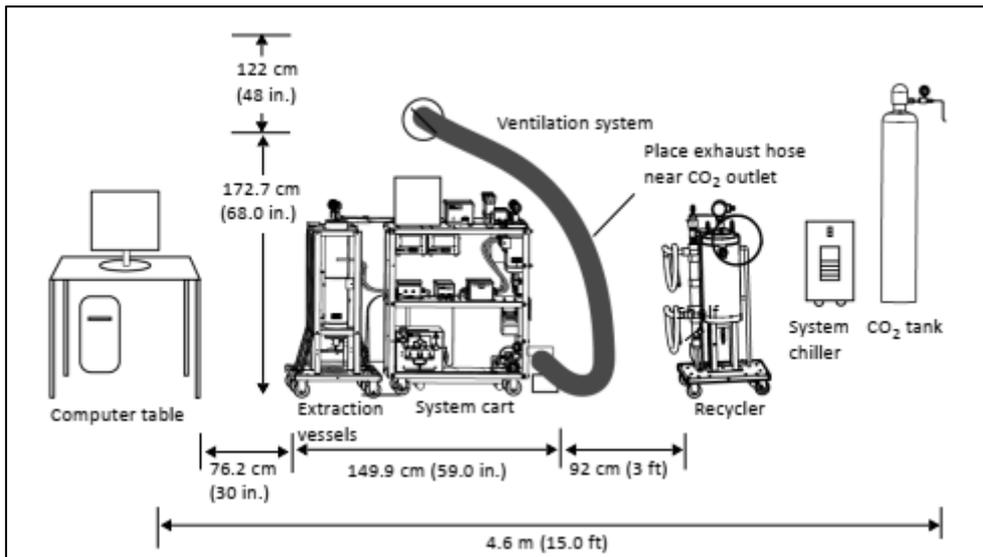
Anexo 8: Büchi- Rotavapor® R-3



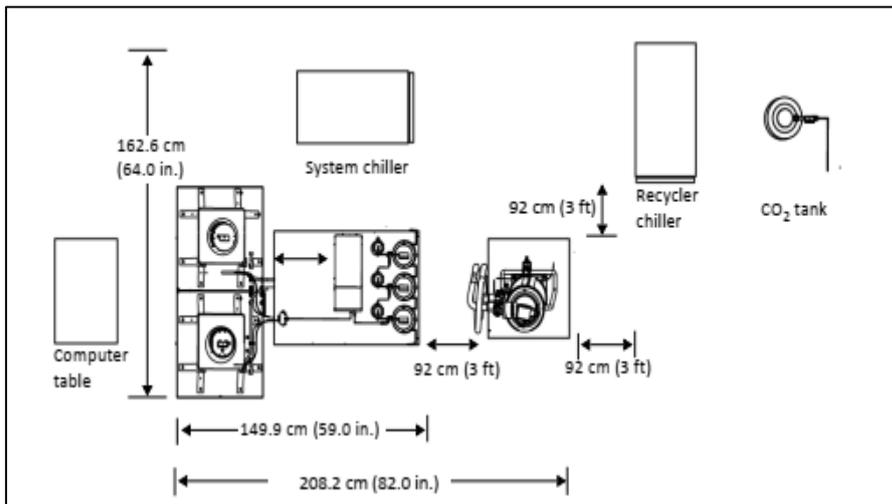
Anexo 9: BBES, foto del equipo donde se observan los 3 ciclones de recolección y las 2 columnas de extracción



Anexo 10: BBES, vista frontal.



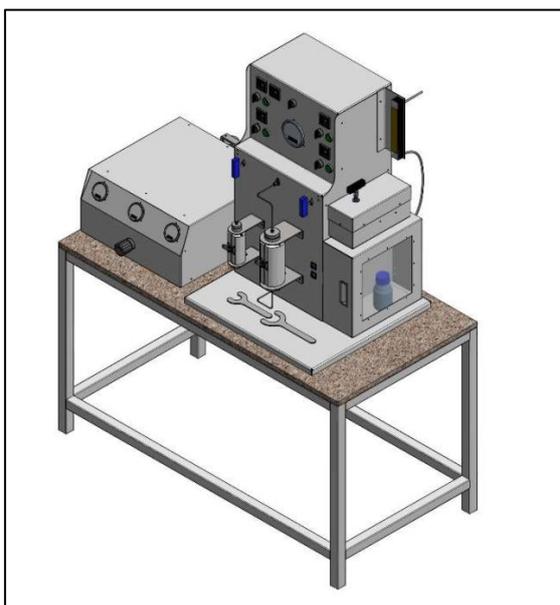
Anexo 11: BBES, vista de arriba.



Anexo 12: Rotavapor WEV1010



Anexo 13: PD-Basic-2213



Anexo 14: test-T para las muestras independientes en los rendimientos entre las variedades BB y P3.

! Results do not use current data.

Descriptive Statistics: Rendimiento

| Variedad de planta | N | Mean | StDev | SE Mean |
|--------------------|---|--------|-------|---------|
| BB | 2 | 18.630 | 0.467 | 0.33 |
| P3 | 2 | 18.615 | 0.148 | 0.10 |

Estimation for Difference

| Difference | 95% CI for Difference |
|------------|-----------------------|
| 0.015 | (-4.385, 4.415) |

Test

Null hypothesis $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$
 Alternative hypothesis $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

| T-Value | DF | P-Value |
|---------|----|---------|
| 0.04 | 1 | 0.972 |

Anexo 15: Test de Grubbs para identificar valores atípicos en rendimientos de PLE para la variedad BB.

Grubbs' Test

| Variable | Genetica | N | Mean | StDev | Min | Max | G | P |
|--------------|----------|---|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| Rendimientos | BB | 3 | 35.74 | 1.82 | 33.64 | 36.90 | 1.15 | 0.110 |

Anexo 16: Test de Grubbs para identificar valores atípicos en rendimientos de PLE para la variedad P3.

| Variable | Geneticas | N | Mean | StDev | Min | Max | G | P |
|-----------------|-----------|---|--------|-------|--------|--------|------|-------|
| Rendimientos P3 | P3 | 3 | 34.360 | 1.186 | 33.090 | 35.440 | 1.07 | 0.734 |

Anexo 17: Estadística descriptiva para calcular el coeficiente de variación para concentración de THCA obtenido por maceración etanólica para la variedad BB.

WORKSHEET 1

Descriptive Statistics: Contenido THCA

Statistics

| Variable | N | N* | Mean | SE Mean | StDev | Minimum | Q1 | Median | Q3 | Maximum |
|----------------|---|----|--------|---------|-------|---------|----|--------|----|---------|
| Contenido THCA | 2 | 0 | 69.295 | 0.675 | 0.955 | 68.620 | * | 69.295 | * | 69.970 |

Anexo 18: Estadística descriptiva para calcular el coeficiente de variación para concentración de THC obtenido por maceración etanólica para la variedad BB.

WORKSHEET 1

Descriptive Statistics: Contenido

Statistics

| Variable | N | N* | Mean | SE Mean | StDev | Minimum | Q1 | Median | Q3 | Maximum |
|-----------|---|----|-------|---------|-------|---------|----|--------|----|---------|
| Contenido | 2 | 0 | 3.760 | 0.800 | 1.131 | 2.960 | * | 3.760 | * | 4.560 |

Anexo 19: Estadística descriptiva para calcular el coeficiente de variación para concentración de CBDA obtenido por maceración etanólica para la variedad P3.

Descriptive Statistics: Contenido de CBDA genetica P3

Statistics

| Variable | N | N* | Mean | SE Mean | StDev | Minimum | Q1 | Median | Q3 | Maximum |
|----------|---|----|--------|---------|--------|---------|----|--------|----|---------|
| CBDA | 2 | 0 | 37.405 | 0.0350 | 0.0495 | 37.370 | * | 37.405 | * | 37.440 |

Anexo 20: Estadística descriptiva para calcular el coeficiente de variación para concentración de CBD obtenido por maceración etanólica para la variedad P3.

Descriptive Statistics: Contenido de CBD genetica P3

Statistics

| Variable | N | N* | Mean | SE Mean | StDev | Minimum | Q1 | Median | Q3 | Maximum |
|----------|---|----|--------|---------|--------|---------|----|--------|----|---------|
| CBD | 2 | 0 | 2.1650 | 0.0850 | 0.1202 | 2.0800 | * | 2.1650 | * | 2.2500 |

Anexo 21: Estadística descriptiva para calcular el coeficiente de variación para concentración de CBDtotal obtenido por maceración etanólica para la variedad P3.

Descriptive Statistics: Contenido de CBDtotal genetica P3

Statistics

| Variable | N | N* | Mean | SE Mean | StDev | Minimum | Q1 | Median | Q3 | Maximum |
|----------|---|----|--------|---------|-------|---------|----|--------|----|---------|
| CBDtotal | 2 | 0 | 34.970 | 0.120 | 0.170 | 34.850 | * | 34.970 | * | 35.090 |

Anexo 22: Estadística descriptiva para calcular el coeficiente de variación para concentración de THCA obtenido por maceración etanólica para la variedad P3.

| Descriptive Statistics: Contenido de THCA genetica P3 | | | | | | | | | | |
|---|---|----|--------|---------|---------|---------|----|--------|----|---------|
| Statistics | | | | | | | | | | |
| Variable | N | N* | Mean | SE Mean | StDev | Minimum | Q1 | Median | Q3 | Maximum |
| THCA | 2 | 0 | 19.015 | 0.00500 | 0.00707 | 19.010 | * | 19.015 | * | 19.020 |

Anexo 23: Estadística descriptiva para calcular el coeficiente de variación para concentración de THC obtenido por maceración etanólica para la variedad P3.

| Descriptive Statistics: Contenido de THC genetica P3 | | | | | | | | | | |
|--|---|----|--------|---------|--------|---------|----|--------|----|---------|
| Statistics | | | | | | | | | | |
| Variable | N | N* | Mean | SE Mean | StDev | Minimum | Q1 | Median | Q3 | Maximum |
| THC | 2 | 0 | 2.3900 | 0.0800 | 0.1131 | 2.3100 | * | 2.3900 | * | 2.4700 |

Anexo 24: Estadística descriptiva para calcular el coeficiente de variación para concentración de THCtotal obtenido por maceración etanólica para la variedad P3.

| Descriptive Statistics: Contenido de THCtotal genetica P3 | | | | | | | | | | |
|---|---|----|--------|---------|-------|---------|----|--------|----|---------|
| Statistics | | | | | | | | | | |
| Variable | N | N* | Mean | SE Mean | StDev | Minimum | Q1 | Median | Q3 | Maximum |
| THCtotal | 2 | 0 | 19.060 | 0.0800 | 0.113 | 18.980 | * | 19.060 | * | 19.140 |