

DOI: <https://doi.org/10.18359/rcin.6588>



Extracción verde y eficiente de cannabidiol, tetrahidrocannabinol, cannabinol y cannabigerol de Cannabis sativa empleando disolventes eutécticos profundos naturales basados en mentol*

Jhan Carlos Delgado Rodríguez^a ■ Paola Andrea Arango Romero^b

■ Ricardo Benítez Benítez^c

a sus propiedades medicinales y aplicaciones industriales. Por ello, se han desarrollado múltiples técnicas de extracción y producción de derivados; pero es necesario desarrollar nuevas metodologías verdes y más eficientes para la obtención de fitocannabinoides y producción de preparados de cannabis. Los disolventes eutécticos profundos son disolventes verdes, seguros y versátiles para conseguir metabolitos del cannabis. En esta investigación se prepararon diecinueve disolventes eutécticos profundos de baja viscosidad basados en mentol, β -sitosterol y ácidos grasos, que fueron más eficientes para extraer fitocannabinoides por extracción asistida por ultrasonido en comparación con el etanol. El disolvente Mentol:Ácido octanoico 3:1 presentó el mayor rendimiento de extracción (32.42 %), mediante el ultrasonido empleando un diseño factorial 23 con el que se encontraron las siguientes condiciones óptimas: tiempo de 60 minutos, %DES de 100 % y una relación Cannabis:DES 1:20. Este estudio presenta una extracción verde y eficiente de fitocannabinoides de interés industrial, medicinal o cosmético y se convierte en una alternativa a las técnicas convencionales para la preparación de derivados del cannabis; el proceso es novedoso, optimizable y tiene gran potencial para establecer procesos a escala industrial.

Palabras clave: cannabis; análisis cromatográfico; innovación científica; propagación de ondas acústicas; optimización

Recibido: 14/12/2022

Aceptado: 30/03/2023

Disponible en línea: 07/07/2023

Cómo citar: J. C. Delgado Rodríguez, P. A. Arango Romero, y R. Benítez Benítez, «Extracción verde y eficiente de cannabidiol, tetrahidrocannabinol, cannabinol y cannabigerol de Cannabis sativa empleando disolventes eutécticos profundos naturales basados en mentol», Cien.Ing.Neogranadina, vol. 33, n.º 1, pp. 87-104, jun 2023.

* Artículo de investigación

^a Químico. Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.

Correo electrónico: jhandelg@unicauca.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2013-448X>

^b Química, Doctora en Ciencias-Química. Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.

Correo electrónico: parango@unicauca.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2156-8757>

^c Licenciado en Educación, Biología y Química, Doctor en enzimología. Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

Correo electrónico: rbenitez@unicauca.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8999-3680>

Efficient Green Extraction of Cannabidiol, Tetrahydrocannabinol, Cannabinol, and Cannabigerol from Cannabis Sativa using Menthol-Based Natural Deep Eutectic Solvents

Abstract: the national and worldwide interest in cannabis has increased in recent years due to its medicinal properties and industrial applications. Therefore, multiple techniques for extracting and producing derivatives have been developed. Still, it is necessary to develop new, green, more efficient methodologies for obtaining phytocannabinoids and making cannabis preparations. Deep eutectic solvents are green, safe, and versatile solvents to obtain cannabis metabolites. This research prepared nineteen low-viscosity deep eutectic solvents based on menthol, β -sitosterol, and fatty acids, which were more efficient in extracting phytocannabinoids by ultrasound-assisted extraction than ethanol. The solvent Menthol: Octanoic acid 3:1 presented the highest extraction yield (32.42 %) by ultrasound employing a 23 factorial design with which the following optimal conditions were found: time of 60 minutes, %DES of 100 %, and a Cannabis: DES ratio 1:20. This study presents a green and efficient extraction of phytocannabinoids of industrial, medicinal or cosmetic interest and becomes an alternative to conventional techniques for the preparation of cannabis derivatives; the process is novel, optimizable and has great potential to establish industrial scale processes.

Keywords: cannabis; chromatographic analysis; scientific innovation; acoustic wave propagation; optimization.

Introducción

La planta *Cannabis sativa* presenta una composición química diversa. Dentro de los compuestos más importantes se encuentran terpenos/terpenoides y los fitocannabinoides [1], que son los metabolitos que más se han aislado y estudiado, tanto su estructura como su actividad biológica. Usualmente se hallan en mayor concentración en las variedades de cannabis. Los más estudiados son el tetrahidrocannabinol (**THC**), ácido tetrahidrocannabinólico (**THCA**), cannabidiol (**CBD**), ácido cannabidiólico (**CBDA**), cannabigerol (**CBG**), ácido cannabigerólico (**CBGA**), cannabinol (**CBN**) y ácido cannabínico (**CBNA**) [2-5]. La demanda de preparaciones o extractos de cannabis con altas concentraciones de cannabinoides, para el tratamiento de múltiples afecciones, va en aumento. Por otro lado, la preparación de cosméticos a base de cannabis (cosmética cannábica) también se ha incrementado. Según las proyecciones, en Colombia y en el mundo se registrará en 2025 un crecimiento acelerado del mercado [6], [7].

El tetrahidrocannabinol ha sido el cannabinoide psicoactivo más estudiado debido a sus efectos terapéuticos; sin embargo, presenta un inconveniente: su actividad psicoactiva. Por otro lado, el cannabidiol es el principal cannabinoide no-psicoactivo. El **CBD** es hoy, sin duda, el cannabinoide más estudiado debido a sus propiedades farmacológicas y al ser no psicoactivo, se emplea para el tratamiento de diferentes enfermedades inflamatorias dentro de las que se encuentran la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa y trastornos neuronales como Parkinson y Alzheimer [8]. También tiene propiedades antiproliferativas y proapoptóticas, útiles para la modulación de la tumorigénesis en diferentes tipos de cáncer, incluidos los de mama, pulmón, colon, cerebro, piel y otros [8]. También existen evidencias de que el **CBD** exhibe actividades antiinflamatorias (neuroinflamación), antimicrobianas y analgésicas [4], [5], [9], [10], [11].

Debido a la importancia de los fitocannabinoides, se han reportado algunas metodologías de extracción, desde las convencionales como soxhlet y maceración dinámica, hasta alternativas como la

extracción asistida por ultrasonido (**EAU**), extracción asistida por microondas (**EAM**), extracción con etanol criogénico, extracción hidrodinámica de cannabis, extracción de líquidos a presión (**PLE**) y extracción de fluidos supercríticos [12]. La técnica de ultrasonido es ampliamente empleada en las industrias química y alimentaria por su capacidad para influir significativamente en la velocidad de sustracción.

La principal característica que diferencia a la **EAU** de otras técnicas es el uso de ondas con frecuencias comprendidas entre 20 y 100 kHz, que permiten la ruptura de estructuras celulares y la penetración del solvente en la matriz vegetal para sacar los compuestos de interés. A esto se le denomina cavitación, es decir, la formación, expansión y colapso de burbujas dentro de la solución que permite una intensa transferencia de masa y un acceso acelerado del solvente al material celular [12], [13]. En **EAU** deben considerarse y optimizarse [13] factores como el porcentaje de humedad, el tipo de solvente, el tamaño de la partícula, la temperatura, la potencia y el tiempo de sonicación.

El método más comúnmente empleado en la actualidad para la extracción de metabolitos del cannabis es el uso de solventes orgánicos volátiles; sin embargo, debido a que no son renovables y en algunos casos tóxicos, se requiere mayor investigación para el desarrollo de alternativas renovables que involucren ingeniería para el desarrollo de extractos, derivados o cosméticos de cannabis. Estas metodologías deben estar enmarcadas en la química verde y la economía circular [12].

Abbott y colaboradores describieron en 2003 los disolventes eutécticos profundos o Deep Eutectic Solvents (**DES**), como mezclas eutécticas, es decir, una mezcla líquida de bajo punto de fusión formada por dos o más compuestos [14], en la que se cumple que la mezcla presenta menor punto de fusión si se compara con los compuestos aislados. Los **DES** formados a partir de compuestos de origen vegetal se denominan disolventes eutécticos profundos naturales (**NADES**), que se consideran renovables y, dependiendo de sus componentes, pueden ser no tóxicos, poco volátiles, no inflamables, de fácil preparación, presentar alta capacidad de solubilización y facilidad de diseño desde su

preparación, para cumplir una aplicación específica [15-17].

Se han reportado algunos estudios en los que se emplean **DES** y **NADES** con extracción asistida por ultrasonido para obtener cannabinoides. Křížek y colaboradores [18] desarrollaron una serie de solventes eutécticos profundos hidrofóbicos (**HDES**) basados en terpenos y ácidos orgánicos naturales para conseguir tetrahidrocannabinol, cannabidiol y sus homólogos carboxilados, empleando la técnica de ultrasonido. Los resultados muestran que el **DES** compuesto por una mezcla de Mentol:Ácido acético (proporción molar 1:1) reveló la mayor eficiencia de extracción, con rendimientos que oscilaron entre 5.00 mg/g; y este **DES** presentó más eficiencia que solventes como etanol, metanol y cloroformo. En un estudio más reciente, Cai y colaboradores [19] desarrollaron diversos **DES** como medios para la extracción asistida por ultrasonido de cannabidiol (**CBD**) del cáñamo industrial.

El **DES** cloruro de colina:L-tartrato de dietilo 1:1 se seleccionó como el extractante óptimo y las condiciones optimizadas de extracción fueron: temperatura de 48°C, 55 min, concentración de **DES** del 68 % en peso (en etanol) y relación sólido-líquido de 1:24; el rendimiento de la extracción fue de 12.22 mg/g y fue mayor que el alcanzado por solventes convencionales. En ambos trabajos se concluye que la extracción con **DES** es eficiente, no tóxica y biodegradable, tiene aplicaciones dentro de la industria farmacéutica y representa un solvente orgánico alternativo más ecológico para la extracción de fitocannabinoides.

Con lo descrito anteriormente, los objetivos de esta investigación fueron usar como base mentol, ácidos grasos y β -sitosterol para preparar disolventes eutécticos profundos naturales, usar como solventes de extracción verdes de fitocannabinoides de *Cannabis sativa* y evaluar el rendimiento en la obtención de fitocannabinoides empleando extracción asistida por ultrasonido con los disolventes eutécticos profundos basados en mentol.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las muestras de *Cannabis sativa* fueron recolectadas en la empresa Natura Pharma Cauca S. A. S. Zomac, ubicada en el Cauca, Colombia; se siguió el muestreo recomendado por la Unodc [20]. La muestra se descarboxiló en un horno a 110°C durante 50 min [21] en un recipiente cerrado buscando la menor pérdida de terpenos y terpenoides. Se utilizó un molino comercial para obtener un tamaño de partícula menor a 1 mm. Finalmente, las muestras se almacenaron a menos de 10°C y se mantuvieron protegidas de la luz.

Reactivos

Para la preparación de los eutécticos profundos se utilizaron los siguientes compuestos: **DL**-mentol (95 %, Nusci), β -sitosterol (95 %, Nusci), ácido dodecanoico (95 %, Nusci), ácido octanoico (95 %, Nusci), ácido decanoico (99 %, Nusci) y ácido láctico (95 %, Nusci). Como patrones para **CG-MS** se utilizaron cannabidiol (**CBD**) (13956-29-1, Restek), cannabinol (**CBN**) (521-35-7, Restek), Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -9-**THC**) (1972-08-3, Restek), cannabigerol (**CBG**) (25654-31-3, Restek) y Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -**THC**) (5957-75-5, Restek).

Preparación de disolventes eutécticos profundos basados en mentol

Los **DES** basados en mentol se prepararon por método de calentamiento y agitación a partir de **DL**-Mentol, ácidos grasos naturales y β -sitosterol, en las proporciones molares que produjeron **DES** líquidos por debajo de 25°C. El procedimiento fue el siguiente: la mezcla se preparó pesando cada componente, se calentó entre 50°C y 80°C con agitación constante hasta obtener un líquido homogéneo; luego se enfrió a temperatura ambiente [22] (tabla 1). La formación del **DES** se comprobó

visualmente y por espectroscopía infrarroja transformada de Fourier; además, se midió la densidad y viscosidad para evaluar estabilidad y posibles aplicaciones.

Extracción de fitocannabinoides

Para comprobar la capacidad de los **NADES** para extraer fitocannabinoides por ultrasonido, se pesaron 100 mg de muestra molida, se agregaron 5,00 mL del **NADES** para obtener una relación cannabis: **DES** 1:20, se empleó un equipo Branson 1510 sonicando por 40 min y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Una alícuota del sobrenadante se diluyó en etanol y se inyectó para cuantificar por cromatografía de gases. El mismo procedimiento se repitió para cada **NADES** preparado y se comparó con etanol (figura 7).

Con el **NADES** que presentó mejor rendimiento de extracción se realizó la optimización por un

diseño factorial 2³ donde se tomaron como factores el tiempo (20 y 60 min), %**DES** en etanol (70 y 100 %) y la relación Cannabis:**DES** (1:20 y 1:50) (tabla 2). Como variable respuesta se calculó el porcentaje de extracción de los fitocannabinoides. Los datos se analizaron en el programa Minitab v19 en su versión de prueba.

Cuantificación de fitocannabinoides por cromatografía de gases acoplado a masas

La cuantificación de los fitocannabinoides se realizó por cromatografía de gases acoplado a masas, se usó un cromatógrafo de gases serie Trace 1300 acoplado a espectrómetro de masas **ISQ LT** marca Thermo Scientific con automuestreador **HTA**, operando en modo de impacto electrónico. Se empleó una columna **TG-5MS** 30m x 0.25mm x 0.25µm. Se inyectaron 0.5 µL del extracto diluido en etanol,

Tabla 1. Disolventes eutécticos profundos basados en mentol preparados

Nombre	Aceptor de enlace de hidrógeno	Donor de enlace de hidrógeno	Relación molar	Apariencia
DES-1	Mentol	Ácido acético	2:1	Líquido transparente
DES-2	Mentol	Ácido láctico	2:1	Líquido transparente
DES-3	Mentol	Ácido octanoico	3:1	Líquido amarillo claro
DES-4	Mentol	Ácido octanoico	2:1	Líquido amarillo claro
DES-5	Mentol	Ácido octanoico	1:1	Líquido amarillo claro
DES-6	Mentol	Ácido octanoico	1:2	Líquido amarillo claro
DES-7	Mentol	Ácido octanoico	1:3	Líquido amarillo claro
DES-8	Mentol y β-sitosterol	Ácido octanoico	2:1:0,15	Líquido amarillo claro
DES-9	Mentol	Ácido decanoico	2:1	Líquido transparente
DES-10	Mentol	Ácido decanoico	1:1	Líquido transparente
DES-11	Mentol	Ácido decanoico	1:2	Líquido transparente
DES-12	Mentol y β-sitosterol	Ácido decanoico	2:1:0,15	Líquido amarillo claro
DES-13	Mentol	Ácido dodecanoico	2:1	Líquido transparente
DES-14	Mentol	Ácido dodecanoico	3:1	Líquido transparente
DES-15	Mentol	Ácido dodecanoico	4:1	Líquido transparente
DES-16	Mentol y β-sitosterol	Ácido dodecanoico	2:1:0,15	Líquido amarillo claro
DES-17	Mentol	Ácido dodecanoico y Ácido octanoico	2:0,5:0,5	Líquido transparente
DES-18	Mentol	Ácido dodecanoico y Ácido decanoico	2:0,5:0,5	Líquido transparente
DES-19	Mentol	Ácido decanoico y Ácido octanoico	2:0,5:0,5	Líquido transparente

Fuente: elaboración propia.

Tabla 2. Diseño experimental factorial 2³ para la extracción de fitocannabinoides por extracción asistida por ultrasonido

Orden	Tiempo	%DES	Cannabis: DES (g/mL)	% CBD	% Δ ⁹ -THC	% CBG	% CBN	% Δ ⁸ -THC
3	20	100	0.020	22.83	4.579	0.744	1.717	0.254
9	40	85	0.035	21.26	4.115	0.171	1,443	0.217
1	20	70	0.020	18.84	3.983	0.065	1.120	0.209
2	60	70	0.020	21.56	4.597	0.181	1.739	0.252
8	60	100	0.050	21.86	4.111	0.142	1.395	0.207
6	60	70	0.050	21.20	4.284	0.177	1.158	0.220
4	60	100	0.020	29.28	6.270	0.407	3.070	0.273
11	40	85	0.035	22.42	4.950	0.103	1.312	0.233
10	40	85	0.035	23.70	5.210	0.131	1.671	0.240
5	20	70	0.050	21.11	4.416	0.035	1.821	0.171
7	20	100	0.050	25.85	5.681	0.244	1.908	0.240

Fuente: elaboración propia.

la temperatura del inyector se fijó en 270°C, el flujo de He en 1 mL/min y un Split de 50 mL/min. Se trabajó con una rampa de temperatura, desde 240°C por 1 min, subió a 290°C a 20°C/min, y 290°C por 2 min, para un tiempo de análisis de 6 min. La temperatura de línea de transferencia y surco de iones se fijó en 230°C y el detector MS en modo impacto electrónico en un rango de masas de 35-450 m/z. Por último, la cuantificación se realizó por estándar externo.

Resultados y discusión

Se obtuvieron 19 disolventes NADES resultantes de diferentes combinaciones entre el mentol (M) y ácidos naturales como acético (A.A), láctico (A.L), octanoico (A.Oct), decanoico (A.Dec) y dodecanoico (A.Dodec) (tabla 1) en diferentes relaciones molares. Además, se logró incluir el β-sitosterol (b-S) en tres DES con mentol y ácidos grasos, de lo cual no se encontraron reportes en la literatura. Todos los NADES preparados resultaron estables por encima de 20 °C, insolubles en agua (disolventes eutécticos profundos naturales hidrofóbicos) y solubles en etanol, metanol y solventes orgánicos. Los disolventes eutécticos se forman por interacciones moleculares entre sus componentes

que hacen que disminuya el punto de fusión de la mezcla si se compara con el de sus componentes individuales. En esta investigación se usó como aceptor de enlaces de hidrógeno al mentol y al β-sitosterol, y como donador de enlaces de hidrógeno a los ácidos acético, láctico, octanoico, decanoico y dodecanoico.

Se ha reportado que el mentol interactúa tanto con las cadenas de alquilo de los ácidos, como por formación de enlaces de hidrógeno con el grupo carboxilo. Para observar estas interacciones se realizó análisis de los disolventes por IR-ATR. El espectro de Mentol:Ácido octanoico 2:1 se muestra en la figura 2. En el mentol la elongación del enlace O-H aparece a 3242,40 cm⁻¹, en la mezcla se desplaza a 3360,59 cm⁻¹; en el espectro del ácido octanoico la banda correspondiente al grupo carbonilo se forma en 1705,77 cm⁻¹ y en la mezcla eutéctica esta se desplaza a 1710,25 cm⁻¹. Estos desplazamientos y ensanchamientos indican la formación de enlaces de hidrógeno entre el mentol y el ácido octanoico. El mismo comportamiento se evidenció para los demás DES preparados (figuras 2-4); la información de los espectros FTIR y la evidencia visual comprueban la formación de los disolventes eutécticos profundos basados en mentol.

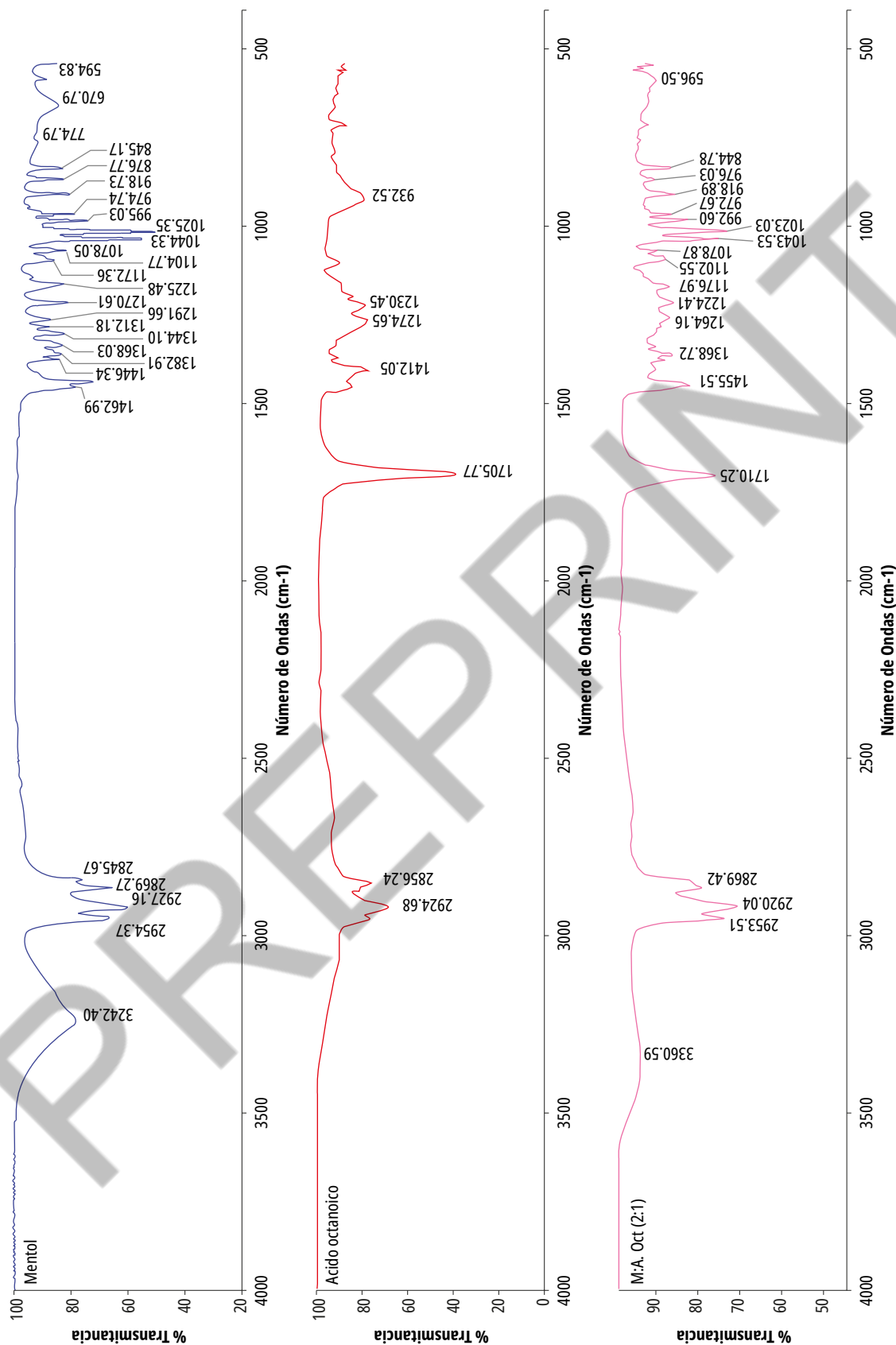


Figura 1. Espectro FTIR del disolvente Mentol:Ácido Octanoico 2:1
Fuente: elaboración propia.

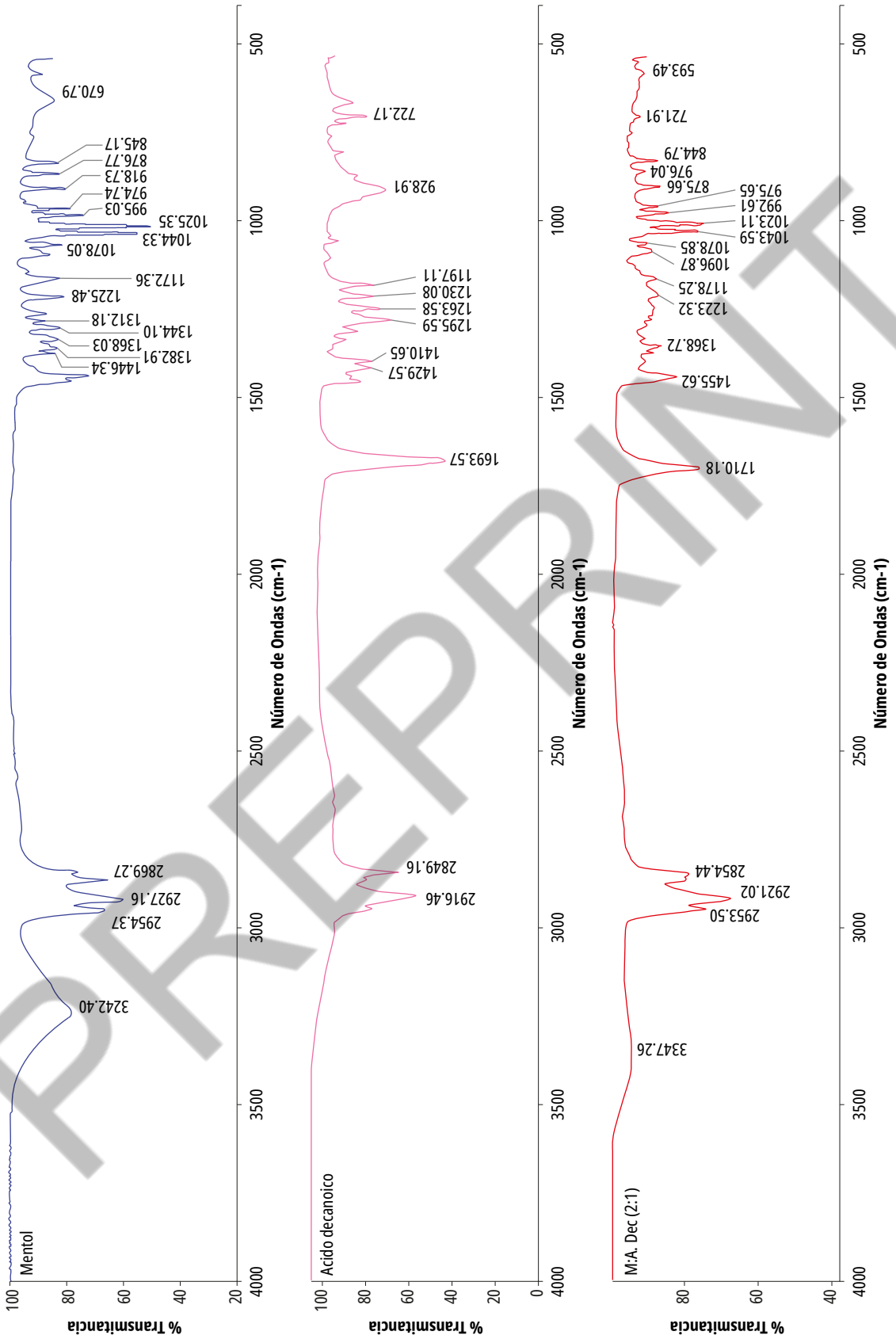


Figura 2. Espectro FTIR del disolvente Mentol:Ácido Decanoico 2:1

Fuente: elaboración propia.



Figura 3. Espectro FTIR del disolvente Mentol:Ácido Dodecanoico 2:1

Fuente: elaboración propia.

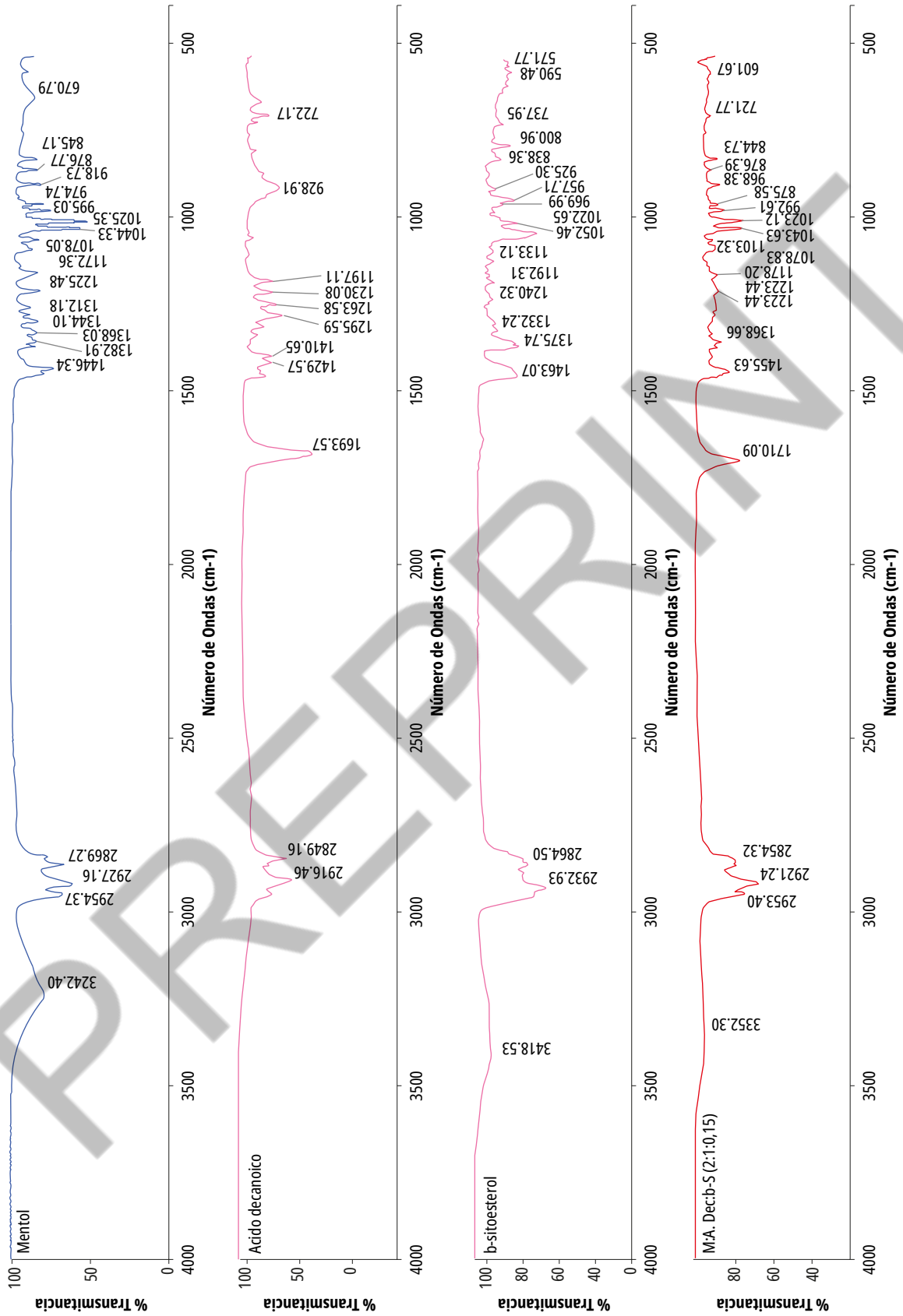


Figura 4. Espectro FTIR del disolvente Mentol:Ácido Decanoico:β-sitosterol 2:1:0.15

Fuente: elaboración propia.

Los **DES** preparados registraron una densidad entre 0,8915 g/mL y 0,9966 g/mL, el disolvente Mentol:Ácido láctico 2:1 mostró la menor densidad y el Mentol:Ácido acético 2:1 el mayor valor de densidad. En los disolventes formados entre ácidos grasos y mentol no se advirtió una diferencia significativa en su valor de densidad a un nivel de confianza del 95%. En las mezclas de mentol y ácido octanoico, al aumentar la proporción de mentol con la del ácido octanoico constante se observó una disminución de la densidad. Al incrementar la proporción del ácido octanoico también aumentó la densidad; respecto a los disolventes conformados por mentol y ácido decanoico, al variar la concentración de mentol o ácido decanoico disminuyó la densidad si se compara con la densidad del **DES** Mentol:Ácido decanoico 1:1. Las mezclas de mentol y ácido dodecanoico fueron estables con una baja proporción de ácido dodecanoico. El aumento de la proporción de mentol acrecentó la densidad del **DES**. Finalmente, las mezclas de tres componentes resultaron en **DES** de mayor densidad cuando se incluyó el β -sitosterol, al igual que los **DES** que contienen dos tipos de ácidos grasos (figuras 5 y 6).

Por otro lado, los disolventes que se componen de mentol y ácidos grasos presentaron bajos valores de viscosidad, lo que resulta ser beneficioso

para el transporte de masa durante el proceso de extracción. Se determinó una reducción exponencial de la viscosidad dinámica de los **DES** en un intervalo de temperatura de 22 a 80°C. El **DES** de menor viscosidad dinámica fue el Mentol:Ácido acético 2:1 y el de mayor viscosidad Mentol:Ácido láctico 2:1. Se determinaron diferencias significativas en los valores de viscosidad entre los **DES** preparados. En general, los eutécticos que contienen ácido octanoico exhibieron menor viscosidad que los que contienen ácidos decanoico y dodecanoico; la viscosidad aumenta si también lo hace la proporción molar de mentol en el eutéctico y disminuye al incrementar la proporción de ácido carboxílico.

Adicionalmente, la inclusión de β -sitosterol acrecienta significativamente el valor de la viscosidad dinámica en comparación con la mezcla sin el β -sitosterol debido a su alto peso molecular. Finalmente, los valores de densidad y viscosidad obtenidos en este estudio se pueden clasificar como **DES** de baja viscosidad considerando los resultados de Ribeiro y colaboradores que prepararon **DES** similares a los aquí descritos [22].

Es importante resaltar que el β -sitosterol solo se logró incluir hasta una proporción de 0.15 molar respecto a la del mentol; por encima de esta relación el disolvente resultante no es estable a temperatura

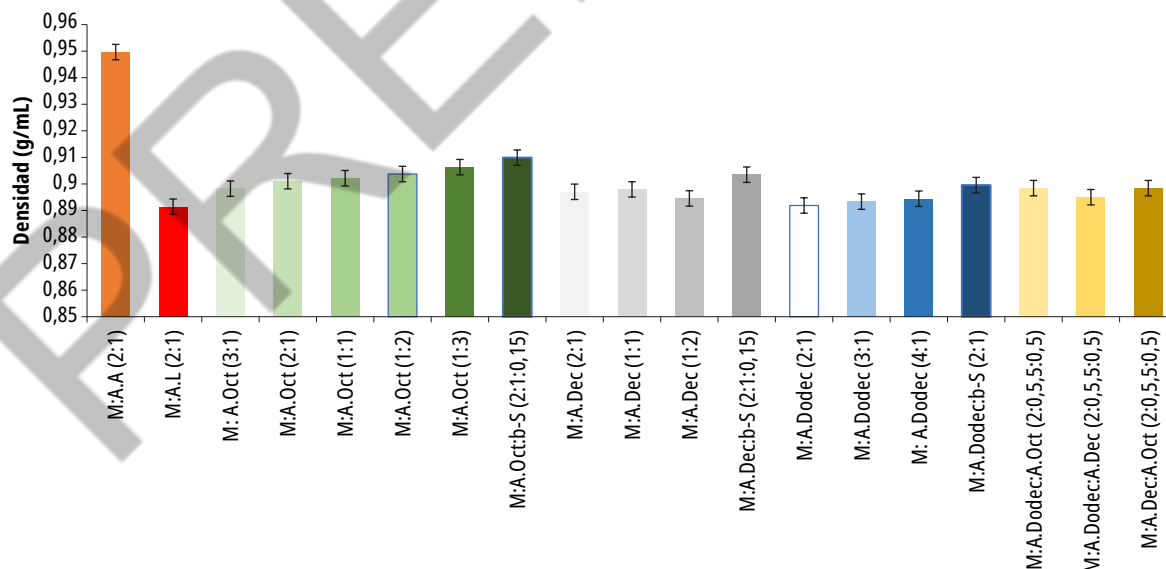


Figura 5. Densidad de los disolventes eutécticos profundos basados en mentol

Fuente: elaboración propia.

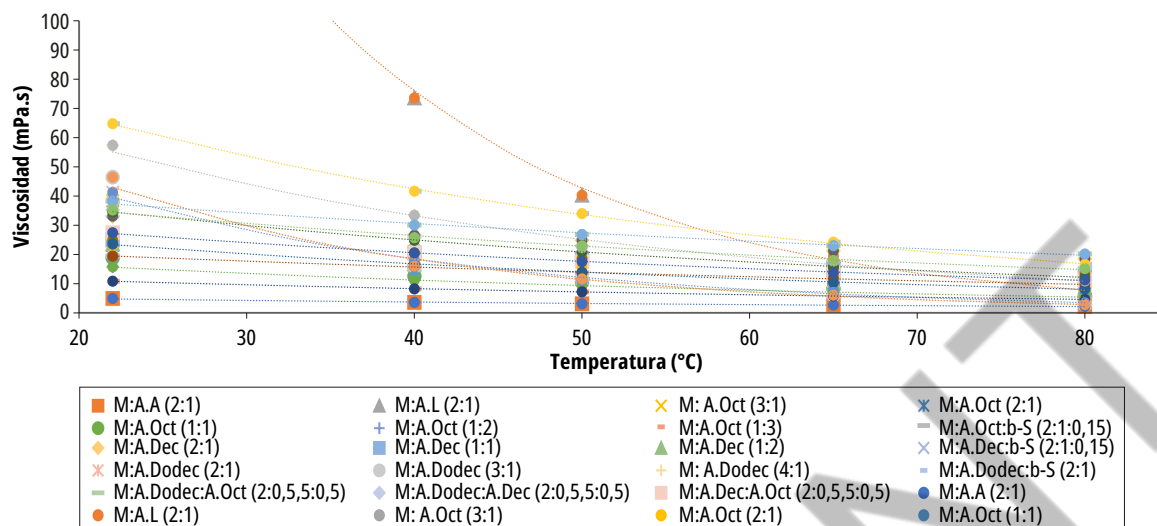


Figura 6. Viscosidad dinámica de los disolventes eutécticos profundos basados en mentol

Fuente: elaboración propia.

ambiente (20-22 °C). La formación de **DES** con este compuesto tiene importancia farmacológica porque ostenta propiedades anticancerígenas reportadas contra el cáncer de mama, próstata, colon, pulmón, estómago y leucemia [23].

Para evaluar la capacidad de extracción se usó ultrasonido empleando los **DES** y se calculó el porcentaje de extracción. Los resultados se presentan en la figura 7 y la tabla 3. Todos los **NADES** de este estudio presentaron mayores rendimientos de extracción de **CBD**, **THC**, **CBG** y **CBN** si se comparan con etanol. Este resultado es importante ya que el etanol es el solvente más empleado para la sustracción de fitocannabinoides, por lo que los **NADES** aquí descritos pueden usarse como solventes alternativos al etanol con los que se pueden realizar extractos y derivados de cannabis para las industrias farmacéutica y cosmética.

Con el **NADES** **M:A.Oct** 3:1 se logró un rendimiento de extracción del 32.416% de **CBD**, que difieren de lo reportado por Křížek y colaboradores [18], porque, según su estudio, el **DES** más eficiente fue **M:A.A** 2:1 por encima de **M:A.Oct** 1:1, lo que indica que el aumento en la proporción molar del mentol en este último produjo un incremento en el rendimiento de extracción de los fitocannabinoides. En el mismo sentido, el **M:A.Dodec** 2:1 fue el **NADES** que presentó mayor rendimiento para

Δ^9 -**THC**, seguido de **M:A** Oct 3:1; el mayor rendimiento para **CBG** se logró con **M:A.A** 2:1, seguido de **M:A.Dec**: β -S 2:1:0,15. Por último, el mayor rendimiento de extracción de **CBN** se logró con **M:A.ct** 3:1 y **M:A.Oct** 1:1.

Al usar el disolvente sin diluir se identificaron dos características propias de los **DES** que afectan la extracción, la polaridad y la viscosidad. Los disolventes basados en mentol pueden extraer cannabinoides al establecer amplias interacciones intermoleculares con estos, como interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno. El valor de log P para el **THC** es 6.97 y para el **CBD** es 5.79 por lo que se pueden obtener con disolventes de baja polaridad como los **DES** usados en este estudio.

Cuando se aumenta la longitud de la cadena del ácido disminuye la polaridad del **NADES**; sin embargo, se acentúa su viscosidad y, por tanto, se limita el transporte de masa de los cannabinoides desde las estructuras celulares hasta el disolvente para ser sacados. Esto se evidencia al comparar **M:A. Octa** 2:1, **M:A. Dec** 2:1 y **M:A. Dodec** 2:1: el mayor rendimiento se presenta con el **DES** del ácido graso de menor longitud (C8). En cuanto a los **DES** que contenían β -sitosterol, **M:A.Oct:b-S** 2:1:0,15 muestra menor rendimiento que **M:A.Oct** 2:1 ya que en el primero el β -sitosterol acrecienta la viscosidad. El caso contrario se observa en los

DES M:A.Dec:b-S 2:1:0,15 y M:A.Dodec:b-S 2:1 porque se incrementa el rendimiento de extracción si se compara con los **DES** sin el β -sitosterol, ya que al ser estos últimos más viscosos el β -Sitos-terol agranda la afinidad de los fitocannabinoides. Finalmente, al formar los resultados obtenidos con los **DES** formados con mentol y dos ácidos grasos no se logró establecer una diferencia significativa en el rendimiento de extracción (**DES** 17-19).

Para evaluar el efecto del porcentaje en peso del **DES**, la relación Cannabis:**DES** y el tiempo de sonicación sobre el rendimiento de extracción de cada cannabinoide se realizó un diseño factorial 2³

con tres repeticiones en el punto central, cuyo resumen se muestra en la tabla 2. En la figura 8 se muestran los diagramas de Pareto obtenidos. Para la extracción de **CBD** el efecto significativo es el %**DES**, la extracción de Δ^9 -**THC** no presentó efectos significativos y en la de Δ^8 -**THC** solo es significativa la relación Cannabis:**DES**, el %**DES** y la relación Cannabis:**DES** tiene un efecto significativo en la extracción de **CBG** así como las interacciones %**DES***Cannabis:**DES** y %**DES***Tiempo, finalmente, el %**DES** y la interacción Tiempo*Cannabis:**DES** tienen un efecto significativo en la extracción de **CBN** (figura 8).

Tabla 3. Rendimientos de extracción de fitocannabinoides

Extracción	Cannabis (mg)	DES (mL)	Rendimiento de extracción (%)				
			CBD	Δ^8 -THC	Δ^9 -THC	CBG	CBN
DES-1	100.0	5.00	29.939	0.361	6.987	0.753	1.924
DES-2	101.0	5.00	23.390	0.333	6.183	0.424	1.489
DES-3	100.9	5.00	32.416	0.425	8.603	0.425	2.147
DES-4	100.3	5.00	28.065	0.332	6.327	0.354	1.867
DES-5	100.1	5.00	30.773	0.349	7.070	0.408	1.998
DES-6	100.8	5.00	23.822	0.282	5.340	0.406	1.126
DES-7	100.5	5.00	21.033	0.267	4.920	0.448	1.282
DES-8	101.1	5.00	24.064	0.279	5.263	0.546	1.610
DES-9	100.7	5.00	26.002	0.325	5.939	0.483	1.478
DES-10	100.7	5.00	22.863	0.271	5.290	0.000	0.000
DES-11	100.7	5.00	22.718	0.000	8.641	0.240	0.651
DES-12	100.6	5.00	27.457	0.000	6.661	0.641	1.630
DES-13	100.5	5.00	23.918	0.625	11.038	0.484	1.092
DES-14	100.7	5.00	24.440	0.277	9.052	0.000	0.000
DES-15	100.7	5.00	23.197	0.000	5.577	0.214	0.720
DES-16	100.1	5.00	26.731	0.444	6.830	0.448	1.474
DES-17	100.1	5.00	26.500	0.338	6.091	0.594	1.857
DES-18	100.0	5.00	27.082	0.282	6.409	0.363	1.322
DES-19	100.0	5.00	26.927	0.313	6.733	0.582	1.532
Etanol	100.3	5.00	18.157	0.282	4.210	0.000	0.984

Fuente: elaboración propia.

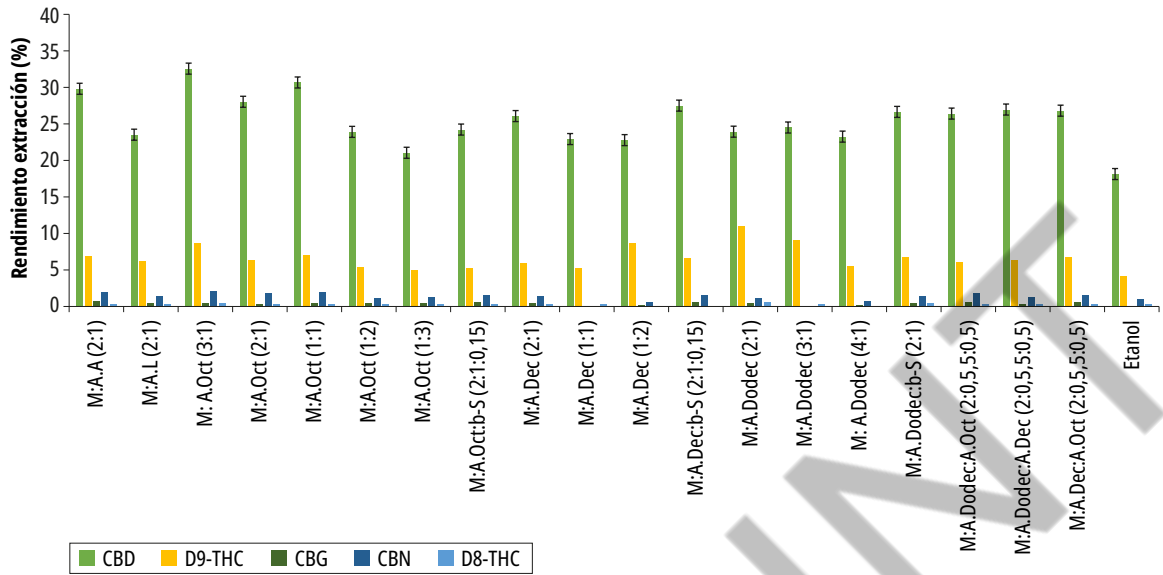


Figura 7. Rendimiento de extracción de fitocannabinoides usando los disolventes eutécticos basados en mentol
Fuente: elaboración propia.

El análisis de varianza (Anova), resultante del análisis del diseño, mostró que el modelo de regresión es significativo y la falta de ajuste no significativo; los coeficientes de determinación (R^2) de todos los modelos de rendimientos de extracción de los fitocannabinoides estuvieron por encima de 0.7000 por lo que resultaron adecuados y dan confianza para la predicción de respuestas. A continuación, se presentan los modelos de extracción para cada fitocannabinoide:

$$\begin{aligned} \%CBD = & 17,4 - 0,410 \text{ Tiempo} - 0,033 \%DES - 243 \\ & \text{Cannabis:DES} + 0,00745 \text{ Tiempo} * \%DES + 12,99 \\ & \text{Tiempo} * \text{Cannabis:DES} + 5,17 \%DES * \text{Cannabis:DES} \\ & - 0,2169 \text{ Tiempo} * \%DES * \text{Cannabis:DES} - 0,356 \text{ Pt Ctrial} \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \% \Delta^9\text{-THC} = & 6,00 - 0,133 \text{ Tiempo} - \\ & 0,0409 \%DES - 123 \text{ Cannabis:DES} + 0,00230 \\ & \text{Tiempo} * \%DES + 4,27 \text{ Tiempo} * \text{Cannabis:DES} \\ & + 2,14 \%DES * \text{Cannabis:DES} - 0,0699 \\ & \text{Tiempo} * \%DES * \text{Cannabis:DES} + 0,018 \text{ Pt Ctrial} \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \% \Delta^8\text{-THC} = & 0,164 + 0,00006 \text{ Tiempo} + \\ & 0,00074 \%DES - 5,42 \text{ Cannabis:DES} + 0,000013 \\ & \text{Tiempo} * \%DES + 0,1183 \text{ Tiempo} * \text{Cannabis:DES} \\ & + 0,0579 \%DES * \text{Cannabis:DES} - 0,001613 \\ & \text{Tiempo} * \%DES * \text{Cannabis:DES} + 0,00154 \text{ Pt Ctrial} \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \%CBG = & -2,971 + 0,03700 \text{ Tiempo} + \\ & 0,04295 \%DES + 43,2 \text{ Cannabis:DES} - 0,000493 \\ & \text{Tiempo} * \%DES - 0,384 \text{ Tiempo} * \text{Cannabis:DES} \\ & - 0,638 \%DES * \text{Cannabis:DES} + 0,00580 \\ & \text{Tiempo} * \%DES * \text{Cannabis:DES} - 0,1144 \text{ Pt Ctrial} \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \%CBN = & -0,96 - 0,0288 \text{ Tiempo} + \\ & 0,0125 \%DES + 61,6 \text{ Cannabis:DES} + 0,000938 \\ & \text{Tiempo} * \%DES + 0,07 \text{ Tiempo} * \text{Cannabis:DES} \\ & - 0,241 \%DES * \text{Cannabis:DES} - 0,0163 \\ & \text{Tiempo} * \%DES * \text{Cannabis:DES} - 0,265 \text{ Pt Ctrial} \end{aligned} \quad (5)$$

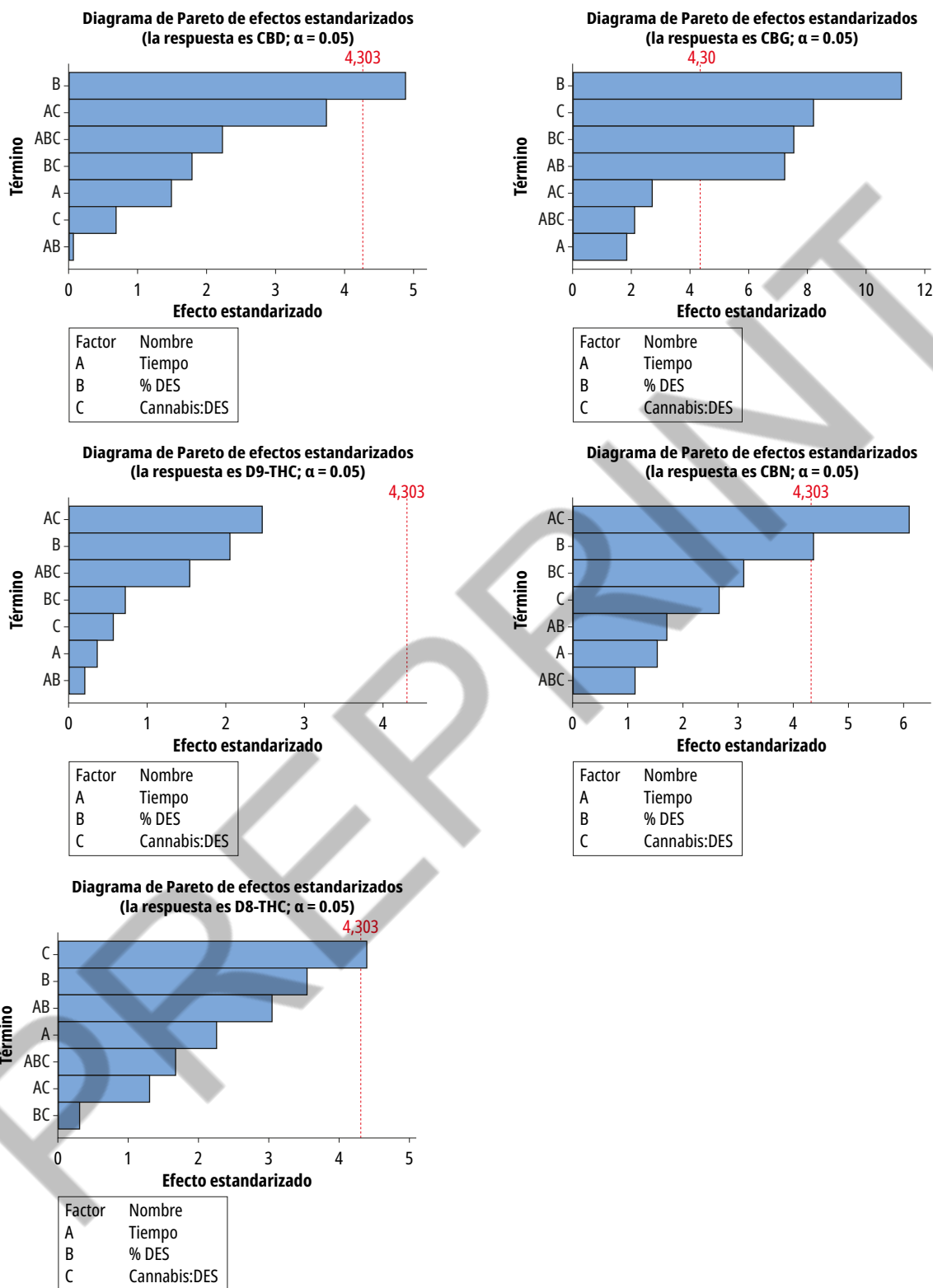


Figura 8. Diagramas de Pareto del diseño factorial 2^3

Fuente: elaboración propia.

Solo el modelo **CBG** presentó una curvatura significativa, contrario a lo que sucedió con los demás fitocannabinoides. Esto podría variar si se considera en el diseño el factor de la temperatura. Para la optimización solo se consideran interacciones lineales, de lo cual se derivan como condiciones óptimas 60 min de sonicación, 100% del **DES** y una relación de Cannabis:**DES** de 0.020 g/mL (1:50) para un objetivo de 29.28% de **CBD**, 3.98% de Δ^9 -**THC**, 0.27% de Δ^8 -**THC**, 0.74% de **CBG** y 3.07% de **CBN**. Las condiciones óptimas obtenidas son relevantes porque, aunque resultó en el mayor tiempo de extracción, la relación cannabis:**DES** es la más baja y la viscosidad no es una limitante en el proceso, ya que para el 100 % del **DES** dio el mayor rendimiento. Se probaron las condiciones óptimas y se obtuvo un rendimiento de 29.22 % de **CBD**, 3.90 % de Δ^9 -**THC**, 0.29 % de Δ^8 -**THC**, 0.71 % de **CBG** y 3.07 % de **CBN**, cercanos a la utilidad estimada por el modelo, por lo que este es apropiado para predecir el porcentaje de extracción de los fitocannabinoides.

De acuerdo con lo obtenido en este estudio, se determinó que los rendimientos de extracción son superiores a los reportados por Cai y colaboradores: 12 mg/g de **CBD** empleando **DES** basados en cloruro de colina y betaína [19]; también los resultados obtenidos son mayores a los rendimientos reportados por Křížek y colaboradores quienes emplearon **DES** hidrófobos basados en terpenos y ácidos grasos que alcanzaron un rendimiento de extracción de 5,00 mg/g para **CBD** [18].

Conclusiones

Se prepararon y caracterizaron **NADES** de baja viscosidad basados en mentol, β -sitosterol y ácidos grasos, que muestran mayores rendimientos de extracción de fitocannabinoides como **CBD**, **THC**, **CBN** y **CBG** si se comparan con etanol y se emplea ultrasonido. Se determinó que la proporción molar, la viscosidad y la polaridad de los **DES** afecta la extracción de los fitocannabinoides. El disolvente Mentol:Ácido octanoico 3:1 presentó el mayor porcentaje de extracción y con este se optimizó la obtención por ultrasonido, para la cual se encontraron como condiciones óptimas, tiempo

de 60 min, %**DES** de 100% y una relación Cannabis:**DES** 1:20.

En este estudio se logró una extracción verde y eficiente de fitocannabinoides en la industria del cannabis medicinal o cosmética, que implica una alternativa a las técnicas convencionales para la preparación de derivados del cannabis. La metodología es novedosa, optimizable y tiene potencial para implementarse a gran escala.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad del Cauca, al proyecto de Jóvenes Investigadores e Innovadores en el departamento del Cauca, al Grupo de Investigación Química de Productos Naturales de esa universidad por el proyecto de la convocatoria de financiamiento interno **VRI ID**: 4961 de 2018 y proyecto interno **VRI ID**: 5507 del 2020. Agradecemos también al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación por la beca en el marco de la convocatoria de Becas de Excelencia Doctoral del Bicentenario 2019-Colciencias y convocatoria 823-2018 de Formación de Alto Nivel para las regiones, Cauca.

Referencias

- [1] C. M. Andre, J.-F. Hausman y G. Guerriero, "Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules, *Front. Plant Sci.*, vol. 7, p. 19, 2016, DOI: 10.3389/fpls.2016.00019
- [2] L. E. Filipiuc *et al.*, "Major Phytocannabinoids and Their Related Compounds: Should We Only Search for Drugs That Act on Cannabinoid Receptors?", *Pharmaceuticals*, vol. 13, n.º 11, p. 1823, Nov. 2021, DOI: 10.3390/pharmaceutics13111823
- [3] T. Gülck y B. L. Möller, "Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis", *Trends Plant Sci.*, vol. 25, n.º 10, pp. 985-1004, Oct. 2020, DOI: 10.1016/j.tplants.2020.05.005.
- [4] M. Gerasymchuk *et al.*, "Phytocannabinoids Stimulate Rejuvenation and Prevent Cellular Senescence in Human Dermal Fibroblasts", *Cells*, vol. 11, n.º 23, Art. n.º 23, ene. 2022, DOI: 10.3390/cells11233939
- [5] Y. Paes-Colli *et al.*, "Phytocannabinoids and Cannabis-Based Products as Alternative Pharmacotherapy in Neurodegenerative Diseases: From Hypothesis to Clinical Practice", *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 16, 2022,

- Accedido: 6 de enero de 2023. [Internet]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fn-cel.2022.917164>
- [6] J. M. Ramírez y Fedesarrollo, “La industria del cannabis medicinal en Colombia”, dic. 2019, Accedido: 6 de enero de 2023. [Internet]. Disponible en: <http://www.repository.fedesarrollo.org.co/handle/11445/3823>
- [7] G. Crini, E. Lichtfouse, G. Chanet, y N. Morin-Crini, “Applications of hemp in textiles, paper industry, insulation and building materials, horticulture, animal nutrition, food and beverages, nutraceuticals, cosmetics and hygiene, medicine, agrochemistry, energy production and environment: a review”, *Environ. Chem. Lett.*, vol. 18, n.º 5, pp. 1451-1476, Sep. 2020, DOI: 10.1007/s10311-020-01029-2
- [8] D. Namdar y H. Koltai, “Medical Cannabis for the Treatment of Inflammation”, *Nat. Prod. Commun.*, vol. 13, n.º 3, p. 1934578X1801300304, mar. 2018, DOI: 10.1177/1934578X1801300304.
- [9] A. A. Izzo, F. Borrelli, R. Capasso, V. Di Marzo, y R. Mechoulam, “Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb”, *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 30, n.º 10, pp. 515-527, oct. 2009, DOI: 10.1016/j.tips.2009.07.006
- [10] A. Gugliandolo, F. Pollastro, G. Grassi, P. Bramanti y E. Mazzon, “In Vitro Model of Neuroinflammation: Efficacy of Cannabigerol, a Non-Psychoactive Cannabinoid”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, n.º 7, p. E1992, jul. 2018, DOI: 10.3390/ijms19071992
- [11] S. P. H. Alexander, “Therapeutic potential of cannabis-related drugs”, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 64, pp. 157-166, ene. 2016, DOI: 10.1016/j.pnpbp.2015.07.001.
- [12] M. P. Lazarjani, O. Young, L. Kebede, y A. Seyfoddin, “Processing and extraction methods of medicinal cannabis: a narrative review”, *J. Cannabis Res.*, vol. 3, n.º 1, p. 32, jul. 2021, DOI: 10.1186/s42238-021-00087-9
- [13] J. Azmir *et al.*, “Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review”, *J. Food Eng.*, vol. 117, n.º 4, pp. 426-436, ago. 2013, DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- [14] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, y V. Tambyrajah, “Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures”, *Chem. Commun.*, n.º 1, pp. 70-71, ene. 2003, DOI: 10.1039/B210714G
- [15] A. Palos-Hernández, M. Y. Gutiérrez Fernández, J. Escudra Burrieza, J. L. Pérez-Iglesias, y A. M. González-Paramás, “Obtaining Green Extracts Rich in Phenolic Compounds from Underexploited Food by-products Using Natural Deep Eutectic Solvents. Opportunities and Challenges”, *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 29, p. 100773, oct. 2022, DOI: 10.1016/j.scp.2022.100773.
- [16] X. Fang *et al.*, “Insights on the Potential of Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) to fine-Tune Durian Seed Gum for Use as Edible Food Coating”, *Food Hydrocoll.*, vol. 132, p. 107861, Nov. 2022, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2022.107861
- [17] C. Gómez-Urios *et al.*, “Sustainable Development and Storage Stability of Orange By-Products Extract Using Natural Deep Eutectic Solvents”, *Foods*, vol. 11, n.º 16, Art. n.º 16, Jan. 2022, DOI: 10.3390/foods11162457
- [18] T. Křížek *et al.*, “Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids”, *J. Clean. Prod.*, vol. 193, pp. 391-396, Aug. 2018, DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.05.080
- [19] C. Cai, W. Yu, C. Wang, L. Liu, F. Li, y Z. Tan, “Green Extraction of Cannabidiol from Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Using Deep Eutectic Solvents Coupled with Further Enrichment and Recovery by Macroporous Resin”, *J. Mol. Liq.*, vol. 287, p. 110957, ago. 2019, DOI: 10.1016/j.molliq.2019.110957
- [20] United Nations Office on Drugs and Crime, Ed., Métodos recomendados para la identificación y el análisis de los agonistas de los receptores de cannabinoides sintéticos en los materiales incautados: Manual para uso de los laboratorios nacionales de análisis de drogas. Nueva York: Naciones Unidas, 2014. Accedido: 6 de enero de 2023. [Internet]. Disponible en: http://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids_Sp.pdf
- [21] T. Moreno, P. Dyer, y S. Tallon, “Cannabinoid Decarboxylation: A Comparative Kinetic Study”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 59, n.º 46, pp. 20307-20315, Nov. 2020, doi: 10.1021/acs.iecr.0c03791.
- [22] B. Ribeiro, C. Florindo, L. de C. Iff, M. Coelho, y I. Marrucho, “Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents, 2015, DOI: 10.1021/ACSSUSCHEMENG.5B00532.
- [23] Z. Khan *et al.*, “Multifunctional Roles and Pharmacological Potential of β -sitosterol: Emerging Evidence Toward Clinical Applications”, *Chem. Biol. Interact.*, vol. 365, p. 110117, Sep. 2022, DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110117

PREPRINT