



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EXTRACCIÓN Y REFINACIÓN DE COMPUESTOS LIPOSOLUBLES DE SEMILLA DE
CÁÑAMO (*Cannabis sativa* L.) EMPLEANDO NANOFILTRACIÓN CON DISOLVENTES
ORGÁNICOS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS

PRESENTA:

I.A. JOSELYN SCARLET CABRERA VILLANUEVA

DIRECTORA:

DRA. PAULA CECILIA GUADARRAMA MENDOZA

CO-DIRECTOR:

DR. ROGELIO VALADEZ BLANCO

HEROICA CIUDAD DE HUAJUAPAN DE LEÓN OAXACA, SEPTIEMBRE DE 2025

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, bajo la dirección de la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza y el Dr. Rogelio Valadez Blanco. Se contó con el apoyo de beca de manutención número 1237012 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) hoy Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI).

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en el XXV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos y el X Congreso Internacional Sobre Innovación y Tendencias en Procesamiento de Alimentos, evento llevado a cabo los días 15, 16 y 17 de mayo en el Auditorio General del Edificio Central de la Universidad de Guanajuato.

A Dios;

Al amor de mi vida, mi madre, Patricia Villanueva Flores

(1981-2021)

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por concederme la fortaleza necesaria para continuar cuando sentí que no podía más. Toda la gloria y la honra sean para Él.

A mi padre, José Guadalupe Cabrera Cruz, por ser el motor de mi vida. Gracias por tus palabras de aliento y motivación, así como por tus consejos y correcciones, que me impulsaron a alcanzar mis metas. ¡Te amo papá!

A mi madre, Patricia Villanueva Flores, ejemplo de vida y fuente inagotable de amor. Tu cariño lo significó todo para mí. Te extraño más de lo que las palabras pueden expresar. Que Dios te tenga en su gloria. ¡Te amo, mamá!

A mi hermano mayor, José Enrique y su esposa Berenice Ramírez, por su apoyo constante y compañía en largas noches de preparación. A mi hermano menor, Diego Kaleb, cuyo respaldo fue fundamental para la culminación de este proyecto. ¡Los amo!

A mis abuelos, Lourdes Cruz y Galdino Cabrera, por su apoyo incondicional; y a mis tíos Iván, Marvel, Orfanel y Sofía, por estar siempre presentes y motivarme. ¡Muchas gracias por todo! Los amo.

A Fernando Vásquez Reyes, a quién le tengo un gran cariño; gracias por el apoyo, paciencia y motivación durante estos años.

A mis asesores, el Dr. Rogelio Valadez Blanco y la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza, a quienes agradezco profundamente el apoyo, la confianza y la oportunidad de trabajar a su lado. Su conocimiento, paciencia y ejemplo profesional han sido una gran inspiración.

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca, por brindarme el espacio y las herramientas necesarias para el desarrollo de este proyecto.

A mis revisores, la Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez, el Dr. Domingo Salazar Mendoza, la Dra. Luz Hermila Villalobos Delgado y el Dr. Carlos Enrique Ochoa Velasco, por su tiempo, valiosas observaciones y aportaciones, que enriquecieron este trabajo; y a la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez, por su paciencia, apoyo y constante motivación.

A mis amigos y compañeros: a Mich y Sol, por su compañía incondicional, y por todo el cariño a lo largo de estos años; a Migue, por el apoyo en el laboratorio y la motivación compartida; a Mariana, ejemplo de fortaleza y aprendizaje constante; a Amilet, por su amistad y aliento en cada momento que sentí rendirme; a Assad, con quien compartí este camino académico hasta la

maestría; a Coral, de quién a pesar de su corta edad aprendí muchísimo y a Karina Ramírez, quien me apoyó en el momento en que más lo necesitaba. ¡Te quiero mucho, mi Kary!, y estoy infinitamente agradecida contigo.

A Alejandro Osorio, gracias por la paciencia y todo lo que me enseñaste. A Marlitt Sánchez, de quién aprendí demasiado; eres una mujer muy noble, te quiero mucho Mar. A la Dra. Yesica Ruiz Ramírez, su humildad y amplio conocimiento son virtudes que no todas las personas tienen, sin duda alguna es una inspiración para mí. Les agradezco infinitamente.

A todos mis profesores, que me han mostrado su apoyo, muchas gracias.

A todas las personas que me acompañaron en esta etapa de mi vida, muchas gracias.

Finalmente, al SECIHTI, por el apoyo económico para la realización de este proyecto, a través de su sistema de becas.

RESUMEN

Estudios previos han demostrado que la composición nutricional del aceite obtenido a partir de semillas de cáñamo (*Cannabis sativa* L.) es atractiva debido a la presencia de ácidos grasos insaturados, antioxidantes naturales y por presentar propiedades funcionales (antiinflamatorias, anticancerígenas, anticonvulsivas, analgésicas, entre otras). La nanofiltración con disolventes orgánicos es una técnica de separación que tiene dos objetivos, por un lado, concentrar compuestos de interés, y por otro purificar los productos extraídos. Esta técnica se ve favorecida sobre procesos tradicionales como la destilación o cromatografía, debido a que evita la pérdida de compuestos termosensibles, tiene un bajo requerimiento energético y se pueden procesar grandes volúmenes desde el punto de vista industrial. En este estudio se llevó a cabo la extracción y refinación del aceite de semilla de cáñamo mediante membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos (OSN), con el objetivo de obtener distintas fracciones concentradas de compuestos no polares con potencial actividad biológica. Adicionalmente, se evaluó su actividad antioxidante y antimicrobiana en comparación con el extracto crudo. En la primera etapa se trabajó con membranas de nanofiltración con un peso molecular de corte nominal de 600 Da (Borsig ONF-1), las cuales, presentaron flujos de 145 L/m²h y un factor de rechazo >99%, el cual indicó que las membranas seleccionadas para este proceso son de gran utilidad para concentrar glicéridos. En la segunda etapa, se usaron membranas Duramem 150 T1 con flujos de 2.2 L/m²h, que, a pesar de su bajo flux, lograron la separación de los compuestos con un peso molecular superior a 150 Da. Por otra parte, la actividad antioxidante del aceite de semilla de cáñamo sin procesar fue de 45 mg T/ 100 g aceite, mientras que el permeado obtenido a partir de la primera etapa de nanofiltración presentó una actividad antioxidante de 96.5 mg T/100 g aceite, lo que representa un incremento superior al doble. Respecto a la actividad antimicrobiana, la mayoría de las fracciones obtenidas presentaron actividad contra *L. monocytogenes* y *S. typhi* a una concentración de 50 mg/mL con halos de inhibición entre 0.4 y 1.8 mm. Los resultados obtenidos, muestran el potencial de la nanofiltración con disolventes orgánicos como una técnica para la separación y concentración de compuestos, lo que constituye un método de refinación novedoso para esta matriz.

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Generalidades del cáñamo	2
2.1.1. Semilla de cáñamo	3
2.1.2. Composición nutrimental	4
2.2. Compuestos bioactivos	7
2.3. Actividad biológica	11
2.3.1. Antioxidante	11
2.3.2. Antimicrobiana	13
2.4. Extracción de fitoquímicos a partir de semillas oleaginosas	14
2.4.1. Prensado en frío	15
2.4.2. Extracción con disolventes orgánicos	15
2.5. Métodos de separación	16
2.6. Procesos de filtración con membranas	16
2.6.1. Fundamentos de los procesos de filtración con membranas	16
2.6.2. Clasificación de las membranas de acuerdo a su material y estructura	18
2.6.3. Configuraciones de flujo	21
2.6.4. Parámetros de los procesos de membrana	23
2.7. Procesos de nanofiltración para refinación de aceites	25
2.7.1. Nanofiltración con membranas resistentes a disolventes orgánicos (OSN).	26
2.7.2. Refinación de compuestos bioactivos usando membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos	27
2.8. Fundamentos de análisis químico proximal	29
3. MARCO CONCEPTUAL	32
3.1. Justificación	32
3.2. Originalidad	33
3.3. Objetivos	33
3.3.1. Objetivo general	33
3.3.2. Objetivos específicos	34
3.4. Metas	34
4. METODOLOGÍA	36

4.1.	Adquisición de las semillas de cáñamo y pretratamiento de la muestra	37
4.2.	Caracterización proximal de la semilla de cáñamo.....	37
4.3.	Extracción de la fracción no polar con hexano	40
4.4.	Nanofiltración con disolventes orgánicos.....	40
4.4.1.	Primera etapa: separación de glicéridos a partir de una membrana de 600 Da	41
4.4.1.1.	<i>Diafiltración por flujo tangencial usando la membrana de 600 Da</i>	43
4.4.2.	Segunda etapa: Concentración de compuestos con un peso molecular superior a 150 Da	43
4.5.	Determinación de actividad antioxidante y antimicrobiana en el extracto y en las fracciones nanofiltradas de semillas de cáñamo.....	44
4.5.1.	Actividad antioxidante por el método de captación del radical DPPH.....	44
4.6.	Determinación de actividad antimicrobiana por difusión en disco	45
4.6.1.	Material biológico	45
4.6.2.	Activación de las cepas bacterianas	45
4.6.3.	Resguardo de las cepas patógenas.....	46
4.6.4.	Conteo microbiano.....	46
4.6.5.	Evaluación de la actividad antimicrobiana	46
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1.	Caracterización proximal de la semilla de cáñamo.....	48
5.2.	Extracción de la fracción no polar con hexano	49
5.3.	Nanofiltración con disolventes orgánicos.....	50
5.3.1.	Primera etapa de nanofiltración (NF-E1) usando membrana de 600 Da	51
5.3.2.	Segunda etapa de nanofiltración (NF-E2) usando una membrana de 150 Da	54
5.3.3.	Análisis global del sistema de fraccionamiento por nanofiltración	56
5.3.4.	Primera etapa de nanofiltración (NF-E1) usando una membrana de 600 Da.....	57
5.3.5.	Segunda etapa de nanofiltración (NF-E2) usando una membrana de 600 Da	57
5.4.	Determinación de actividad antioxidante.....	59
5.4.1.	Actividad antioxidante del aceite de semilla de cáñamo crudo	59
5.4.2.	Primera etapa de nanofiltración (NF-E1) usando una membrana de 600 Da.....	60
5.4.3.	Segunda etapa de nanofiltración (NF-E2) usando una membrana de 150 Da	61
5.5.	Actividad antimicrobiana del aceite crudo de semilla de cáñamo y sus fracciones obtenidas por nanofiltración.....	62
5.5.1.	Crecimiento de microorganismos patógenos.....	62
5.5.2.	Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco	63
6.	CONCLUSIONES	67

7.	PERSPECTIVAS	69
8.	REFERENCIAS	70
9.	APÉNDICE	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perfil nutricional de cannabinoides en diferentes partes de la planta de cáñamo	3
Figura 2. Principales compuestos bioactivos presentes en el aceite de la semilla de cáñamo... 8	
Figura 3. Esquema general del funcionamiento de una membrana de filtración.	17
Figura 4. Clasificación de membranas en función de su material, distribución de poros y estructura.	19
Figura 5. Clasificación de membranas en función de su distribución de poros a lo largo del espesor de la membrana	19
Figura 6. Esquema de la configuración de membranas en modo de flujo normal.	21
Figura 9. Proceso de refinación y recuperación de disolventes usando membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos.....	27
Figura 10. Equipo de nanofiltración (MET cell) con celdas de flujo tangencial	28
Figura 11. Esquema de la metodología general desarrollada en el presente proyecto.	36
Figura 12. Sistema de nanofiltración METcell Cross-Flow System en configuración de flujo normal.	41
Figura 13. Sistema de nanofiltración METcell Cross-Flow System en configuración de flujo tangencial.....	42
Figura 14. Variación del flux de permeado del extracto de aceite de semilla de cáñamo en función del tiempo empleando una membrana de nanofiltración con disolventes orgánicos de 600 Da para las configuraciones de flujo normal y tangencial.	52
Figura 15. Balance de materia de extracto de aceite de cáñamo pasado por membranas de nanofiltración (NF) resistentes a disolventes orgánicos	56
Figura 16 Actividad antimicrobiana del extracto de aceite crudo de la semilla de cáñamo, así como sus fracciones obtenidas por nanofiltración con disolventes orgánicos contra <i>L. monocytogenes</i>	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de la semilla de cáñamo .	4
Tabla 2. Ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de cáñamo	5
Tabla 3. Porcentaje de ácidos grasos presentes en las semillas de distintos aceites vegetales incluyendo el cáñamo	6
Tabla 4. Valores nutricionales de vitaminas y minerales presentes en la semilla de cáñamo.....	7
Tabla 5. Productos naturales presentes en el aceite de semilla de cáñamo.....	8
Tabla 6. Efectos farmacológicos del cannabidiol	9
Tabla 7. Contenido de tocoferoles en aceite de semillas de cáñamo	12
Tabla 8. Resultados de la actividad antioxidante de aceite de semilla de cáñamo	13
Tabla 9. Efecto antimicrobiano del aceite de semilla de cáñamo.	14
Tabla 10. Características generales de los procesos de filtración por membranas.	17
Tabla 11. Principales tipos de membranas de acuerdo a su material de constitución y materiales de empleados en su fabricación	18
Tabla 12. Materiales poliméricos utilizados para la fabricación de membranas resistentes a disolventes orgánicos	20
Tabla 13. Fracciones de los extractos hexánicos de semillas de cáñamo obtenidas por nanofiltración con disolventes orgánicos.	44
Tabla 14. Composición proximal de la semilla de cáñamo sin cáscara comparada con valores reportados en la literatura.....	48
Tabla 15. Porcentaje de aceite extraído de la semilla de cáñamo con hexano empleando extracción Soxhlet y sólido-líquido.	49
Tabla 16. Fraccionamiento esperado de los compuestos reportados en el aceite de semilla de cáñamo mediante nanofiltración en dos etapas según su peso molecular de corte nominal.....	50
Tabla 17. Parámetros de evaluación de la eficiencia de la membrana Borsig de 600 Da en el proceso de nanofiltración con disolventes orgánicos de extractos hexánicos de aceite de semilla de cáñamo en configuración tangencial.	53
Tabla 18. Parámetros de evaluación de la eficiencia de la membrana Duramem de 150 Da en el proceso de nanofiltración en configuración tangencial.	55
Tabla 19. Rendimiento de las fracciones obtenidas en las 2 etapas de nanofiltración con disolventes orgánicos	58
Tabla 20. Actividad antioxidante del aceite crudo de semilla de cáñamo.....	59
Tabla 21. Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas por nanofiltración con disolventes orgánicos empleando membranas de 600 y 150 Da.	60
Tabla 22. Crecimiento de microorganismos patógenos a las 16 y 20 h de incubación.....	63
Tabla 23. Halos de inhibición producidos por las fracciones de nanofiltración contra microorganismos patógenos.	63

1. INTRODUCCIÓN

El cáñamo (*Cannabis sativa* L.) es una planta de origen asiático perteneciente a la familia de las cannabáceas. Se cree que fue cultivada por primera vez en China (2700 a.C.) y se ha distribuido a lo largo del mundo por sus propiedades industriales, terapéuticas, recreacionales y nutricionales. La planta en su totalidad, posee un alto contenido de nutrientes como son: proteína (25-30%), fibra (30-40%) y aceite (25-35%) [1,2], así como también compuestos que han mostrado distintas actividades biológicas relacionadas a la salud (antiinflamatorias, anticancerígenas, anticonvulsivas, analgésicas, antieméticas, entre otras [3–5]). Uno de los productos que puede obtenerse de la semilla de cáñamo es el aceite, el cual se caracteriza por ser rico en ácidos grasos poliinsaturados y contener compuestos antioxidantes como el γ -tocoferol [2,6,7]. Se ha reportado que este compuesto tiene un alto potencial en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo [8,9].

Por otra parte, para la obtención y purificación de compuestos bioactivos existen distintos métodos de separación a través de procesos térmicos como son la destilación y la cristalización; sin embargo, estos procesos involucran altos gastos energéticos y la posible degradación de compuestos termosensibles. La selección de un método de extracción es muy importante considerando que un método adecuado permite maximizar los rendimientos, optimizar los procesos, disminuir costos y obtener productos de mayor calidad. La tecnología de membranas permite llevar a cabo la concentración y purificación de compuestos de manera más eficiente en términos energéticos, con menor impacto ambiental y una mayor preservación de compuestos termolábiles. Dentro de los procesos con membranas, la nanofiltración con disolventes orgánicos es un proceso que se caracteriza por su alta selectividad y disminución de pérdidas de compuestos sensibles al daño térmico; siendo esta tecnología aplicada actualmente en el proceso de refinación de aceites (descerado y eliminación de ácidos grasos libres) y concentración de compuestos de interés. Con base en lo anterior, el presente trabajo permitirá obtener un extracto y fraccionamiento de los compuestos bioactivos presentes en el aceite de la semilla de cáñamo empleando nanofiltración con disolventes orgánicos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del cáñamo

El cáñamo (*Cannabis sativa* L.) es una planta anemófila que pertenece al orden de las urticales y a la familia de las cannabáceas. El origen exacto del cáñamo se desconoce, sin embargo, se cree que su cultivo inició en China y posteriormente se extendió a países mediterráneos de Europa central, así como a Afganistán y Pakistán [10]. Esta planta se caracteriza por poseer ramas largas que se componen de 3 a 13 hojas palmeadas, y posee una altura de 1 a 5 m. Su crecimiento se ve favorecido en climas templados; sin embargo, puede adaptarse a climas helados [11]. Dentro del género *Cannabis* pueden encontrarse 3 especies de acuerdo a la morfología de la planta: *Cannabis sativa* L. var. *sativa*: llamada comúnmente cáñamo industrial, usada para la obtención de fibra por su bajo contenido de compuestos psicoactivos que va del 0.2 al 0.3% [12]; *Cannabis sativa* L. var. *indica* (*marihuana*): posee un alto contenido de tetrahidrocannabinol (3-15%) (THC), el cual es un cannabinoide psicoactivo, por lo que es cultivada con fines narcóticos/recreativos; y *Cannabis sativa* L. var. *ruderalis* que tiene una composición intermedia entre las dos variedades mencionadas anteriormente y se considera una variedad salvaje [10,13]. Como se mencionó anteriormente, la principal diferencia entre la marihuana y el cáñamo industrial radica en su contenido de THC, ya que la primera puede llegar a contener del 3 al 15 % de THC en peso, mientras que el cáñamo industrial y otras fibras y semillas de cannabis oleaginosas generalmente contienen menos del 1% de este compuesto [14].

El cáñamo industrial ha sido ampliamente usado por el hombre, debido a la diversidad de características que posee, entre las cuales destacan la medicina tradicional y la obtención de la fibra textil para la fabricación de ropa, papel y otros productos industriales y alimentarios [13]. La hoja de cáñamo es la parte de la planta de esta especie que presenta mayor contenido de cannabinoides (1.1-2.1%) en comparación con el resto de la planta. Con respecto al contenido de THC, esta planta puede tener hasta 0.93% de este compuesto, el cual es bajo, comparado con la especie psicoactiva *Cannabis indica* la cual posee alrededor del 15 % [15]. Las hojas de cáñamo e inflorescencias se han usado principalmente para la obtención de fitoquímicos medicinales debido a su contenido de diversos metabolitos secundarios, tales como terpenoides y flavonoides. Adicionalmente, el cáñamo se ha usado para la obtención de aceites esenciales y fragancias con aplicación potencial en el campo alimentario. Por otro lado, debido a su alto contenido de fibra (23.1%), el tallo se usa principalmente para la obtención de fibras leñosas para

la industria de textiles, materiales de construcción (concreto), y fabricación de papel [16]. En la Figura 1 se indica la información nutricional y el porcentaje de cannabinoides presentes en diferentes partes de la planta de cáñamo [16].

Por otra parte, el porcentaje de grasas en la semilla de cáñamo es mayor que en las demás partes de la planta (25-35%), por lo que esta semilla tiene un gran potencial para la producción de aceite con posible uso alimenticio y nutraceutico. Además de esto, la semilla de cáñamo se caracteriza por tener un bajo contenido de THC (0.003%) y un alto contenido de proteína (20-25%) y fibra (20-30%), los cuales son compuestos de importancia nutrimental. Considerando lo anterior, la semilla de cáñamo se puede usar para obtener productos como harina, concentrados proteicos, aditivos para fortificación o enriquecimiento de alimentos, fertilizantes, alimento para ganado y aceite comestible con propiedades funcionales [16].

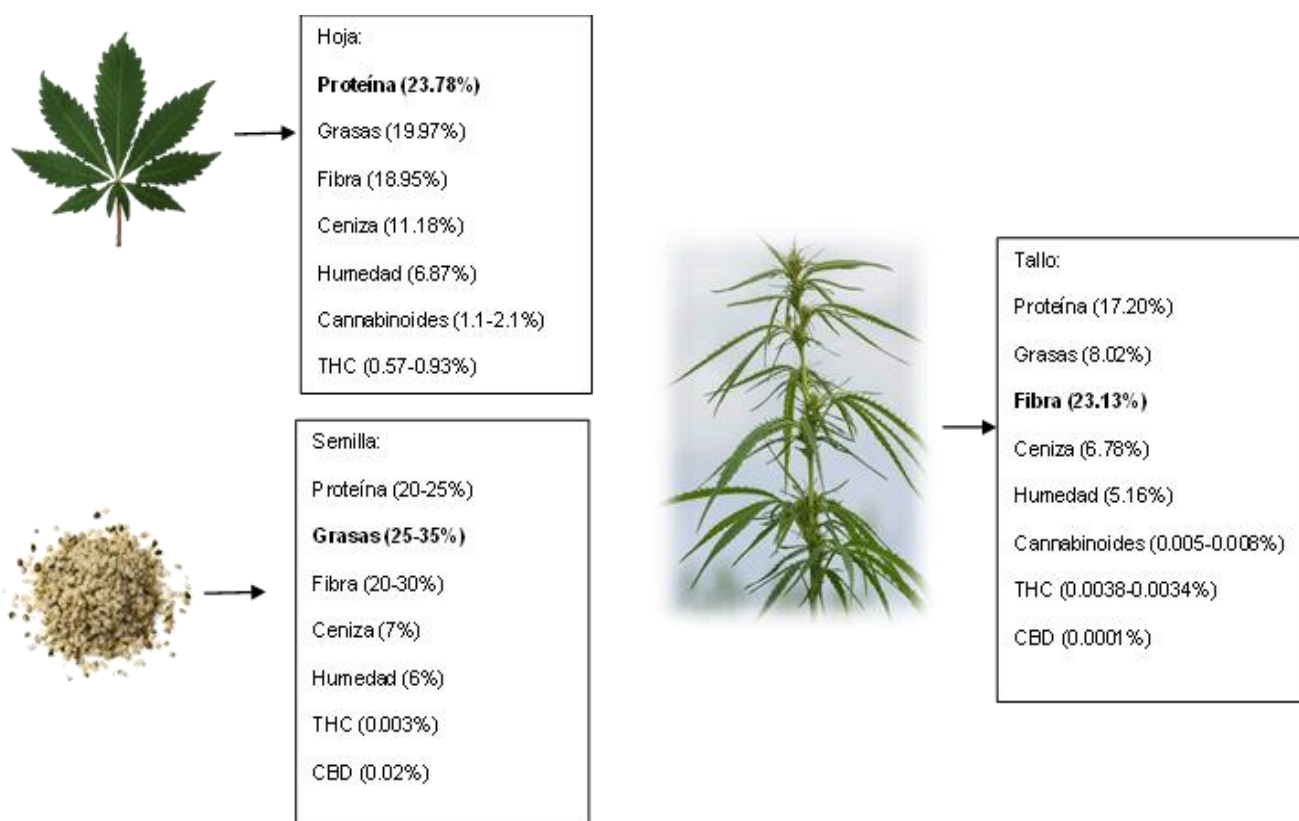


Figura 1. Perfil nutricional de cannabinoides en diferentes partes de la planta de cáñamo (*Cannabis sativa* L.) [16].

2.1.1. Semilla de cáñamo

En un inicio, la semilla de cáñamo se consideraba como un subproducto agroindustrial para la obtención de fibra; sin embargo, el descubrimiento de su alto valor nutricional y funcionalidad, ha

promovido recientemente su producción a nivel industrial. La cantidad y el tipo de compuestos presentes en la semilla de cáñamo pueden variar de acuerdo a la especie y edad de la planta, así como a las condiciones del cultivo. Las variedades genéticas están definidas por el lugar de origen, que da lugar a distintos ecotipos de cáñamo. En cuanto al contenido de cannabinoides como el THC y el CBD, es importante señalar que estos compuestos no son sintetizados en la semilla; su presencia en esta se considera resultado de una contaminación externa, principalmente por contacto con las flores o estructuras resinosas de la planta durante la cosecha o el procesamiento; es por ello que las semillas de cáñamo certificadas deben cumplir estrictamente con las normas dictadas por la Unión Europea, y poseer un contenido de THC inferior al 0.003% en la cosecha. Por otra parte, el cannabidiol (CBD) es otro de los cannabinoides que puede estar presente en la semilla de cáñamo; sin embargo, a diferencia del THC, este compuesto no posee actividad psicotrópica. El CBD se produce y almacena principalmente en las estructuras glandulares de la planta (en proporciones mayores que el THC) y a pesar de que tampoco se produce en la semilla, ésta lo contiene en cantidades que pueden ir de 5 a 1000 mg/kg de acuerdo a la variedad de la que se trate, condiciones de cultivo, etc. [17,18].

2.1.2. Composición nutrimental

La semilla de cáñamo contiene distintos compuestos con valor nutricional, dado que algunas de sus macromoléculas, como lípidos y proteínas, son de un alto valor biológico. En la Tabla 1 se presenta la composición nutricional de la semilla de cáñamo reportada por Callaway [1], en la que se observa que uno de sus principales componentes de estas semillas son los lípidos (35.5%).

Tabla 1. Composición nutricional (%) de la semilla de cáñamo [1].

Composición	%
Carbohidratos	27.6
Lípidos	35.5
Proteína	24.8
Humedad	6.5
Cenizas	5.6
Fibra dietética total	27.6
Energía (kJ/100 g)	2200

Carbohidratos: El porcentaje de carbohidratos que compone la semilla de cáñamo puede ir del 20 al 30% [19], del cual, entre el 10 y el 15% corresponden a fibra [6].

Fibra: La semilla de cáñamo presenta un porcentaje de fibra dietética total del 27.6%, la cual se compone por 20% de fibra soluble y 80% de fibra insoluble. La fibra dietética total de la semilla de cáñamo está formada en su mayoría por los siguientes componentes (g/1000g): celulosa (67-78), hemicelulosa (16-18), pectinas (0.8) y lignina (3.5-5.5) [7].

Proteínas: La semilla de cáñamo tiene un contenido de proteína mayor (20-25%) comparado con el de otras semillas, como las de girasol (20%) y canola (19.5%), lo que muestra su gran potencial como fuente proteica industrial. Adicionalmente, estas proteínas tienen un perfil de aminoácidos equilibrado, que incluye los 9 aminoácidos esenciales: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. Por otro lado, la proteína de cáñamo es altamente digerible [20], presentando globulina de tipo leguminosa y albumina de tipo globular que se caracterizan por su calidad nutricional y fácil digestión [16]. Estas proteínas están constituidas por 60-80% de globulinas y 20-40% de albúminas.

Grasas: La semilla de cáñamo posee un porcentaje de grasas totales que va del 25 al 35% de acuerdo a la variedad genética de la planta y las condiciones de cultivo. Esta semilla contiene alrededor del 10% de ácidos grasos saturados: 5% de ácido palmítico, 1.5% de ácido esteárico y 0.2% de ácido behénico [21]. Por otra parte, la fracción lipídica se caracteriza por ser rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's, por sus siglas en inglés) que representan del 15 al 22% de la fracción lipídica total. La Tabla 2 presenta los ácidos grasos identificados en el aceite de semilla de cáñamo, reportados por Leizer et al. [17]. Como puede observarse, los dos ácidos grasos que se encuentran en mayor proporción en la semilla de cáñamo son el ácido linoleico (52-62%) y α -linolénico (12-23%). Estos ácidos grasos esenciales están presentes en una proporción estimada entre 3/1 y 5/1, que está dentro de los rangos recomendados por los especialistas en nutrición [19,22,23].

Tabla 2. Ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de cáñamo (*Cannabis sativa* L.) [19].

Componente	% (p/p)
Ácido linoleico (18:2n6)	52-62
Ácido α-linolénico (18:3n3)	12-23
Ácido oleico (18:1n9)	8-13
Ácido palmítico (16:0)	5-7
Ácido esteárico (18:0)	1-2
Ácido γ -linolénico (18:3n6)	3-4
Ácido eicosanoico (20:0)	0.39-0.79
Ácido eicosenoico (20:1)	0.51

Por otra parte, Deferne y Pate [19] compararon el perfil de ácidos grasos esenciales presentes en el aceite de semilla de cáñamo con el de aceites comestibles como el de soya, canola, maíz y palma (Tabla 3). En el estudio se observa que el aceite de semilla de cáñamo contiene ácido linolénico en mayor proporción que los aceites previamente mencionados (15-25%). Asimismo, como se puede observar en la Tabla 3, si bien el contenido de ácido linoleico presente en aceite de maíz es alto (59%); el aceite de semilla de cáñamo puede alcanzar proporciones hasta del 70% [19].

Tabla 3. Porcentaje de ácidos grasos presentes en las semillas de distintos aceites vegetales incluyendo el cáñamo [19].

Aceite	Ácidos grasos saturados		Ácidos grasos monoinsaturados	Ácidos grasos poliinsaturados	
	%		%	%	
	Palmítico (C16:0)	Estearico (C18:0)	Oleico (C18:1n9)	Linoleico (LA) (C18:2n6)	Linolénico (LNA) (C18:3n3)
Cáñamo	6-9	2-3	10-16	50-70	15-25
Soya	9	6	26	50	7
Canola	0	7	54	30	7
Maíz	0	17	24	59	0
Palma	85	0	13	2	0

El beneficio de los ácidos grasos esenciales en el organismo también se atribuye a los productos que se sintetizan a partir de ellos mediante las rutas bioquímicas a nivel celular. Por ejemplo, las transformaciones del ácido linoleico (LA) a ácido araquidónico (AA), y del ácido linolénico (LNA) a ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), promueven la formación de prostaglandinas involucradas en distintas funciones en el organismo, tales como la respuesta antiinflamatoria e inmunoreguladora [17].

Vitaminas y minerales: Por otro lado, además de su alto contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos, esta semilla posee vitaminas y minerales, tales como la vitamina E (tocoferol), la cual se caracteriza por actuar como un antioxidante natural. Como puede observarse en la Tabla 4, el contenido de esta vitamina en la semilla de cáñamo es mayor que en las semillas de soya y girasol (105 y 2.5 veces más, respectivamente), lo que muestra su potencial como una excelente fuente de vitamina E. Asimismo, se ha reportado que el contenido de materia inorgánica en la semilla de cáñamo es del 5.6%, lo que se ha atribuido a un alto contenido de minerales como calcio, zinc, magnesio, fósforo, potasio, azufre y hierro [1,7,24]. De acuerdo a la

Tabla 4, la semilla de cáñamo tiene una mayor proporción de fósforo, magnesio, sodio, manganeso, zinc y cobre, en comparación con los presentes en las semillas de soya y girasol [7].

Tabla 4. Valores nutricionales de vitaminas y minerales presentes en la semilla de cáñamo (*Cannabis sativa* L.) [7].

Componente	mg/100 g	Soya	Girasol
Vitamina E	90	0.85	35.17
Tiamina (B1)	0.4	0.874	1.48
Riboflavina (B2)	0.11	0.87	0.35
Fósforo	1160	704	660
Potasio	859	1797	645
Magnesio	483	280	325
Calcio	145	277	78
Hierro	14	15.7	5.25
Sodio	12	2	9
Manganeso	7	2.5	1.95
Zinc	7	4.89	5
Cobre	2	1.658	1.8

2.2. Compuestos bioactivos

De manera general, la semilla de cáñamo está compuesta por metabolitos primarios como proteínas, polisacáridos y ácidos grasos, y metabolitos secundarios que incluyen los siguientes: cannabinoides, flavonoides, terpenos, lignanos y alcaloides [12]. De acuerdo a Kanabus et al. [10], se han identificado alrededor de 750 compuestos naturales en el cáñamo que representan principalmente 4 diferentes clases químicas (fenoles, terpenos, alcaloides y cannabinoides) [13,25]. La Figura 2 ilustra los principales compuestos bioactivos presentes en la semilla de cáñamo. En este sentido, Leizer et al. [17] reportaron los principales productos naturales presentes en el aceite de semilla de cáñamo (Tabla 5).

Tabla 5. Productos naturales presentes en el aceite de semilla de cáñamo (*Cannabis sativa* L.) [17].

Componentes	Valor reportado [17]
Cannabidiol (CBD)	10 mg/kg
Δ -9-Tetrahidrocannabinol (THC)	Nd
Mirceno	160 mg/L
β -cariofileno	740 mg/L
β -sistosterol	100-148 g/L
α -Tocoferol	Tr
γ -Tocoferol	468 mg/L
Metil-salicilato	Tr

Tr: trazas, Nd: no detectable

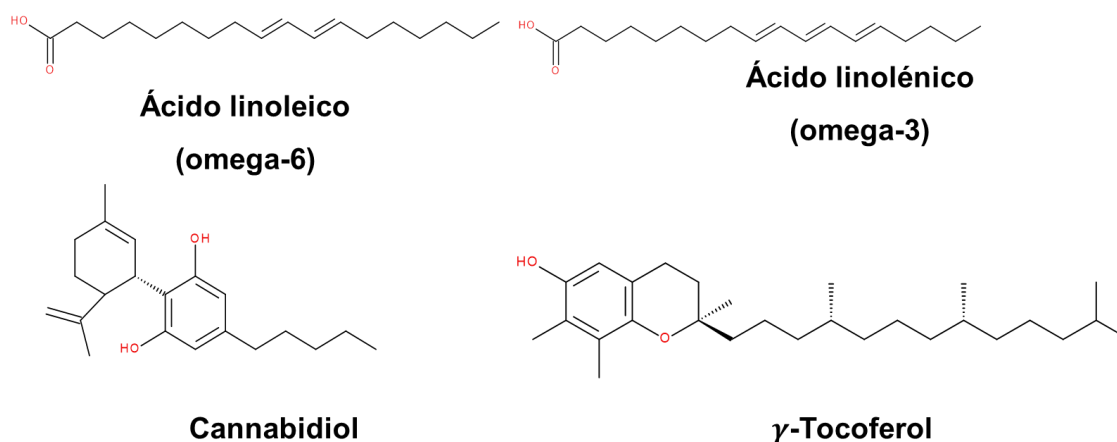


Figura 2. Principales compuestos bioactivos presentes en el aceite de la semilla de cáñamo.

A continuación, se describe la importancia de los compuestos presentes en el aceite de semilla de cáñamo.

Cannabidiol (CBD): Dentro de los principales compuestos bioactivos del cáñamo se encuentran los cannabinoides como el CBD. A diferencia del THC, el CBD no presenta efectos psicoactivos [6], y se le han atribuido distintas propiedades benéficas a la salud [17]. Éste es uno de los compuestos presentes en la semilla de cáñamo que ha captado mayor interés científico debido a que se ha demostrado su actividad terapéutica para tratar diversas enfermedades, tales como dolores intensos, convulsiones, ansiedad, náuseas y otros desordenes neuropsiquiátricos [5]. Adicionalmente, se ha reportado la efectividad del CBD como alternativa en el tratamiento del cáncer de mama, ya que es capaz de matar las células de este cáncer al inducir estrés celular

en el retículo endoplásmico e inhibir la señalización de proteínas responsables de la división celular [13]. En otro trabajo, se reportó el efecto antiproliferativo y antiinvasivo del CBD en gliomas (células de tumores cerebrales) [26]. Por otra parte, el CBD también puede actuar como compuesto antiinflamatorio, por lo que se ha investigado su efecto en personas con esclerosis múltiple, migraña y dolor reumático [27,28]. Actualmente existen medicamentos comerciales desarrollados a partir de CBD, como es el caso de Epidiolex, el cual es usado para tratar las convulsiones asociadas con el síndrome de Lennox-Gastaut enfermedad en la que se desarrollan encefalopatías epilépticas [25]. A continuación, la Tabla 6 presenta algunos de los efectos farmacológicos del CBD reportados por Pisanti et al. [29].

Tabla 6. Efectos farmacológicos del cannabidiol [29].

Enfermedad	Efecto farmacológico
Alzheimer	Antiinflamatorio, antioxidante, antiapoptótico en modelos in vitro e in vivo de respuestas neuroinflamatorias y neurodegenerativas.
Parkinson	Control del deterioro dopaminérgico in vivo; neuroprotección; reducción de agitación, pesadillas y de comportamiento agresivo en pacientes.
Esclerosis múltiple	Mejora de la encefalomielitis autoinmune en ratones, propiedades antiinflamatorias e inmonomoduladoras.
Epilepsia	Efecto anticonvulsionante; reducción de la frecuencia de convulsiones en niños y adultos con epilepsia.
Huntington	Efecto neuroprotector y antioxidante en modelos transgénicos de ratones.
Hipoxia-isquemia	Efectos neuroprotectores a corto plazo; inhibición de la excitotoxicidad, del estrés oxidativo y de la inflamación in vitro e in vivo.
Dolor	Efecto analgésico en pacientes con dolor neuropático.
Ansiedad	Reducción de la tensión muscular, inquietud, fatiga y problemas de concentración; mejora de las interacciones sociales y reducción de ansiedad y estrés en modelos de ansiedad en roedores.
Depresión	Efecto antidepresivo en modelo de roedores.
Cáncer	Acciones antiproliferativas y antiinvasivas en una amplia gama de tipos de cáncer; estudios en modelos celulares.
Náuseas	Supresión de náuseas y bostezo en ratas.
Enfermedades inflamatorias	Propiedades antiinflamatorias en varios modelos in vitro e in vivo; inhibición de citocinas y vías inflamatorias.
Artritis reumatoide	Inhibición del FNT- α (Factor de necrosis tumoral) en modelos animales
Infecciones	Actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina.

Intestinal y de Crohn	Inhibición del reclutamiento de macrófagos y secreción de FNT- α (Factor de necrosis tumoral); reducción en el índice de actividad de la enfermedad en pacientes de Crohn.
Enfermedades cardiovasculares	Reducción de la gravedad de infarto a través de propiedades antioxidantes y antiinflamatorias in vitro e in vivo.
Complicaciones diabéticas	Atenuación de la fibrosis y disfunción miocárdica.

A pesar de que el contenido de CBD presente en el aceite de semilla de cáñamo no es elevado (5-1000 mg/kg) [17,18] en comparación con el de otras partes de la planta, como las hojas, su presencia y posible aislamiento, purificación y/o concentración pueden proporcionar algunos de los beneficios mencionados anteriormente. Por otro lado, además del CBD existen otros metabolitos secundarios que están presentes en el aceite de semilla de cáñamo, los cuales presentan distintas actividades biológicas, algunas de las cuales se describen a continuación.

Terpenos: Los terpenoides son un grupo de moléculas derivadas de la ruta del mevalonato (MVA) y se encuentran principalmente en aceites esenciales. Su presencia en el aceite de semilla de cáñamo contribuye al aroma de la planta, dando notas similares al lúpulo, el pino, la lima y otras especias [30]. Los terpenos que se encuentran en mayor proporción en el aceite de semilla de cáñamo son el β -cariofileno y mirceno (740 y 160 mg/L respectivamente). La presencia de estos compuestos en el aceite de cáñamo pueden aportar propiedades antiinflamatorias, citoprotectoras, y antioxidantes [17,31].

β -sitosterol: En el aceite de semilla de cáñamo, éste compuesto se encuentra en proporciones que van de 100 a 148 mg/L [17]. Se ha reportado que este compuesto contribuye a la reducción de la hipercolesterolemia [17], además de poseer actividad antiinflamatoria y antimicrobiana [7,17]. En este sentido, Lees et al. [32] y Mattsson et al. [33] reportaron que el β -sitosterol presentó actividad efectiva en la inhibición de la captación de colesterol plasmático en el intestino de seres humanos adultos.

Tocoferoles: El contenido de vitaminas de la semilla de cáñamo es elevado, con una prevalencia de vitamina E. Esta vitamina puede encontrarse en forma de α , β , δ , y γ tocoferol, siendo el γ -tocoferol la forma predominante en esta semilla (con proporciones de hasta 468 mg/L). Los tocoferoles son compuestos que poseen una alta capacidad antioxidante, y se les atribuyen distintas propiedades según sea la forma en que se encuentran. Se ha demostrado que el γ -tocoferol es el compuesto más efectivo contra las enfermedades coronarias [17] y puede inhibir la peroxidación de lípidos, reduciendo la formación de productos mutagénicos en el intestino [34].

La actividad biológica de los tocoferoles se atribuye a que éstos minimizan el daño causado por radicales libres en el organismo gracias a su actividad antioxidante.

2.3. Actividad biológica

La semilla de cáñamo no solo se distingue por su perfil nutricional, sino también por su contenido de compuestos bioactivos, que tienen distintos beneficios a la salud, como son propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, neuroprotectoras, etc. [23]. Diversos estudios reportados en la literatura han mostrado los beneficios a la salud que aporta el cáñamo [6,10,23]. Por otro lado, a pesar de que pueden usarse distintas partes de la planta, las hojas y las semillas han sido las más utilizadas. Los efectos a la salud de la semilla de cáñamo, se atribuyen a la presencia de compuestos bioactivos como los mencionados en la Sección 2.3; asimismo, estos compuestos contribuyen a las distintas actividades biológicas de la semilla, entre las que destacan su actividad antioxidante y antimicrobiana.

2.3.1. Antioxidante

La actividad antioxidante se refiere a la capacidad de una sustancia o compuesto para contrarrestar el efecto de los radicales libres presentes en el medio del alimento o matriz biológica. Los radicales libres, son especies químicas altamente reactivas que pueden causar daños en el ADN, lípidos y proteínas, y se han asociado al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, como la carcinogénesis y la cardiopatía coronaria [22]. Existen distintas pruebas para determinar la actividad antioxidante de una sustancia, entre las que destacan las siguientes:

Ensayo de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•): El DPPH• es un radical que se caracteriza por ser altamente reactivo. Se trata de un cromógeno de color púrpura que contiene un grupo nitroxilo que reacciona con otros compuestos para formar enlaces covalentes [35]. El ensayo de captación del DPPH• se basa en la donación de electrones de compuestos antioxidantes que captan el radical DPPH• [35], cambiando de esta forma su color púrpura a uno amarillo claro. La intensidad del cambio de coloración puede ser medida mediante un espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 515 nm.

Ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, por sus siglas en inglés): La capacidad antioxidante equivalente de Trolox mide la capacidad de los compuestos antioxidantes de prueba para eliminar o neutralizar el catión radical estable ABTS•+, el cual es un cromóforo azul verdoso [36]. En esta reacción los antioxidantes presentes en la muestra reaccionan con el radical, ya sea por donación de electrones o por donación de átomos de hidrógeno, haciendo que su coloración cambie a un amarillo claro. La intensidad del cambio de coloración se mide a

734 nm y los resultados se reportan como equivalentes de Trolox (ET) [35]. El Trolox es un compuesto análogo a la vitamina E y se utiliza como un estándar para la medición de la capacidad antioxidante de una muestra.

Ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP, por sus siglas en inglés): Esta técnica se basa en la reducción en medio ácido del complejo ligando de iones férricos (Fe^{3+}) a su forma ferrosa (Fe^{2+}), que posee un color azul intenso, en presencia de compuestos antioxidantes [35]. La actividad antioxidante se obtiene mediante la medición de la absorbancia a 593 nm con un espectrofotómetro UV-vis, y los resultados pueden expresarse en relación a un antioxidante estándar como el Trolox (ET). Para el ensayo FRAP original se usa 2,4,6-tripiridil-s-triazina como ligando de unión al hierro.

Reportes de actividad antioxidante en la semilla de cáñamo.

Como se mencionó anteriormente, la semilla de cáñamo es rica en tocoferoles, compuestos a los que se les atribuyen propiedades antioxidantes y que pueden ayudar a reducir el riesgo de patologías causadas por el estrés oxidativo en el organismo. El tocoferol es uno de los principales compuestos que contribuye a la actividad antioxidante de la semilla de cáñamo. Smeriglio et al. [22] reportaron un contenido de tocoferoles totales en la semilla de cáñamo de 114 mg/kg de aceite (Tabla 7), con mayor proporción del γ -tocopherol (91.6 mg/kg), seguido del α -tocopherol (19.7 mg/kg). Los autores también evaluaron la actividad antioxidante de las fracciones lipofílicas e hidrofílicas del aceite de semilla de cáñamo (variedad *Finola*), así como del aceite puro (Tabla 8). Como puede observarse en la Tabla 8, el aceite de semilla de cáñamo presenta mayor actividad que las fracciones lipofílicas e hidrofílicas. En este estudio, se realizó una extracción de los compuestos polares del aceite de semilla de cáñamo, es por ello que la fracción lipofílica muestra una actividad antioxidante inferior a la del aceite en conjunto; sin embargo, se puede observar que la fracción lipofílica presentó mucho mayor actividad antioxidante que la hidrofílica, lo que se atribuye a la naturaleza lipofílica de los compuestos antioxidantes con mayor poder antioxidante, particularmente los tocoferoles.

Tabla 7. Contenido de tocoferoles en aceite de semillas de cáñamo (*Cannabis sativa* L.) [22].

	mg/kg
β -tocopherol	0.64
γ -tocopherol	91.57
δ -tocopherol	2.09
α -tocopherol	19.74
Contenido total	114.04

Tabla 8. Resultados de la actividad antioxidante de aceite de semilla de cáñamo [22].

Ensayo	DPPH (mmoles ET/ 100 g PF)	TEAC (μmoles ET/ 100 g PF)	FRAP (μmoles ET/ 100 g PF)
Aceite	146.76 ± 2.840	695.2 ± 45.83	3690.6 ± 15.25
Fracción lipofílica	0.125 ± 0.0037	326.1 ± 33.68	2092.6 ± 64.41
Fracción hidrofílica	0.038 ± 0.0032	74.2 ± 3.47	94.6 ± 3.9

ET: equivalentes Trolox, PF: peso fresco

Por otro lado, Farinon et al. [23] reportaron que la actividad antioxidante del aceite de semilla de cáñamo también puede atribuirse a las fenilpropionamidas, tales como las cannabisininas y la *N-trans*-cafeoliltiramina. En resumen, el aceite de semilla de cáñamo ha demostrado tener una excelente capacidad de estabilización del equilibrio óxido-reductor en sistemas in vitro. La concentración de los compuestos antioxidantes en la semilla depende de varios factores tales como las condiciones agronómicas y edafológicas de cultivo, así como las características fenotípicas y genotípicas de la planta de cultivo [20].

2.3.2. Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se refiere a la capacidad de una sustancia para inhibir o detener el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos o virus. Se ha reportado que el aceite de semilla de cáñamo presenta actividad antimicrobiana contra bacterias, virus y hongos [17,37]; actividad que se atribuye principalmente a los cannabinoides como el cannabidiol CBD, cannabicromeno CBC, cannabigerol CBG, Delta-9- tetrahidrocannabinol Δ-9-THC, y cannabinol CBN [38] . En un estudio, Jin y Lee [39] reportaron la actividad antibacteriana de extractos hexánicos de semilla de cáñamo contra la bacteria causante del acné *Propionibacterium acnes*. La Tabla 9 resume algunos de los efectos antimicrobianos del aceite de semilla de cáñamo.

Tabla 9. Efecto antimicrobiano del aceite de semilla de cáñamo. El porcentaje mostrado corresponde a la disminución porcentual de bacterias viables.

Método de prueba	Microorganismos	mm de halo o % de inhibición	Ref.
Difusión en disco	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Micrococcus luteus</i> + <i>Staphylococcus aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	2.3-3.3 mm	[40]
	<i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Serratia marcescens</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.3-3.0 mm	
Nanofibras a base de acetato y con aceite de semilla de cáñamo	<i>S. aureus</i>	85.3-90.7 %	[41]
Conteo de colonias viables	<i>Propionibacterium acnes</i>	59-99 %	[39]

Como se puede observar en la Tabla 9, el aceite de semilla de cáñamo mostró un halo de inhibición más pronunciado contra bacterias Gram positivas (2.3-3.3 mm de halo de inhibición) que contra bacterias Gram negativas (0.3-3 mm de halo de inhibición). A partir de estos estudios, se puede concluir que el aceite de semilla de cáñamo contiene una mezcla de compuestos (principalmente cannabinoides y terpenos) que poseen actividad antimicrobiana. Desde el punto de vista tecnológico, su aplicación como aditivo en diferentes productos alimenticios y de índole biológica puede ayudar al mantenimiento de la calidad microbiológica y de la inocuidad de dichos productos.

2.4. Extracción de fitoquímicos a partir de semillas oleaginosas

Las semillas de oleaginosas son componentes vegetales que se caracterizan por poseer compuestos de alto valor nutricional y fisiológico, tales como ácidos grasos poliinsaturados y fitoquímicos que presentan propiedades antioxidantes y funcionales [42]. Existen distintos métodos para la obtención de compuestos fitoquímicos a partir de semillas; sin embargo, algunos de ellos utilizan temperaturas altas que pueden afectar los compuestos sensibles al calor. Los métodos de extracción varían de acuerdo a la matriz de interés. Para la obtención de compuestos liposolubles de matrices vegetales, el prensado en frío y la extracción con disolventes orgánicos son dos de los métodos de extracción más utilizados.

2.4.1. Prensado en frío

El prensado en frío es un método que permite la obtención de aceites a partir del prensado de semillas empleando temperaturas por debajo de 50 °C [42]. Golimowski et al. [43] evaluó la calidad de aceite de semilla de cáñamo obtenido por prensado, resaltando la importancia del uso de bajas temperaturas y la eficiencia del prensado en la calidad del aceite obtenido. Por otra parte, Anwar et al. [44] utilizaron este método de extracción para la obtención de aceite de semillas de cáñamo y obtuvieron un rendimiento de 26.9 g de aceite / 100 g de semilla. Una de las principales ventajas de este método, es la ausencia de altas temperaturas, lo que permite obtener un producto de alta calidad nutricional y sensorial. Sin embargo, la desventaja principal de esta tecnología es el rendimiento de aceite en relación a la recuperación total del mismo, llegando a tener pérdidas del 5 al 20%, correspondientes al aceite que se queda en la semilla [42]. Además de esto, el número de ciclos de prensado y las altas presiones aplicadas pueden llegar a degradar ciertos compuestos. Esto implica pérdidas económicas para los productores, lo cual ha llevado a la implementación de métodos alternativos de extracción con el objetivo de minimizar dichas pérdidas. Un ejemplo de estos métodos es la extracción con disolventes orgánicos.

2.4.2. Extracción con disolventes orgánicos

La extracción con disolventes es un proceso que implica el contacto de un disolvente apropiado con una matriz sólida, el cual disuelve y arrastra selectivamente los componentes de interés [45]. En este tipo de extracción es importante considerar el tiempo de procesamiento, el tipo de disolvente a utilizar, el tamaño de partícula, el área de contacto, y las condiciones del proceso, ya que de estos factores dependerá la eficiencia de extracción. Particularmente, el principal factor para obtener un buen rendimiento del proceso de extracción es la polaridad del disolvente y del componente a extraer: entre más similares sean estas polaridades mejor será la extracción. Otro factor importante es la afinidad química del disolvente de extracción por el soluto de interés. La temperatura también juega un rol importante, ya que puede acelerar el proceso de extracción; sin embargo, altas temperaturas pueden provocar la degradación de compuestos termosensibles (principalmente terpenos responsables del aroma y sabor) [45].

Debido a la naturaleza no polar de los metabolitos secundarios presentes en la semilla de cáñamo, tanto a nivel de investigación como industrial se han empleado ampliamente disolventes orgánicos no polares para la extracción de aceites y sus compuestos bioactivos. Dentro de los disolventes más comunes usados para la extracción de compuestos no polares se encuentran los siguientes: n-hexano, n-heptano y ciclohexano. De entre estos disolventes, el hexano, debido

a su alto poder de extracción, accesibilidad, disponibilidad y bajo punto de ebullición (68.7 °C), es el disolvente más comúnmente empleado para extracción de compuestos no polares [42]. Por otra parte, en la extracción con disolventes convencionales es necesario eliminar el disolvente empleado una vez realizada la extracción.

2.5. Métodos de separación

Uno de los métodos de separación más utilizados a nivel industrial para el procesamiento posterior a la extracción con disolventes es la destilación. Esta técnica es usada principalmente en la industria petroquímica, así como también para la obtención de bebidas alcohólicas y disolventes [46]. Su principio de separación está basado en el equilibrio líquido-vapor de las sustancias a separar y su transición de fase. Sin embargo, dado que esta operación involucra altos gastos energéticos y altas temperaturas, desde hace varias décadas en el área de Ingeniería Química se ha trabajado en la búsqueda de nuevos métodos de separación que sean más eficientes energéticamente y económicos. En este sentido, los procesos de separación con membranas presentan ciertas ventajas sobre el proceso de destilación convencional, entre las que se tiene que la separación de compuestos se logra empleando temperaturas de operación moderadas, lo que conlleva menores gastos energéticos. Adicionalmente, la tecnología de membranas puede facilitar el reciclaje de disolventes en frío, lo que ayuda a reducir gastos y favorece el desarrollo de procesos tecnológicos con bajo impacto ambiental.

2.6. Procesos de filtración con membranas

2.6.1. Fundamentos de los procesos de filtración con membranas

Una membrana de filtración se define como una barrera física selectiva a la permeabilidad entre dos fases líquidas homogéneas. Como se observa en la Figura 3, del proceso de separación con membranas se obtienen dos fracciones: el permeado (corriente que atraviesa la membrana) y el retenido (corriente que no pasa la membrana). Por otro lado, la selectividad de la separación deseada, determinada por las propiedades químicas del soluto y del disolvente, debe tomarse en cuenta al definir la estructura de la membrana a utilizar. Existen 4 procesos principales de separación por membranas: microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (OI), los cuales pueden clasificarse de acuerdo a su selectividad o tamaño de poro (Tabla 10).

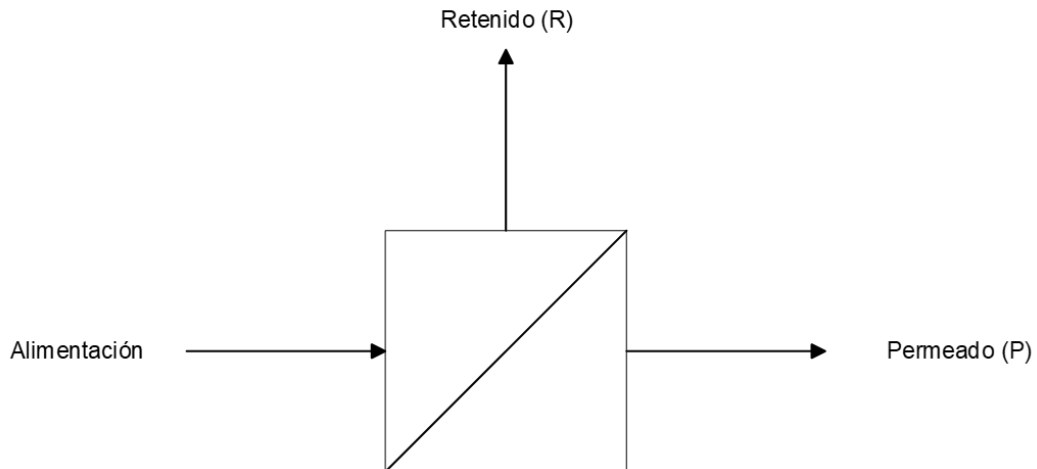


Figura 3. Esquema general del funcionamiento de una membrana de filtración.

Tabla 10. Características generales de los procesos de filtración por membranas.

Proceso	Tamaño de poro/ Peso molecular de corte	Presión (bar)
Microfiltración	0.1-1 μm	< 2
Ultrafiltración	5 kDa-500 kDa	< 7-8
Nanofiltración	100-1000 Da; Rechazo Mg SO_4 35-99.2%	10-40
Ósmosis inversa	Rechazo NaCl 95-99.5%	10-40

La selectividad de una membrana depende de las características del soluto o de las partículas que se desean separar, y puede basarse en mecanismos como la exclusión por tamaño, las diferencias de polaridad o carga iónica, así como el proceso de solución-difusión. Respecto a la primera, la separación de compuestos se da con base en el tamaño de poro de la membrana o en el peso molecular de corte nominal (PMCN). Este último se refiere al peso molecular de una molécula estándar que es retenido por la membrana; es decir, en principio, moléculas con pesos moleculares mayores que el PMCN son retenidas por la membrana. El segundo mecanismo se basa en el rechazo de iones como NaCl o MgSO_4 y aplica para el proceso de ósmosis inversa. Asimismo, el proceso de separación por solución-difusión (NF y OI), se refiere a la disolución y difusión de las sustancias a través del polímero que conforma la membrana. Para que este transporte ocurra de manera eficiente, es necesario aplicar presiones elevadas, en un rango de 30 a 100 bar, las cuales ayudan a vencer la resistencia al paso a través del material polimérico [47]. En este proceso, la afinidad química del soluto y del disolvente con la membrana es de gran importancia.

2.6.2. Clasificación de las membranas de acuerdo a su material y estructura

Las membranas pueden clasificarse según el material del que están fabricadas en membranas poliméricas y de cerámica. Las membranas poliméricas, como su nombre lo indica, están hechas a partir de polímeros. En la Tabla 11 se presentan algunos de los polímeros más utilizados en la fabricación de membranas. Las membranas de cerámica en su mayoría están elaboradas de óxidos de metales (Tabla 11); este tipo de membranas, a diferencia de las poliméricas pueden trabajar a altas temperaturas.

Tabla 11. Principales tipos de membranas de acuerdo a su material de constitución y materiales de empleados en su fabricación [47].

Poliméricas		Cerámica
Naturales modificados	Sintéticos	Inorgánicos
Acetato de celulosa	Poliamida	Óxido de zirconio Alúmina
Acetobutirato de celulosa	Polisulfona	Óxido de titanio
Nitrato de celulosa	Polímeros de vinilo Polifurano	
	Policarbonato	
	Polietileno	
	Polipropileno	
	Poliétersulfona	
	Polihidantoína	
	Sulfuro de polifenileno	
	Caucho de silicona	
	Nailon	

Por otra parte, de acuerdo a su estructura, las membranas se clasifican en integrales y compuestas. Las primeras, se caracterizan por tener una composición homogénea, es decir, están elaboradas de un solo material, mientras que las membranas compuestas están elaboradas de distintos materiales. Asimismo, en función de su distribución de poros a lo largo del espesor de la membrana, las membranas pueden ser simétricas (distribución de poros uniforme) o asimétricas (distribución de poros no uniforme) como se ve en la Figura 5. Es importante mencionar que la mayoría de los materiales convencionales indicados en la Tabla 11 están limitados a aplicaciones con sistemas acuosos, que son los más ampliamente usados a nivel industrial. Sin embargo, en las últimas dos décadas ha habido investigación importante relativa al desarrollo de materiales de membranas resistentes a disolventes orgánicos. En la Figura 4 se resumen distintas clasificaciones de las membranas.

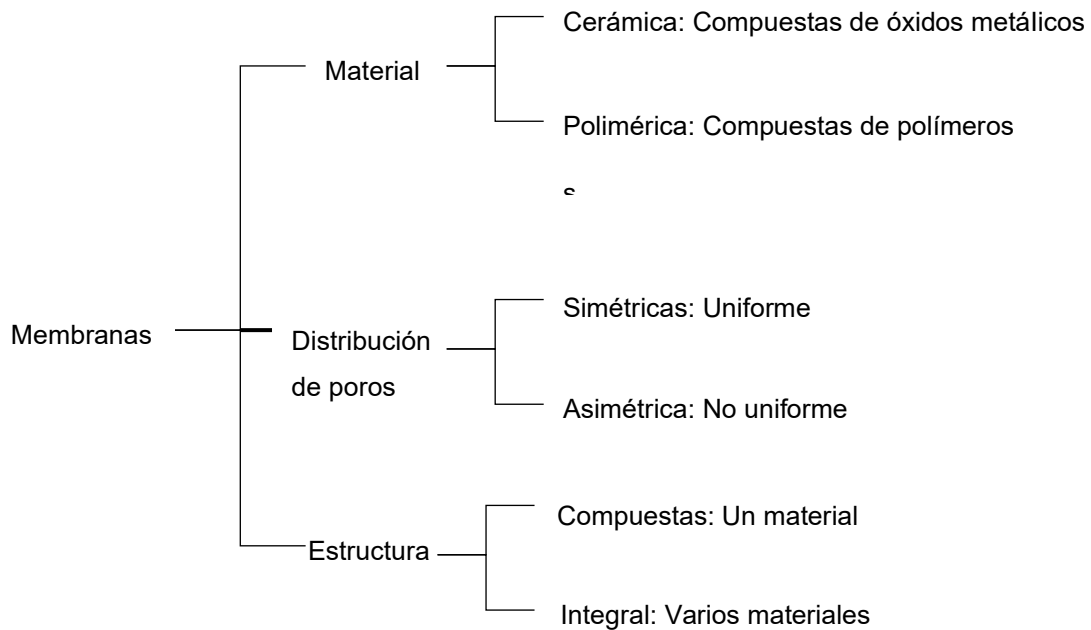


Figura 4. Clasificación de membranas en función de su material, distribución de poros y estructura [48].

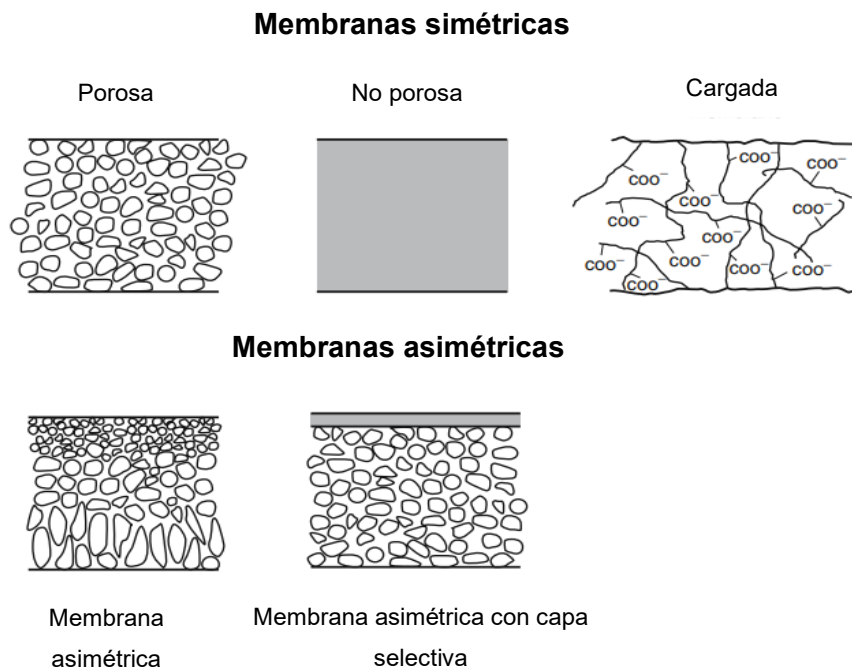
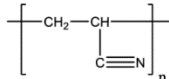
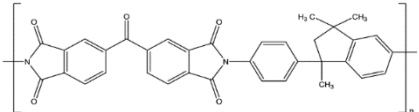
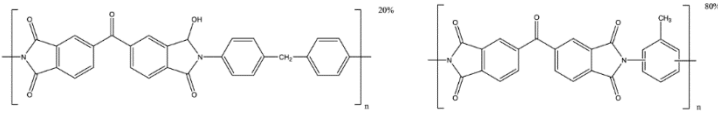
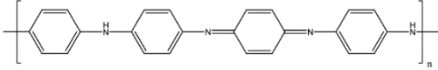
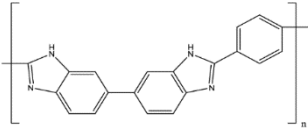


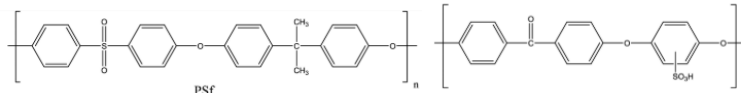
Figura 5. Clasificación de membranas en función de su distribución de poros a lo largo del espesor de la membrana [49].

Por otra parte, las membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos se fabrican con materiales que resisten a distintos disolventes orgánicos. En general, los materiales empleados para estas membranas son de carácter hidrofóbico. Para este fin, se han desarrollado membranas cerámicas y poliméricas con materiales resistentes a estos disolventes. Los materiales de fabricación de las membranas poliméricas resistentes a disolventes orgánicos pueden clasificarse en elastoméricos y vítreos. Los materiales elastoméricos abarcan caucho de silicona (PDMS) y poliuretanos. Normalmente se trata de membranas compuestas, en donde el elastómero constituye una capa “densa” ultrafina. Esa capa se le llama capa activa o capa superficial (skin layer) y es la que le da selectividad a la membrana. Por debajo de la capa activa se encuentra un soporte polimérico poroso. Los materiales vítreos: incluyen poliamidas, poliimidas y polisulfonas. Las membranas fabricadas con estos materiales generalmente son “integrales” (integral skinned), y están constituidas por una capa selectiva asimétrica nanoporosa del material polimérico. A continuación, en la Tabla 12 se presentan algunos de los materiales más empleados en la fabricación de membranas poliméricas resistentes a disolventes orgánicos [50].

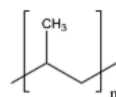
Tabla 12. Materiales poliméricos utilizados para la fabricación de membranas resistentes a disolventes orgánicos [50].

Polímero	Estructura
Poliacrilonitrilo (PAN)	
Matriz de poliimida (PI)	
Poliimida (PI) P84	
Polianilina (PANI)	
Polibenzimidazol (PBI)	

Polisulfona (PSf)+ éter cetona
polisulfonada



Polipropileno (PP)



2.6.3. Configuraciones de flujo

Los modos de operación de los procesos de membrana de acuerdo al flujo de la alimentación se clasifican de manera general en dos: flujo normal y flujo tangencial. A continuación, se describen ambas configuraciones de flujo y su aplicación en procesos de separación.

Flujo normal. En esta configuración, el flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana (Figura 6), por lo que las partículas retenidas se acumulan en la superficie, promoviendo la formación de una capa de sólido retenido, llamada gel. Este tipo de configuración promueve el taponamiento de la membrana, por lo que la velocidad de permeado se ve afectada a medida que la acumulación de sólidos aumenta, hasta llegar a un flujo muy bajo o nulo. Debido a lo mencionado anteriormente, la configuración normal sólo se usa de forma preliminar para evaluar la selectividad y eficiencia de la membrana [47].

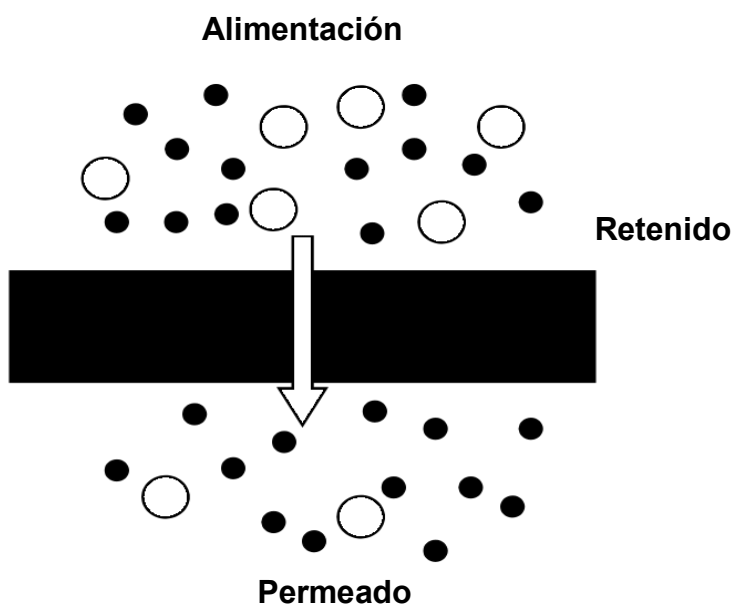


Figura 6. Esquema de la configuración de membranas en modo de flujo normal.

Flujo tangencial. En esta configuración de flujo, la corriente de alimentación fluye de forma tangencial o paralela a la superficie de la membrana [47]. La configuración tangencial evita la formación de geles y favorece el flujo turbulento que evita la deposición de sólidos en la superficie de la membrana (arrastrándolos en la corriente de alimentación), y de esta forma previene el taponamiento de la membrana. Asimismo, las corrientes de flujo tangenciales previenen la formación de gradientes elevados de concentración de solutos cerca de la membrana, evitando de este modo el fenómeno conocido como “polarización de la concentración” que causa reducción en el flux de permeado. Esta configuración es la que se utiliza en los procesos industriales para obtener altos volúmenes de procesamiento. Adicionalmente, es común en los procesos de membrana de flujo tangencial, la utilización de una configuración de recirculación (Figura 7). En esta configuración se tienen dos corrientes de flujo: el permeado que corresponde a la fracción que atraviesa la membrana, y el retenido, el cual no atraviesa la membrana. Esta última corriente se recircula al tanque de alimentación, haciéndolo pasar nuevamente por la membrana por medio de una bomba de desplazamiento positivo.

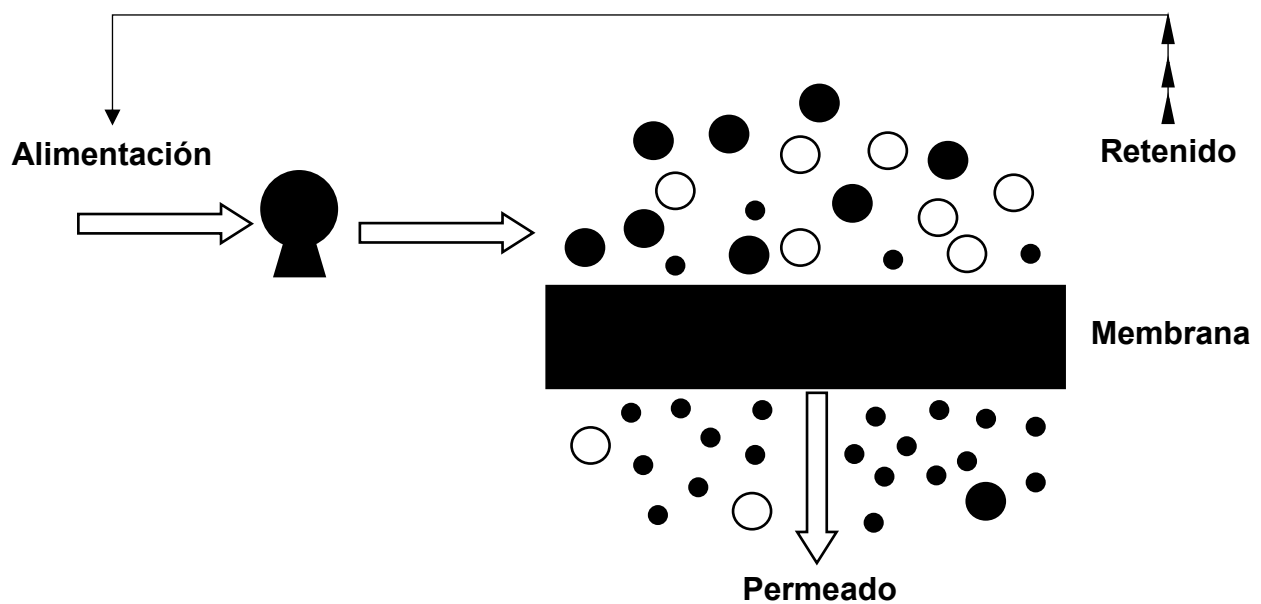


Figura 7. Esquema de configuración de membranas en modo de flujo tangencial y de recirculación del permeado.

Diafiltración. La diafiltración es un proceso que consiste en la adición de disolvente fresco al tanque de retenido para incrementar la recuperación de los compuestos presentes en el permeado o para purificar parcialmente la fracción del retenido (remoción de impurezas). Los compuestos removidos son aquellos que tienen un peso molecular de corte de la membrana, mientras que los de mayor peso se retienen [51]. Este proceso puede llevarse a cabo ya sea en modo continuo (Figura 8a) o en modo lote (Figura 8b). En el primer caso, el disolvente es añadido de forma continua al tanque de alimentación, mientras que en el segundo, el retenido en el tanque de alimentación es mezclado con disolvente nuevo en una sola adición [52]. Asimismo, la diafiltración se puede implementar en modo de un proceso intermitente, en el que se va añadiendo disolvente fresco al tanque de alimentación en intervalos de tiempo definidos.

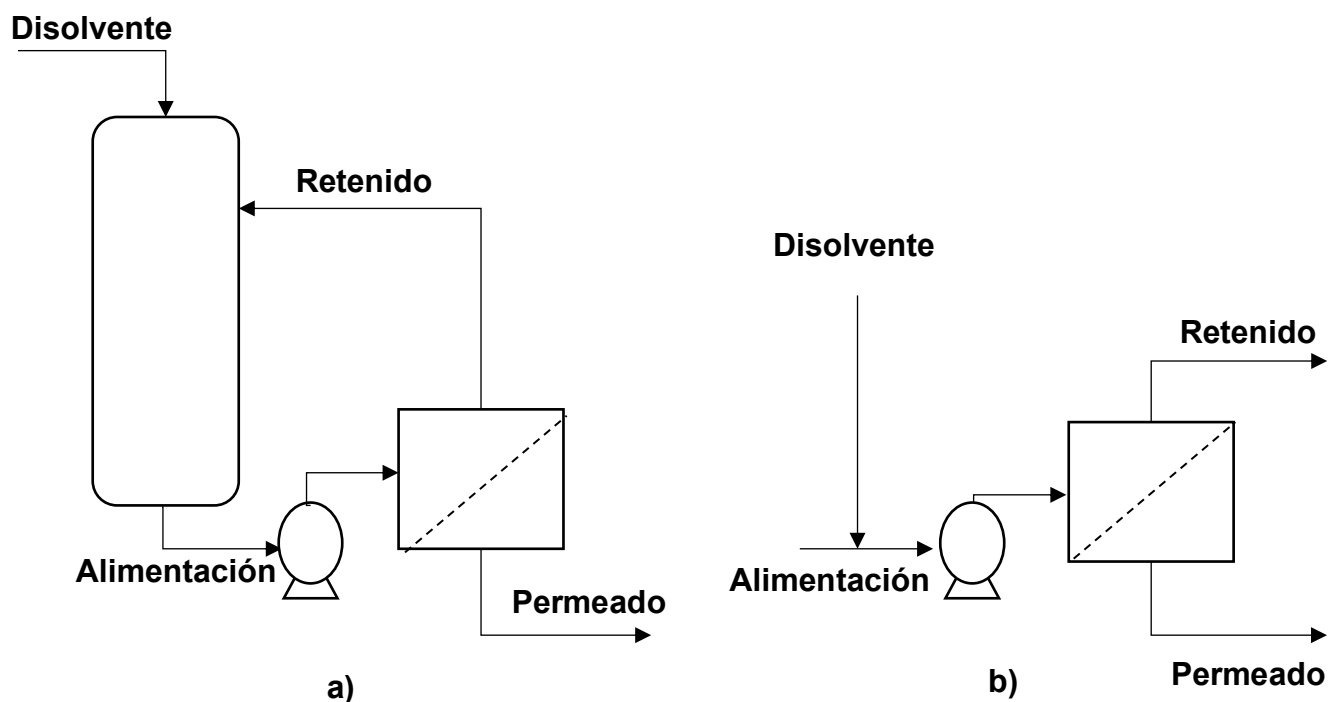


Figura 8. Proceso de diafiltración con membranas. a) modo de operación por lote; b) modo de operación continuo [52].

2.6.4. Parámetros de los procesos de membrana

A continuación, se describen los parámetros que permiten caracterizar los procesos de membrana, tanto por su selectividad, como por su rendimiento volumétrico. Estos parámetros son importantes para definir si una membrana puede ser usada para una aplicación particular de manera efectiva, y también para realizar el escalamiento de un nivel laboratorio o piloto a industrial.

Flux de permeado (L/m²h). Se refiere al volumen de permeado que pasa por la membrana por unidad de área por unidad de tiempo [51]. Se calcula como indica la siguiente ecuación:

$$J = \frac{V_P}{A_m t}; \quad (1)$$

donde:

J: Flux del permeado (L/m²h);

V_P: Volumen de permeado a través de la membrana (L);

A_m: Área superficial de la membrana (m²);

t: Tiempo que tarda en permearse cierto volumen de alimentación (h).

Factor de rechazo (%). Este parámetro indica la capacidad de la membrana para separar distintas partículas o especies químicas o de partículas en las fracciones del permeado y del retenido. A mayor rechazo de un componente i, éste es retenido en mayor proporción por la membrana [51]. Se calcula como sigue:

$$R_i = \left(1 - \frac{C_{Pi}}{C_{Ri}}\right) * 100; \quad (2)$$

donde:

R_i: Porcentaje de rechazo del componente i;

C_{Pi}: Concentración de soluto i en el permeado;

C_{Ri}: Concentración de soluto i en el retenido.

Factor de concentración volumétrico (FCV). Indica la disminución del volumen de la alimentación o la cantidad de volumen filtrado, y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$FCV = \frac{V_i}{V_R}; \quad (3)$$

donde:

V_i: Volumen inicial;

V_R: Volumen final del retenido.

Factor de concentración del componente i (FC_i). Hace referencia a la concentración de los solutos de interés en las fracciones del retenido y del permeado en relación con la corriente de alimentación. Se calcula como sigue:

$$FC_i = \frac{C_{fi}}{C_{oi}}; \quad (4)$$

donde:

C_{fi}: Concentración final del soluto i de interés;

C_{oi}: Concentración inicial del soluto i de interés;

i: Componente o soluto de interés.

Volumen de diafiltración (VD). Se define como el volumen total de disolvente añadido en la diafiltración dividido entre el volumen de retenido [53]. Regularmente se expresa como número de volúmenes de diafiltración.

$$VD = \frac{V_b}{V_s}; \quad (5)$$

donde:

V_b: Volumen de disolvente fresco añadido;

V_s: Volumen de retenido.

2.7. Procesos de nanofiltración para refinación de aceites

La nanofiltración es una operación de separación que puede considerarse como un proceso intermedio entre la ultrafiltración y la ósmosis inversa, y se ha utilizado para concentrar o purificar soluciones diluidas tanto acuosas como orgánicas. El principio de separación de las membranas de nanofiltración se basa en la selectividad de la membrana hacia la separación o rechazo de un soluto de interés particular. Esta selectividad se ve afectada por las características del soluto y las propiedades de la membrana, tales como su polaridad, factor de rechazo y peso molecular de corte. El mecanismo de transporte en este tipo de membranas es de solución-difusión a través de la capa activa de la membrana, que se asume que es densa o no porosa. En un inicio las membranas de nanofiltración sólo eran usadas en sistemas acuosos principalmente para el tratamiento de agua y sistemas acuosos; sin embargo, con el paso del tiempo surgieron membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos que permitieron el desarrollo

de diversas aplicaciones, entre las que destacan su uso en el proceso de refinación de aceites vegetales comestibles.

Por otra parte, para que un aceite vegetal sea de mayor calidad, debe ser sometido a un proceso de refinación, cuyo objetivo es eliminar los compuestos que afectan la calidad del mismo, ya que estos compuestos generan sabores indeseables y olores desagradables que pueden afectar no solo sus propiedades sensoriales, sino también la estabilidad del producto. El proceso de refinación del aceite consiste en 4 etapas generales [54]: *desgomado*, es la eliminación de fosfolípidos y algunas gomas presentes en el aceite; *blanqueo*, hace referencia a la eliminación de pigmentos, peróxidos y residuos de ácidos grasos y sales; *desodorizado*, es la eliminación de olores y sabores indeseados; y *neutralización* o desacidificación, consiste en la eliminación de los ácidos grasos libres, fosfolípidos y clorofilas.

El proceso convencional de refinación de aceite requiere altos costos energéticos, además de la emisión de contaminantes en el ambiente. Es por ello, que, en la búsqueda de procesos más eficientes y sostenibles, las membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos, son una alternativa. En este sentido, se ha reportado el empleo de membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos para las operaciones de desgomado, neutralizado y blanqueo como parte del proceso de refinación de aceites comestibles [55].

2.7.1. Nanofiltración con membranas resistentes a disolventes orgánicos (OSN).

El proceso de nanofiltración en un inicio era usado sólo para tratamientos con agua o corrientes acuosas; sin embargo, en la búsqueda por la aplicación de esta tecnología a procesos con disolventes orgánicos, se ha logrado actualmente el de la nanofiltración con membranas resistentes a disolventes orgánicos (OSN, por sus siglas en inglés: organic solvent nanofiltration). Esta es una tecnología relativamente nueva para la separación y purificación de compuestos orgánicos a nivel molecular, teniendo como ventaja adicional la recuperación de disolventes en los procesos químicos en general (disminuyendo los tiempos de evaporación) [56]. Como se mencionó en la sección 2.6.2 estas membranas son fabricadas con materiales resistentes a distintos disolventes orgánicos, lo que ayuda a resolver la limitante que presentan los sistemas de filtración acuosos, permitiendo mayor variedad de aplicaciones. Entre los usos recientes de las membranas resistentes a disolventes orgánicos se ha reportado la eliminación de fosfolípidos (descerado), desacidificación, desodorización y decoloración de aceites vegetales en la industria de aceites comestibles [56,57]; asimismo, se ha investigado la fabricación de membranas capaces de recuperar disolventes orgánicos a partir de procesos químicos [57].

2.7.2. Refinación de compuestos bioactivos usando membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos

Los procesos de refinación de compuestos orgánicos convencionales se ven limitados por los altos costos energéticos y número de etapas, ya que involucran tratamientos térmicos a altas temperaturas por tiempos prolongados. El empleo de la tecnología OSN es útil en el proceso de refinación de aceites vegetales en donde el uso de disolventes orgánicos para extracción es recurrente. Asimismo, estas membranas son ideales para su aplicación en procesos de la industria de síntesis orgánica, en la industria farmacéutica, biotecnológica y de productos químicos de especialidad, llamados “fine chemicals”. En relación a la aplicación de membranas OSN para la refinación de aceites vegetales para la obtención de compuestos de alto valor agregado, Sereewatthanawut et al. [51] reportaron el uso de membranas de nanofiltración OSN para el enriquecimiento de aceite de salvado de arroz con γ -orizanol, el cual es un compuesto que se caracteriza por ser un antioxidante natural, y que sufre pérdidas de hasta el 90% durante los procesos de refinamiento convencionales. El trabajo consistió en las siguientes etapas: i) la determinación de la solubilidad del γ -orizanol en distintos disolventes orgánicos; ii) la extracción de aceite de salvado de trigo de arroz usando hexano y acetato de etilo; iii) la refinación del aceite obtenido por medio de OSN (Figura 9); iv) la determinación de la actividad antioxidante del aceite enriquecido con γ -orizanol por el método del DPPH.

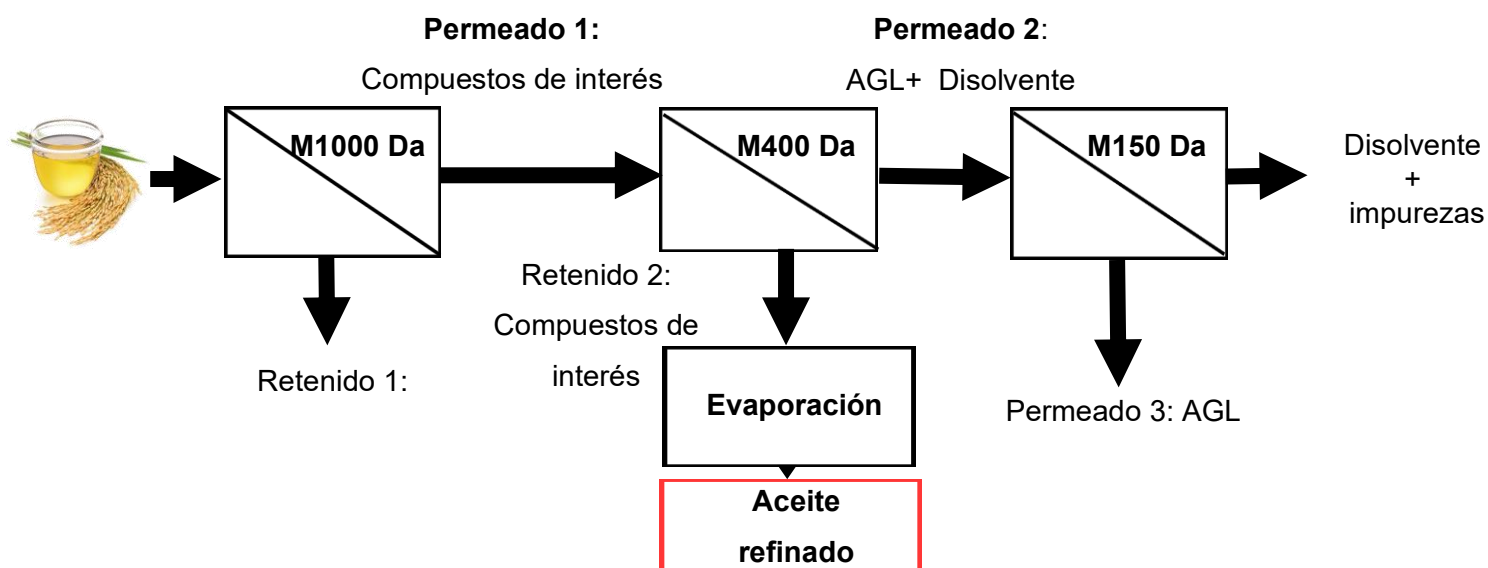


Figura 9. Proceso de refinación usando membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos [51].

Para la obtención y refinamiento del aceite, los autores utilizaron un equipo de nanofiltración (MET cell) con celdas de flujo tangencial (Figura 10). Este sistema tiene una capacidad de alimentación de 800 mL y puede ser operado con 2 a 5 celdas de flujo cruzado conectadas en

serie. Además, cuenta con una bomba de engranajes que permite la recirculación del flujo tangencial a través de las celdas de filtración. En dicho trabajo se usaron 2 series de membranas Starmem y Duramem las cuales fueron seleccionadas según su peso molecular de corte nominal. El extracto se permeó por las membranas previamente acondicionadas, bajo las presiones de operación específicas (5-30 bar) y finalmente se llevó a cabo la recolección de las fracciones del proceso (permeado y retenido).

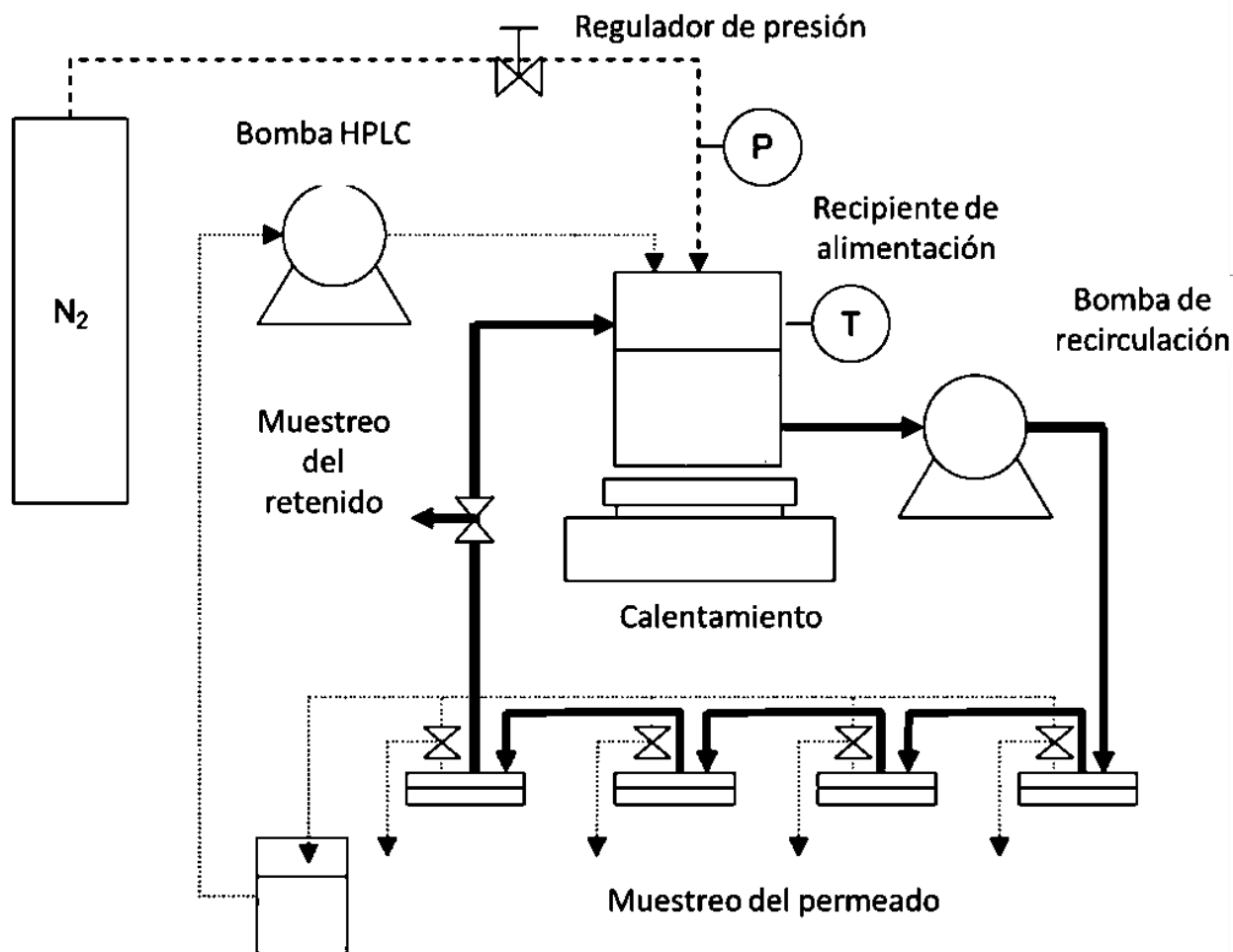


Figura 10. Equipo de nanofiltración (MET cell) con celdas de flujo tangencial [51].

Al inicio del proceso el aceite contenía un 1% de γ -orizanol, 90% de glicéridos (triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos) y 5% de ácidos grasos libres. Al finalizar el proceso de refinación, estos últimos se eliminaron alcanzando concentraciones mínimas ($< 0.2\%$ p/p). Respecto al contenido de γ -orizanol, el aceite de salvado de arroz generalmente presenta concentraciones entre 1 y 1.4%, el cual se ve afectado tras el procesamiento de refinación convencional disminuyendo su contenido hasta un 0.15%. Con el proceso de refinación por membranas de

nanofiltración OSN los autores obtuvieron una concentración de γ -orizanol del 4.1% en el aceite final, lo que indica la efectividad de este proceso para la concentración de compuestos de interés nutracéutico o farmacéutico. Adicionalmente, el aceite refinado incrementó su actividad antioxidante más del doble, lo que indica una mejora considerable en relación al aceite crudo [51].

En otro trabajo, Peev et al. [58] usaron membranas OSN para la concentración de ácido rosmarínico a partir de extractos etanólicos de toronjil (*Melissa officinalis*). En el estudio los autores realizaron un proceso de extracción con CO₂ súper crítico, y posterior a ello, el extracto fue procesado por membranas OSN (Duramem) con un peso molecular de corte de 200, logrando alcanzar concentraciones de 15 a 19 g/L de dicho compuesto (3 veces mayor que la concentración de ácido rosmarínico en la alimentación). En un estudio similar, Peshev et al. [59] llevaron a cabo la concentración de extractos de romero (*Salvia rosmarinus*) con ácido rosmarínico usando membranas OSN. Con este proceso, a partir de una concentración inicial de 0.118 g/L, los autores reportaron que se alcanzó una concentración final de 0.346 g/L (~ 3 veces más), además de obtener una mayor actividad antioxidante en el concentrado.

De acuerdo a lo anterior, se puede confirmar que la tecnología de nanofiltración con membranas OSN constituye una herramienta útil para la refinación de aceites, así como también para la concentración y purificación de compuestos orgánicos de interés, disminuyendo el gasto energético y siendo amigable con el ambiente. Es por ello que, con base en los antecedentes mencionados anteriormente, en el presente trabajo de investigación se propone la extracción y refinación del aceite de semilla de cáñamo usando membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos con la finalidad de obtener fracciones concentradas de compuestos no polares con posible actividad biológica.

2.8. Fundamentos de análisis químico proximal

La determinación de la composición proximal de cualquier producto alimenticio permite conocer las características de los alimentos, productos biológicos, y sus componentes. Para obtener resultados confiables del análisis, se debe seleccionar la técnica a utilizar de acuerdo al tipo de matriz de estudio. Las determinaciones proximales que se consideran de manera convencional son las siguientes: humedad, cenizas, grasas, proteína, fibra dietética y carbohidratos. A continuación, se describirán los fundamentos de estas técnicas.

Humedad: La humedad está relacionada con el contenido de agua que posee un alimento, y ésta puede encontrarse en dos formas: agua ligada, la cual interacciona con los componentes de la

matriz mediante puentes de hidrógeno o enlaces de tipo iónico; y agua libre, la cual no está unida a la matriz y puede perderse por evaporación. Existen 3 métodos para la determinación de humedad: secado en estufa, destilación y procedimientos instrumentales; sin embargo, el más aplicado es el de secado en estufa por tratarse de una técnica que es además de precisa, relativamente simple y barata. Este método se basa en la pérdida de agua libre tras someter la muestra a temperaturas superiores a 100 °C, normalmente 105 °C [AOAC 925.05].

Proteínas: La mayoría de los métodos para la determinación de proteínas se basan en la cuantificación de nitrógeno. Sin embargo, no todo el nitrógeno que se cuantifica corresponde al contenido proteico, y es por ello que se utilizan factores de conversión que permiten conocer de manera aproximada el contenido de nitrógeno proteico. El método más usado para realizar esta determinación es el de Kjeldahl. Este método consta de 3 pasos [60]: i) *Digestión:* se emplea una solución de HCl y un catalizador para oxidar la materia orgánica a CO₂ y agua, transformando el nitrógeno proteico en ion amonio NH₄⁺; ii) *Destilación:* la muestra digerida se trata con una solución alcalina de NaOH en exceso, con lo que se forma amoniaco (NH₃), el cual es destilado subsecuentemente. A la solución destilada se le añaden indicadores y ácido bórico, que promueve la formación de borato de amonio (NH₄-BO₂); iii) *Titulación:* El borato de amonio es valorado usando una solución estandarizada de ácido clorhídrico (HCl). Así, cada equivalente de HCl usado corresponde a un equivalente de NH₃.

Grasa: Para la determinación del contenido total de grasas, se utilizan disolventes orgánicos para extraer dichos componentes, dada la naturaleza hidrofóbica de estas moléculas. El método más usado para esta determinación de grasa total es el Soxhlet, el cual consiste en una extracción de grasas con éter de petróleo o hexano. En esta técnica, un cartucho de celulosa es colocado con la muestra en el tubo extractor del equipo Soxhlet. Posteriormente se usa calentamiento a altas temperaturas con reflujo del disolvente orgánico para arrastrar las grasas de la muestra hasta el matraz balón. A partir de esto, en el equipo se realizan los siguientes procesos: caída del disolvente sobre muestra, acumulación en el aparato de extracción y descarga, y evaporación del disolvente [60].

Fibra dietética: Según la NOM-043-SSA2-2005, la fibra dietética se define como la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos resistentes a la digestión por las enzimas del tracto gastrointestinal humano. El método gravimétrico usado para la determinación de fibra se basa en simular un proceso digestivo, añadiendo agentes químicos o enzimáticos que hidrolizan la materia digerible. Posterior a esto, se lleva a cabo un proceso de filtrado, mediante el cual se recuperan los residuos insolubles que corresponden a la fibra dietética y minerales

[60]. Estos residuos son secados e incinerados, siendo la fibra dietética la diferencia entre el residuo seco menos las cenizas.

Cenizas: Las cenizas son el residuo inorgánico que queda después de incinerar la materia orgánica de la muestra. La determinación de cenizas consiste en someter la matriz a temperaturas superiores a 500 °C por un tiempo aproximado de 24 h, lo que causa la pérdida de agua y la degradación de la materia orgánica a CO₂ y NO₂. Los minerales, que corresponden al material remanente de la incineración, están presentes en las cenizas en forma de óxidos, fosfatos, silicatos y cloruros, según sea la composición de la matriz analizada. De acuerdo a esto, esta prueba es indicadora del contenido de minerales y de materia inorgánica presente en la muestra biológica [60].

Carbohidratos: Los carbohidratos son biomoléculas compuestas por carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O). Estos se clasifican según sea el número de unidades de azúcares que los componen en: monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Dentro de los más comunes en el reino vegetal se encuentran los azúcares simples (mono y disacáridos), el almidón, la celulosa, la hemicelulosa y las pectinas. Un método común para la determinación de carbohidratos es su estimación a partir del extracto libre de nitrógeno (ELN), que se calcula como la diferencia del 100% menos la suma de los macronutrientes restantes [60]:

$$ELN = 100\% - (Humedad + Cenizas + Proteínas + \% Grasa + \% Fibra\ dietética);$$

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1. Justificación

Actualmente existen distintas patologías que afectan al ser humano, entre las que destacan las enfermedades crónico-degenerativas, que afectan de manera negativa la calidad de vida de la población en el mundo, causando un aumento de la morbilidad y mortalidad. En los últimos años el consumo de productos de origen natural que aportan un beneficio a la salud ha ido incrementando, así como la búsqueda de fuentes innovadoras para la obtención de compuestos con actividades biológicas terapéuticas o preventivas. Debido a su composición nutricional y funcional, la semilla de cáñamo ha demostrado tener un gran potencial para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales y productos de tipo nutracéutico. En particular, uno de los principales productos de alto valor nutricional y funcional que puede obtenerse a partir de esta semilla es su aceite, ya que en la literatura científica se ha reportado que éste tiene un alto contenido de tocoferoles, conocidos por su alto poder antioxidante, además de otros compuestos tales como cannabinoides, ácidos grasos poliinsaturados, fitoesteroles y sesquiterpenos.

Por otra parte, el método de extracción influye determinantemente en el rendimiento y la calidad de los compuestos obtenidos en el producto final. Los métodos convencionales para la refinación de aceites, involucran procesos como la evaporación y la destilación, métodos que pueden provocar la disminución o pérdida total de compuestos bioactivos termolábiles, además de que estos procesos conllevan altos costos energéticos, pérdida de disolventes o alto costo de recuperación de los mismos [51]. Una de las ventajas del empleo de tecnologías de membranas para la refinación de aceites, particularmente el proceso de nanofiltración, es que éstas permiten la disminución del volumen de evaporación del extracto inicial, disminuyendo tiempos de evaporación, lo que hace que el proceso de separación sea más eficiente que los procesos térmicos intensivos mencionados anteriormente con respecto a los costos de operación y gastos energéticos. Asimismo, dado que los procesos de membrana se realizan a temperaturas moderadas, se disminuye considerablemente la pérdida de compuestos termosensibles durante la operación de separación.

Con el desarrollo de este proyecto se pretende promover el aprovechamiento de la nanofiltración como un proceso eficiente en términos de separación, con menor consumo energético y baja generación de residuos, contribuyendo así a un enfoque más sustentable en la obtención de compuestos bioactivos a partir del aceite de cáñamo.

3.2. Originalidad

Los métodos comunes empleados en la refinación de aceites comestibles se basan principalmente en tratamientos térmicos como evaporación y destilación convencional o de recorrido corto, que implican altos gastos energéticos y costos de operación, así como elevado consumo de disolventes. Como se mencionó en la sección anterior, en este proyecto se pretende usar la tecnología de membranas de nanofiltración resistente a disolventes orgánicos (OSN), ya que esta técnica novedosa permite llevar a cabo el proceso de refinación del aceite de cáñamo sin la pérdida de compuestos termolábiles. A partir de la revisión bibliográfica realizada, se puede concluir que a pesar de que la nanofiltración con disolventes orgánicos ha sido aplicada en el proceso de refinación de aceites, hasta el momento no se ha reportado el uso de esta tecnología en la refinación del aceite de semilla de cáñamo. Los trabajos más relevantes que se han documentado en relación al empleo de esta tecnología en procesos de extracción de compuestos bioactivos de interés en fases lipofílicas han sido reportados por el grupo de investigación del Dr. Andrew Livingston en el *Imperial College London*. Sereewatthanawut et al. [51] usaron la nanofiltración con disolventes orgánicos para el refinamiento de aceite de salvado de arroz y la concentración de γ -orizanol. Los autores trabajaron con membranas OSN y sus resultados mostraron un contenido de γ -orizanol muy superior (4.1%) al que queda después de la refinación convencional (0.15%), además de haber disminuido la cantidad de ácidos grasos libres presentes en el aceite (<0.2%).

Así mismo Peev et al. [58] usaron membranas OSN para la concentración de ácido rosmarínico a partir de extractos etanólicos de toronjil, logrando concentrar el extracto inicial con el compuesto de interés 3 veces más. Por otra parte, en un trabajo similar, Peshev et al. [59] llevaron a cabo la concentración de extractos de romero con ácido rosmarínico empleando la tecnología OSN. Los autores reportaron la obtención de un extracto rico en ácido rosmarínico, con una mayor actividad antioxidante que el extracto crudo. De acuerdo a la revisión de la literatura científica realizada, al momento no se ha reportado el uso de la nanofiltración con disolventes orgánicos para el procesamiento de aceite de semilla de cáñamo, por lo que se puede afirmar que los objetivos del presente proyecto son originales en el campo de la ciencia y de la técnica actual.

3.3. Objetivos

3.3.1. Objetivo general

Extraer el aceite de semillas de cáñamo (*Cannabis sativa* L.) mediante disolventes orgánicos no polares y refinar el extracto empleando nanofiltración con membranas resistentes a

disolventes orgánicos, así como, evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos bioactivos liposolubles presentes en las diferentes fracciones del proceso.

3.3.2. Objetivos específicos

1. Determinar la composición química proximal de semillas de cáñamo.
2. Establecer las condiciones de operación para la extracción de compuestos liposolubles presentes en semillas de cáñamo mediante disolventes orgánicos, y comparar su eficiencia con la obtenida a través del método Soxhlet.
3. Separar y refinar los compuestos liposolubles presentes en semillas de cáñamo usando membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos.
4. Evaluar la actividad antioxidante mediante el método DPPH y la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en disco de las fracciones obtenidas por nanofiltración, y comparar estos resultados con las actividades del aceite crudo.

3.4. Metas

Metas para el Objetivo específico 1:

- 1.1 Determinación de humedad en semilla de cáñamo siguiendo la metodología 925.5 de la AOAC.
- 1.2 Cuantificación de proteínas de semilla de cáñamo basada en el método de digestión micro Kjeldahl de la NMX-F-089-S-1978.
- 1.3 Determinación de grasas en semilla de cáñamo por el método de Soxhlet de la NMX-F-089-S-1980.
- 1.4 Determinación de fibra cruda en semilla de cáñamo siguiendo la metodología de la NMX-F-090-S-1978.
- 1.5 Determinación de cenizas en semilla de cáñamo siguiendo la metodología 923.03 de la AOAC

Metas para el Objetivo específico 2:

- 2.1 Elección del disolvente de extracción para la obtención del aceite de semilla de cáñamo.
- 2.2 Evaluación de tiempos y eficiencias de extracción para la obtención del aceite de semilla de cáñamo usando extracción sólido-líquido por disolventes orgánicos de varias etapas.

Metas para el objetivo específico 3:

- 3.1 Determinación de la selectividad de las membranas en configuración de flujo normal para las diferentes etapas de nanofiltración, mediante la evaluación de los parámetros de nanofiltración con membranas resistentes a disolventes orgánicos (OSN).

3.2 Refinación del aceite de semilla de cáñamo empleando diferentes etapas del sistema de filtración por membranas OSN en modo tangencial.

Metas para el Objetivo específico 4:

4.1 Determinación de actividad antioxidante de las fracciones obtenidas del proceso de nanofiltración OSN del aceite de semilla de cáñamo por el método de captación del radical DPPH.

4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas del proceso de nanofiltración del aceite de semilla de cáñamo en los patógenos de alimentos *L. monocytogenes*, *S. typhi*, y *E. coli* enteropatógena mediante el método de difusión en disco.

4. METODOLOGÍA

El siguiente esquema (Figura 11) presenta las etapas principales del proyecto de tesis desarrollado.

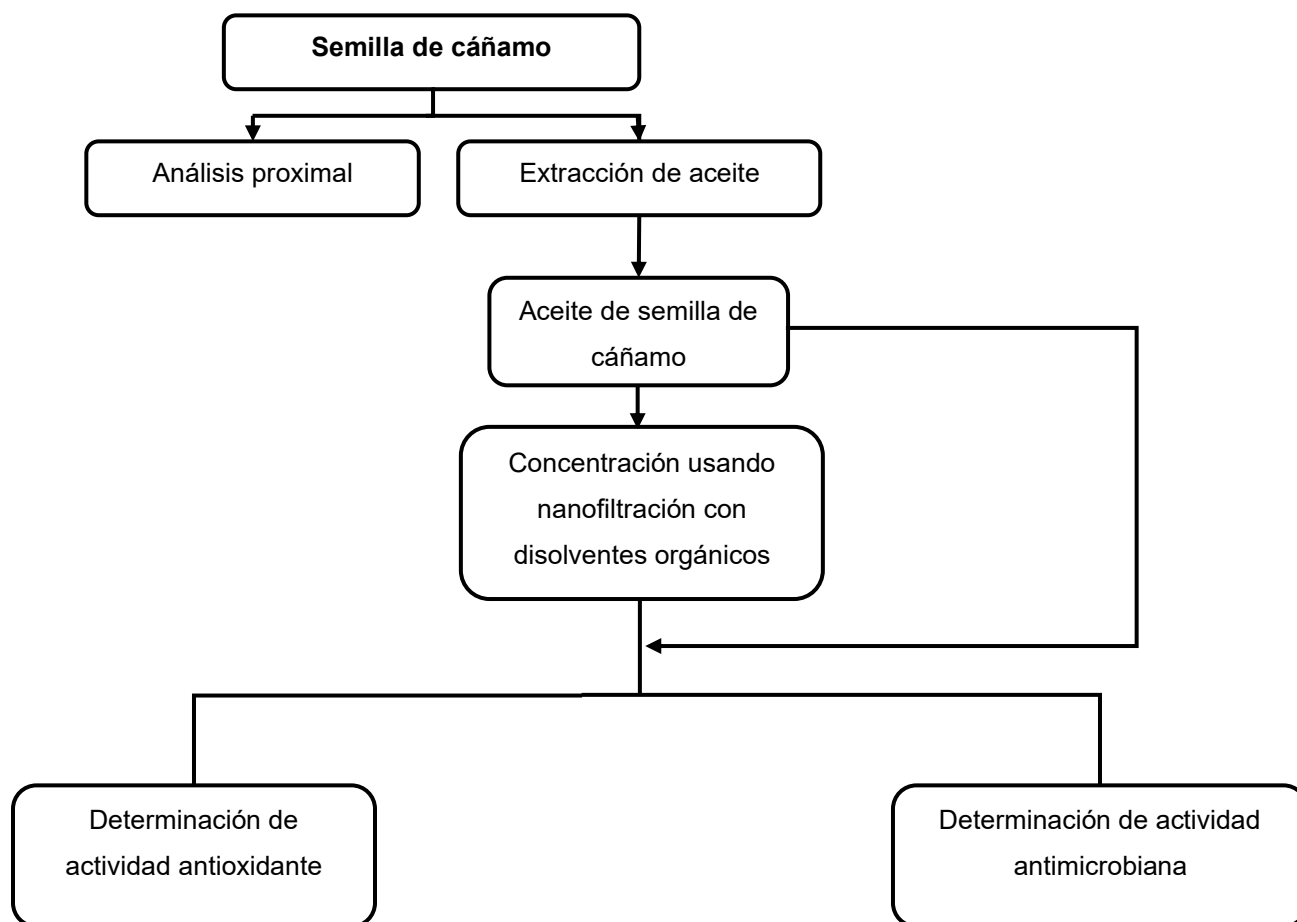


Figura 11. Esquema de la metodología general desarrollada en el presente proyecto.

4.1. Adquisición de las semillas de cáñamo y pretratamiento de la muestra

La semilla de cáñamo sin cáscara marca Okko de origen chino, fue adquirida en la plataforma digital Amazon en marzo del 2023, y fue transportada al Laboratorio de Bioprocesos en la Universidad Tecnológica de la Mixteca, en donde se almacenó en condiciones de oscuridad y bajo refrigeración a 4 °C en un empaque hermético. La semilla fue acondicionada mediante un proceso de secado y molienda para su uso en las pruebas proximales y de extracción, según se describe a continuación. La semilla de cáñamo sin cáscara fue secada a 50 °C durante 24 h en una estufa de secado (Luzeren, China) y posteriormente fue molida en una licuadora casera. La semilla molida fue pasada por un tamiz N° 16 (tamaño nominal de partícula de 1.19 mm) y almacenada bajo refrigeración a 4 °C y en oscuridad hasta su uso posterior.

4.2. Caracterización proximal de la semilla de cáñamo

Humedad: Se siguió la metodología descrita en el método 925.5 de la AOAC. Se colocó 2 g de semilla molida en una charola de aluminio previamente pesada, la cual se llevó a una estufa de secado a 105 °C hasta llegar a peso constante (aproximadamente 5 h). El porcentaje de humedad se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de humedad} = 100 * \frac{P_i - P_{ms}}{P_i}; \quad (6)$$

donde:

P_i: Peso de la muestra inicial (g);

P_{ms}: Peso de la muestra seca (g).

Proteína cruda: Se siguió el método descrito en la norma NMX-F-068-S-1980 modificado con ácido bórico. Se pesó 0.15 g de semilla seca y desengrasada, después de lo cual la semilla se incorporó a un matraz de digestión. En seguida se adicionaron 0.04 g de sulfato de cobre pentahidratado, 1.3 g de sulfato de potasio y 2.5 mL de H₂SO₄ concentrado. Como blanco se consideró un matraz sin muestra. El matraz se colocó en el equipo digestor micro-Kjeldahl con la boquilla dentro del colector de humos en una campana de extracción. La temperatura de la parrilla se incrementó gradualmente, mientras que el matraz se mantuvo en rotación lenta para digerir completamente la muestra. Cuando el proceso de digestión finalizó, se observó un cambio de color de la disolución de negro a azul verdoso claro. El matraz se dejó enfriar y a este se le añadió 15 mL de agua destilada agitando para disolver los sólidos formados. Posteriormente se

colocó la muestra digerida en el equipo de destilación micro-Kjeldahl y se le adicionó 10 mL de solución de NaOH al 50% (p/v). La solución se destiló, incorporando el vapor destilado en 5 mL de solución de ácido bórico al 4% (p/v) con indicador Rojo de Metilo hasta alcanzar un volumen de 40 mL. El destilado fue valorado con una solución de HCl 0.10 N, hasta que se obtuvo un cambio de color similar al del blanco (rojo-morado). El contenido de nitrógeno total se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de nitrógeno} = 100 \left[\frac{(V_v - V_{vb})(N)}{P_i} (0.014) \right]; \quad (7)$$

donde:

V_v : Volumen gastado en la valoración de la muestra;

V_b : Volumen gastado en la valoración del blanco;

N: Normalidad de la solución ácida estándar;

P_i : Peso de la muestra inicial (g).

Asimismo, el porcentaje de proteína cruda total, se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de proteína} = \% \text{ de nitrógeno} \times 6.25; \quad (8)$$

Se utilizó el factor de conversión 6.25

Grasa cruda: Se siguió la metodología descrita en la norma NMX-F-089-S 1978. Se colocó un matraz de destilación en una estufa de secado a 105 °C durante 2 h. Por otra parte, en un cartucho de celulosa se colocó 2 g de semilla seca y el cartucho se insertó en el equipo de extracción Soxhlet. Se añadió 120 mL de hexano para realizar la extracción durante 4 h (1:60 p/v). Pasado este tiempo, el disolvente del matraz fue evaporado usando un evaporador rotatorio B-100 (Buchi, Suiza) a 69 °C. Para eliminar la totalidad del solvente del aceite, el matraz con la muestra fue colocado en una estufa de secado a 60 °C hasta peso constante. El porcentaje de grasa se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Grasa cruda (\%)} = 100 \left[\frac{P_{mg} - P_{ms}}{P_i} \right]; \quad (9)$$

donde:

P_{ms} : Peso del matraz limpio y seco (g);

P_{mg} : Peso del matraz con grasa (g);

P_i : Peso de la muestra inicial (g).

Fibra cruda: La determinación de fibra cruda se realizó de acuerdo al método descrito en la norma NMX-F-090-S-1978. Se mezcló 1 g de muestra previamente seca y desengrasada en un matraz con 200 mL de solución de H_2SO_4 al 1.25% (v/v), después de lo cual la mezcla se mantuvo en ebullición durante 30 min. Pasado este tiempo, la mezcla se filtró al vacío usando papel filtro libre de cenizas Whatman No. 41. Posteriormente, la muestra fue llevada al matraz por arrastre usando 200 mL de solución de NaOH al 1.25% (p/v), después de lo cual la mezcla se dejó ebullicir por 30 min. A continuación, la mezcla fue filtrada al vacío usando papel libre de cenizas a peso constante, y subsecuentemente se lavó con agua pasada por ósmosis hasta que el pH del filtrado fuera igual al del agua. Después de lo anterior, se realizó un último lavado con etanol. A continuación, el papel filtro se colocó en un crisol de porcelana y fue llevado a peso constante en una estufa de secado a 60 °C. La muestra fue incinerada en una mufla FE-360 (Felisa, México) a 550 °C durante 9 h. La muestra se dejó enfriar en un desecador, después de lo cual se procedió a su pesado en la balanza analítica. El contenido de fibra cruda se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de fibra (\%)} = 100 \left[\frac{P_{mi} - P_c}{P_i} \right]; \quad (10)$$

donde:

P_{mi} : Peso materia insoluble (g);

P_c : Peso cenizas (g);

P_i : Peso de la muestra (g).

Cenizas: Se siguió la metodología descrita en la AOAC 923.03 (2000). Se colocó 1 g de muestra previamente seca y desengrasada en un crisol llevado a peso constante. Posteriormente, la muestra se carbonizó en una parrilla de calentamiento hasta que dejó de emitir humo (aprox. 35 min). A continuación, la muestra carbonizada se colocó en una mufla a una temperatura de 600 °C y se repitieron 3 ciclos de incineración de 9 h. Finalmente, el crisol se dejó enfriar en un desecador y se pesó en la balanza analítica. El contenido de cenizas se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de ceniza (\%)} = 100 \left[\frac{P_{cm} - P_{cc}}{P_i} \right]; \quad (11)$$

donde:

P_{cm} : Peso del crisol con muestra (g);

P_{cc} : Peso del crisol con cenizas (g);

P_i : Peso de la muestra (g).

Carbohidratos (ELN): El porcentaje de carbohidratos se calculó por diferencia como sigue.

$$\text{Carbohidratos} = 100\% - (\text{Humedad} + \text{Cenizas} + \text{Proteínas} + \% \text{Grasa} + \% \text{Fibra}); \quad (12)$$

4.3. Extracción de la fracción no polar con hexano

Para el proceso de extracción con hexano, se empleó la metodología reportada por Ying-Lin et al. [61]. Se utilizó una relación sólido-disolvente 1:7 colocando 100 g de semilla en un matraz con tapa, al cual se le añadió 700 mL de hexano puro (Meyer, México). La extracción se realizó en una parrilla de calentamiento a una temperatura de 55 °C con una agitación de 200 rpm durante 3 h. Pasado este tiempo, se suspendió el calentamiento y se dejó la muestra en reposo durante 20 min para permitir que los sólidos se precipitaran. Posteriormente se llevó a cabo la decantación del extracto. A continuación, se agregó nuevamente 700 mL de hexano puro a los sólidos extraídos para realizar una segunda etapa de extracción del aceite remanente en los sólidos. Al terminar el proceso de extracción, se retiraron los sólidos mediante filtración usando papel filtro Whatman No. 1, y los extractos de cada extracción fueron guardados por separado. Finalmente, se determinó la concentración de aceite en el extracto mediante métodos gravimétricos. Se colocó 1 mL de extracto en un pesamuestra a peso constante, y éste fue llevado a la estufa de secado a 105 °C por 1 h. Posteriormente, el extracto seco se pesó en la balanza analítica y se calculó la concentración de aceite por volumen de extracto. Por otra parte, la extracción de aceite mediante el método Soxhlet se llevó a cabo conforme a lo descrito en la sección 4.2.

4.4. Nanofiltración con disolventes orgánicos

Se utilizó un equipo de nanofiltración METcell Cross-Flow System (Evonik, Reino Unido) para membranas de hoja plana. Para realizar las filtraciones se utilizaron membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos Borsig (BO) y Duramem (DM) con un área de filtración de 52.8 cm², y un peso molecular de corte nominal (PMCN) de 600 Da (ONF-1, Borsig, Alemania) y 150 Da (Duramem, Evonik, Reino Unido). La selección de las membranas para este estudio se realizó considerando su selectividad en función del PMCN de las membranas disponibles en el

mercado, además de contemplar que en la primera etapa de separación por membranas de filtración se busca separar a los triglicéridos del extracto inicial, los cuales tienen un PMCN mayor a 600 Da. Por otra parte, en la segunda etapa de filtración, se buscó concentrar compuestos de interés reportados para el aceite de semilla de cáñamo (tocoferoles, cannabidiol (CBD), β -sistosterol, β -cariofileno), los cuales presentan un rango de pesos moleculares de 150 a 400 Da. Se trabajó con 2 configuraciones de flujo del proceso de nanofiltración: flujo normal y flujo tangencial. A continuación, se describen estas etapas de proceso.

4.4.1. Primera etapa: separación de glicéridos a partir de una membrana de 600 Da

Flujo normal. La membrana se cortó y se insertó en el equipo, de tal forma que la capa activa estuviese en contacto con la solución de alimentación. El equipo se armó en configuración normal conforme lo que indica el manual del fabricante (Figura 12). El objetivo de esta configuración fue evaluar la selectividad de separación de la membrana en relación a los compuestos con un peso molecular de ~600 Da correspondientes principalmente a los glicéridos. Se estableció un volumen inicial de 150 mL, con condiciones de operación de 25 bar de presión a temperatura ambiente. Las membranas se acondicionaron con el disolvente de extracción puro, dejando la membrana inmersa en el disolvente por más de 3 h. Después de esto, se removió el disolvente del tanque de retenido y se llenó con el extracto de alimentación.



Figura 12. Sistema de nanofiltración METcell Cross-Flow System en configuración de flujo normal.

Flujo tangencial. Se armó el equipo en su configuración de flujo tangencial conforme lo indica el manual del fabricante (Figura 13). El sistema de filtración está conformado por dos celdas de flujo tangencial en las que se colocan membranas circulares con un área de 17 cm², en el que la corriente de retenido de la primera celda se conecta a la alimentación de la segunda celda de

filtración. La membrana fue insertada en el equipo de tal forma que la capa activa (superficie brillante) estuviese en contacto con la solución de alimentación. Posteriormente se verificó que el equipo y las celdas estuviesen ensamblados herméticamente y se presurizó el sistema con nitrógeno gradualmente cada 5 bar hasta llegar a la presión establecida de 25 bar. El sistema cuenta con una bomba de engranajes que promueve el flujo tangencial a través del sistema en configuración de retroalimentación del permeado de la segunda celda al tanque de alimentación.

Al igual que en la configuración normal, las membranas se acondicionaron con el disolvente puro de extracción (hexano) dejando la membrana inmersa en el disolvente por más de 3 h. Después del proceso de acondicionamiento de las membranas, el extracto lipofílico de las semillas de cáñamo se pasó por el sistema de membranas de flujo tangencial. Durante la nanofiltración, se midieron los flujos volumétricos de permeado a periodos regulares para monitorear la posible reducción drástica del flux a medida que se desarrollaba el proceso. En cada corrida de nanofiltración, la filtración se detuvo para mantener el mínimo volumen requerido para el funcionamiento del equipo (120 mL). El volumen inicial de alimentación fue de 620 mL y al final de la filtración se estimó el factor de concentración volumétrico (FCV) empleando la Ecuación 3 descrita en la Sección 2.7.5. El flujo de permeado se calculó a intervalos regulares midiendo el tiempo necesario para obtener 25 mL de extracto permeado. Finalmente se midieron los volúmenes de permeado (fracción con compuestos de interés) y retenido (fracción con glicéridos) al final del proceso. El proceso de nanofiltración por flujo tangencial del extracto hexánico se realizó por duplicado.

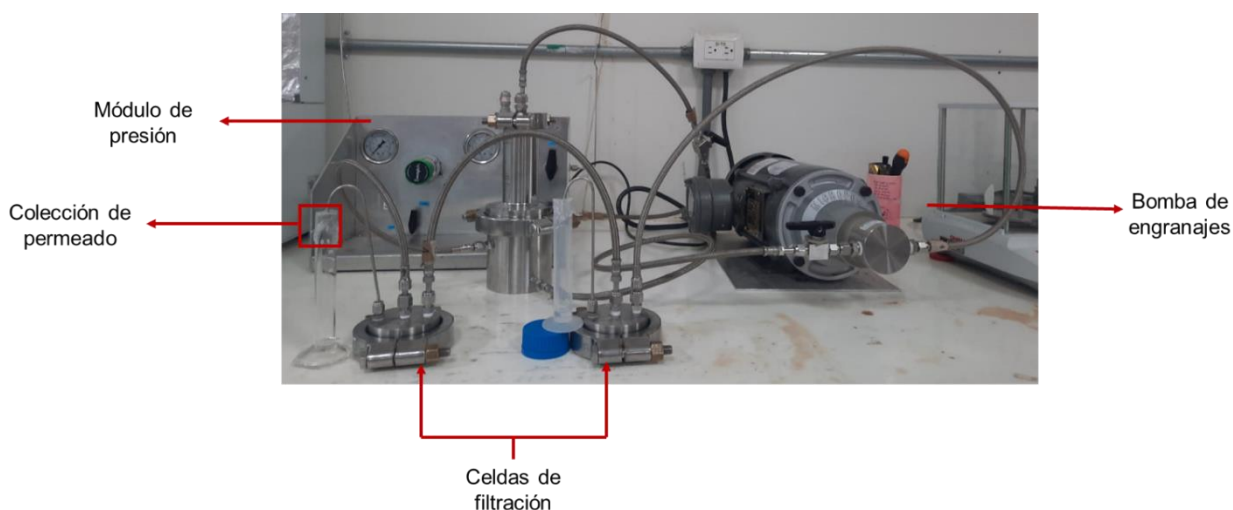


Figura 13. Sistema de nanofiltración METcell Cross-Flow System en configuración de flujo tangencial.

4.4.1.1. *Diafiltración por flujo tangencial usando la membrana de 600 Da*

Para remover la mayor parte de los compuestos con un peso molecular inferior a 600 Da presentes en el retenido de la primera etapa de nanofiltración, se llevó a cabo un proceso de diafiltración. Este procedimiento se realizó de manera similar a lo descrito en la Sección 4.5.1.

Antes de iniciar la diafiltración, las membranas fueron acondicionadas sumergiéndolas en hexano por más de 3 h. Una vez completado este proceso, el retenido de la primera etapa de nanofiltración se transfirió al tanque de alimentación, y se añadió hexano como disolvente hasta alcanzar un total de 4 volúmenes de diafiltración, conforme a la ecuación 5 descrita en la Sección 2.7.5. Finalmente, el permeado obtenido en la diafiltración se combinó con el permeado de la primera etapa de nanofiltración para ser empleado en la etapa posterior de filtración.

4.4.2. **Segunda etapa: Concentración de compuestos con un peso molecular superior a 150 Da**

En la segunda etapa de nanofiltración con disolventes orgánicos, se buscó concentrar los compuestos presentes en el permeado obtenido en la primera etapa de nanofiltración. Para ello, se eligió una membrana con un peso molecular de corte nominal (PMCN) de 150 Da. La estructura de la membrana seleccionada es entrecruzada y de polaridad media, por lo que, siguiendo las especificaciones del fabricante de la membrana 150 T1 (DM) (Duramem, Reino Unido), se cambió el disolvente en el que se encontraban los compuestos del permeado obtenidos en la etapa de filtración previa (mezcla de permeado y permeado de diafiltración), reemplazando el hexano por tetrahidrofurano (THF). La evaporación del hexano se realizó en el evaporador rotatorio a una temperatura de baño térmico de 50°C y presión de vacío de 400 mbar. Después de evaporar el hexano, el remanente se suspendió en THF a una concentración de 2.7 g/L. Este extracto se empleó para la etapa de nanofiltración posterior.

Flujo normal: Se procedió de manera similar a lo reportado en la Sección 4.6.1 (configuración normal). Antes de introducir la mezcla de permeados obtenidos en la primera etapa de nanofiltración en el tanque de alimentación, se lavó la membrana para eliminar la capa de aditivo que la protege. El lavado se realizó según las indicaciones del manual del fabricante, haciendo pasar 250 mL de THF por el sistema. Después de esto, se retiró el disolvente del tanque de retenido y se llenó con el extracto de alimentación (mezcla de permeados). Tras evaluar la eficiencia de la membrana, las fracciones de permeado y retenido obtenidas se mezclaron nuevamente con el extracto inicial para su uso en el proceso en configuración tangencial.

Flujo tangencial: Se procedió de manera similar a la Sección 4.6.1 (configuración tangencial). Al igual que en la configuración normal, antes de insertar el extracto en el tanque de alimentación (mezcla de permeados), se lavó la membrana para eliminar la capa de aditivo que la protege. La filtración se detuvo debido a una disminución drástica del flujo de permeado. El volumen inicial de alimentación fue de 500 mL, y se estimó el factor de concentración volumétrico (FCV) utilizando la Ecuación 3 descrita en la Sección 2.7.5. Finalmente, se midieron los volúmenes de permeado y retenido (fracción con compuestos de interés) al final del proceso. El proceso de nanofiltración por flujo tangencial con membranas DM se realizó por duplicado.

4.5. Determinación de actividad antioxidante y antimicrobiana en el extracto y en las fracciones nanofiltradas de semillas de cáñamo

Se evaporó el disolvente del extracto crudo, así como de las fracciones obtenidas mediante nanofiltración con disolventes orgánicos utilizando un evaporador rotatorio a una temperatura de baño térmico de 50°C y una presión de vacío de 390-400 mbar. Después de completar la evaporación, se determinó el peso de los extractos obtenidos y estos se almacenaron bajo refrigeración. La actividad antioxidante y antimicrobiana fue evaluada a las fracciones que se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Fracciones de los extractos hexánicos de semillas de cáñamo obtenidas por nanofiltración con disolventes orgánicos.

Etapas	Membrana	Corriente	Posibles compuestos presentes de acuerdo a PMCN
NF-E1	BO (600 Da)	Retenido	Glicéridos (di y triglicéridos)
NF-E1	BO (600 Da)	Permeado	Tocoferoles, cannabinoides, terpenos, ácidos grasos libres.
NF-E2	DMT1 (150 Da)	Retenido	Tocoferoles, cannabinoides, terpenos.
NF-E2	DMT1 (150 Da)	Permeado	Terpenos, ácidos grasos libres.
Aceite inicial	-	-	Glicéridos, tocoferoles, cannabinoides, terpenos, ácidos grasos libres.

NF: nanofiltración; E: etapa

4.5.1. Actividad antioxidante por el método de captación del radical DPPH

Para la determinación de la actividad antioxidante se siguió la metodología reportada por Ramadan et al. [70] con algunas modificaciones. El reactivo DPPH se preparó en etanol a una concentración de 10^{-4} M. El aceite crudo de semilla de cáñamo se disolvió en hexano, en un rango de concentraciones de 25-150 mg/mL. Por otro lado, el retenido obtenido en la primera

etapa de nanofiltración (NF-E1, membrana ONF-1 600) se disolvió en hexano en un rango de concentraciones de 60 a 300 mg/mL. Debido a la solubilidad de las fracciones obtenidas en las diferentes etapas de nanofiltración, también se preparó una solución de DPPH a una concentración de 10^{-4} M utilizando acetato de etilo. El permeado de la etapa NF-E1 y el retenido de la segunda etapa de nanofiltración (NF-E2, DM150) fueron disueltos en acetato de etilo, a concentraciones entre 10 y 56 mg/mL. Debido a la cantidad de muestra obtenida del permeado en la etapa NF-E2 (membrana DM150), no fue posible realizar la prueba correspondiente.

Para la prueba, 390 μ L de la solución de DPPH se mezcló con 100 μ L de las soluciones de extractos liposolubles usando un vórtex durante 10 s. Cada solución se dejó reposar por 30 min sin agitación ni exposición a la luz. Después de este tiempo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 50 (Thermo Scientific®, EUA) a 515 nm. Como blanco de la prueba se utilizó 490 μ L de etanol o acetato de etilo, según el sistema de reacción. Se realizó una curva de calibración usando Trolox como compuesto estándar y se calculó el valor IC_{50} de la muestra y del estándar Trolox; para ello, se graficó la tasa de inhibición contra la concentración de la muestra. Un valor de IC_{50} cercano al del Trolox indica una alta actividad antioxidante. El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Capacidad de inhibición} = \frac{A_{515B} - A_{515M}}{A_{515B}} * 100;$$

donde:

$A_{515, \text{ blanco}}$: Absorbancia correspondiente al blanco;

$A_{515, \text{ muestra}}$: Absorbancia correspondiente a la muestra después de 30 min de reacción.

4.6. Determinación de actividad antimicrobiana por difusión en disco

4.6.1. Material biológico

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se usaron las siguientes cepas de microorganismos patógenos: *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* Enteropatógena (ECEP).

4.6.2. Activación de las cepas bacterianas

Se utilizaron diferentes medios de cultivo líquidos para la activación de las cepas bacterianas: Infusión Cerebro-Corazón (BHI, por sus siglas en inglés) para *Listeria monocytogenes* y Caldo Nutritivo para *Escherichia coli* Enteropatógena (ECEP) y *Salmonella typhi*. Para ello, se añadieron 400 μ L de cada cepa patógena, conservada en glicerol, a 5 mL del medio

correspondiente. Los tubos de cultivo se incubaron a 37 °C durante 48 h. Posteriormente, se realizaron siembras por estriado en agar, con incubación a 37 °C durante 48 h. En el caso de *S. typhi*, se empleó agar Salmonella-Shigella para su cultivo. La identificación de las cepas se verificó mediante la evaluación de sus características morfológicas y microscópicas.

4.6.3. Resguardo de las cepas patógenas

Las cepas patógenas *L. monocytogenes*, ECEP y *S. typhi*, fueron resguardadas en cajas Petri bajo refrigeración (5 °C) y se realizaron resiembras de éstas cada dos semanas. Para la conservación de las cepas, éstas se almacenaron en una solución de glicerol al 30% a -20°C.

4.6.4. Conteo microbiano

Se tomó una asada de cada microorganismo y se inoculó en su medio de cultivo correspondiente: caldo nutritivo para ECEP y *S. typhi*, y caldo BHI para *L. monocytogenes*. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 20 h para ECEP, y 16 h para *S. typhi* y *L. monocytogenes*. Luego, se prepararon diluciones en agua peptonada para su siembra en medio de cultivo sólido.

4.6.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se evaluaron tres concentraciones (1, 10 y 50 mg/mL) de cada fracción obtenida por nanofiltración. Para su preparación, se empleó una mezcla de Tween 80 y agua en una proporción de 5:95 con respecto a cada fracción [62]. La actividad antimicrobiana del aceite crudo de semilla de cáñamo y las fracciones obtenidas por nanofiltración fueron evaluadas frente a los patógenos modelos usadas en este estudio: *L. monocytogenes*, ECEP y *S. typhi*. Los microorganismos se cultivaron en agar Müller-Hinton.

Se prepararon suspensiones bacterianas de 10^7 - 10^9 UFC/mL (conteo en placa). De cada suspensión, se tomaron 100 µL y se extendieron uniformemente sobre la superficie del medio de cultivo utilizando un hisopo estéril. En cada caja Petri se colocaron 4 discos de papel filtro de 6 mm de diámetro de forma espaciada, asegurando un contacto completo con la superficie de agar. Cada disco fue impregnado con 5 µL de muestra. Como control negativo, se utilizaron discos impregnados únicamente con la mezcla de disolventes Tween 80-agua (5:95). Las cajas se incubaron a 37 °C y después de 24 h de incubación, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición con la fórmula siguiente:

$$HI = \frac{D_T - D_D}{2};$$

HI = Halo de inhibición en mm;

D_T = Diámetro total (diámetro del disco + halo de inhibición) en mm;

DD = Diámetro del disco (5 mm).

4.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía con un nivel de confianza del 95%. Asimismo, en la evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana se aplicó la prueba de Tukey para identificar diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) de cada fracción nanofiltrada. En los casos donde se compararon únicamente dos medias, se empleó la prueba t Student ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización proximal de la semilla de cáñamo

Se realizó la caracterización proximal de la semilla de cáñamo que fue empleada en este trabajo para la extracción de compuestos lipofílicos. En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos correspondientes a humedad, proteína cruda, fibra cruda, carbohidratos, cenizas, y grasa cruda. A continuación, se discuten los resultados obtenidos en este trabajo, así como los valores reportados en la literatura para semilla de cáñamo no comercial.

Tabla 14. Composición proximal de la semilla de cáñamo sin cáscara comparada con valores reportados en la literatura (% en base seca).

Determinación	Este trabajo*	Otros autores	Ref.
Humedad	2.8 ± 0.03	4.9-6.8	[2]
Proteína cruda	24.5 ± 0.2	20.5-37.6	[2]
Fibra cruda	3.03 ± 0.2	-	[2]
Carbohidratos	9.6 ± 0.5	-	[2]
Cenizas	10.3 ± 0.1	4.7-7.7	[2]
Grasa cruda	52.5 ± 0.5	36.6-51;54.7	[2];[63]

*Se presenta la media ± la desviación estándar (n=3).

Como puede observarse en la Tabla 14, el contenido de grasa de las semillas de cáñamo usadas en este proyecto (52.5%) es ligeramente superior al reportado en la literatura para algunas variedades de cáñamo (36.6-54.7%) [2,63]. La variación entre el porcentaje de grasa de las variedades reportadas en la literatura y el valor encontrado, puede deberse a las distintas condiciones de cultivo (tipo de suelo, clima, altitud, etc.), así como las características fenotípicas y genotípicas de la planta de cultivo. Por otro lado, considerando que la semilla de cáñamo empleada en este trabajo está destinada al consumo humano en el área nutracéutica, podría tratarse de una variedad genética (natural o modificada) que produce una alta cantidad de macronutrientes como son grasas y proteínas.

El porcentaje de proteína de la semilla de cáñamo empleada en el presente trabajo (24.5%) es comparable con el reportado en semillas de girasol (20-38%), linaza (20-30%), y chía (15-25%) [7]. A su vez, este valor coincide con el reportado en la literatura para semilla de cáñamo descascarillada (Tabla 14). Adicionalmente, Callaway [1] menciona que además de poseer un alto contenido proteico, la proteína de semilla de cáñamo es altamente digerible y es una excelente fuente de aminoácidos esenciales, tales como arginina, metionina y cisteína.

Por otra parte, la semilla de cáñamo presentó un valor de cenizas mayor (10.3%) en comparación con los valores reportados en la literatura (~7%). Un alto valor de cenizas, se relaciona con un

alto contenido de minerales; sin embargo, en la literatura revisada no se encontró ningún porcentaje de cenizas para semilla de cáñamo arriba del 8%. Esto podría atribuirse al manejo agronómico, tipo de suelo, o variedad genética.

5.2. Extracción de la fracción no polar con hexano

Se evaluó la concentración de los extractos obtenidos por extracción con hexano empleando dos diferentes tipos de extracción: extracción Soxhlet (1:60) y extracción convencional sólido-líquido (1:7 p/v, 55 °C, 200 rpm) con dos etapas subsecuentes de extracción para agotar el aceite presente en la semilla. Los resultados se presentan en la Tabla 15. La extracción convencional con disolventes se realizó 2 veces de manera secuencial sobre la misma muestra.

Tabla 15. Porcentaje de aceite extraído de la semilla de cáñamo con hexano empleando extracción Soxhlet y sólido-líquido.

Método de extracción	Concentración de aceite (% b.s.)*	Tiempo de extracción (h)	Temperatura (°C)	Eficiencia de extracción (%)
Soxhlet	52±0.5 ^a	4	130	100
Sólido-líquido Etapa 1	44±0.8 ^b	3	55	84.6
Sólido-líquido Etapa 2	6.8±0.2	2	55	13
Sólido-líquido Total	51 ^a	-	55	97.6

*Se presenta la media ± la desviación estándar (n=3). b.s: base seca. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa de acuerdo a la prueba t student ($p < 0.05$)

Se consideró como el contenido total de grasa presente en la semilla de cáñamo, el valor obtenido en el análisis proximal empleando el método Soxhlet que fue de 52%. De acuerdo a los datos presentados, la primera extracción con hexano tuvo una eficiencia de extracción del 84.6% en relación al contenido total de grasa obtenido con el método de extracción total (Soxhlet). A su vez, puede observarse que la Etapa 2 de extracción tuvo una eficiencia del 13%, lo que indica que la mayor parte del aceite presente en la semilla es extraída a partir de la primera extracción. De acuerdo a los resultados obtenidos, se alcanzó una eficiencia total de extracción del 97.6 % empleando el sistema de extracción sólido-líquido con 2 etapas subsecuentes de extracción, esto en relación con la eficiencia obtenida mediante el método Soxhlet. Lo anterior demostró que se pueden obtener altos rendimientos de extracción empleando el método de extracción con disolventes, sin necesidad de emplear las temperaturas elevadas utilizadas en el método Soxhlet. Considerando lo anterior, se eligió un proceso de dos etapas para la obtención de la máxima cantidad de aceite con bajo consumo energético. En las etapas posteriores el aceite extraído fue

procesado mediante membranas de nanofiltración resistentes a disolventes orgánicos para su concentración, purificación y fraccionamiento.

5.3. Nanofiltración con disolventes orgánicos

El proceso de nanofiltración (NF) con disolventes orgánicos, se llevó a cabo en 2 configuraciones de flujo: normal y tangencial. La primera, con el objetivo de evaluar la selectividad de separación y eficiencia de la membrana, y la segunda para incrementar la productividad de las membranas, ya que, al tratarse de un flujo tangencial, se obtiene un flux mayor que en la configuración normal. Además, esta configuración, permite trabajar con volúmenes mayores. Por otra parte, para realizar la concentración, purificación y fraccionamiento de los compuestos hidrofóbicos del extracto crudo de semilla de cáñamo, se implementó un proceso de nanofiltración con disolventes orgánicos (OSN) en 2 etapas subsecuentes de filtración. Asimismo, con el objetivo de concentrar los compuestos de interés en el permeado, se llevó a cabo un proceso de diafiltración, que consistió en la adición de disolvente fresco al tanque de retenido para favorecer la eliminación de compuestos con peso molecular inferior a 600 Da.

La Tabla 16 presenta los principales componentes de interés reportados en la literatura para el aceite de cáñamo, así como los posibles compuestos presentes en cada una de las fracciones del proceso de nanofiltración

Tabla 16. Fraccionamiento esperado de los compuestos reportados en el aceite de semilla de cáñamo [17] mediante nanofiltración en dos etapas según su peso molecular de corte nominal.

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	1ªEtapa	2ªEtapa
		Membrana 600 Da (NF-E1)	Membrana 150 Da (NF-E2)
Cannabidiol (CBD)	314.47	✓	X
Δ -9-Tetrahydrocannabinol (THC)	314.45	✓	X
Mirceno	136.23	✓	✓
β -cariofileno	204.36	✓	X
β -sistosterol	414.71	✓	X
α -Tocoferol	430.71	✓	X
γ -Tocoferol	416.68	✓	X
Metil-salicilato	152.14	✓	✓
Ácido oleico	282.46	✓	X
Ácido linolénico	278.43	✓	X

Ácido linoleico	280.45	✓	X
Fosfolípidos	744	X	X
Triglicéridos	800-900	X	X
Diglicéridos	500-600	X	X
Monoglicéridos	300	✓	X

✓ Indica que, de acuerdo al PMCN de la membrana, el compuesto debería de pasar a través de la membrana (permeado).

X indica que, de acuerdo al PMCN de la membrana, el compuesto debería ser retenido por la membrana (retenido)

PMCN: Peso molecular de corte nominal

5.3.1. Primera etapa de nanofiltración (NF-E1) usando membrana de 600 Da

5.3.1.1. Configuración de flujo normal;

En la primera etapa de nanofiltración, se evaluó la selectividad de la membrana de PMCN de 600 Da cuyo objetivo fue la separación de los compuestos presentes en el aceite de un peso molecular mayor a 600 Da. Estos compuestos corresponden principalmente a glicéridos (diglicéridos y triglicéridos) contenidos en el aceite de cáñamo (Tabla 16). Para estas pruebas se trabajó con un volumen inicial de 150 mL de extracto hexánico y se corrieron 2 lotes.

El factor de rechazo de la membrana de NF de 600 Da en configuración de flujo normal, fue del 80%, lo cual indica que la mayor parte de los constituyentes presentes en el aceite no lograron pasar la membrana, quedando éstos en la fracción retenida. Revisando los estudios reportados en la bibliografía con respecto a los compuestos lipofílicos presentes en la semilla de cáñamo, se puede deducir según la Tabla 16 que la fracción retenida corresponde principalmente a la familia de los glicéridos (fosfolípidos, triglicéridos y diglicéridos), los cuales constituyen aproximadamente del 95 al 98% de la fracción lipídica total [17,64] .

Por otra parte, se calculó el flux de permeado de la NF en configuración normal (flux inicial: 16 L/m²h (Figura 14), en donde, se observó que, a los 10 min, el flujo disminuyó drásticamente manteniéndose en 8 L/m²h. Asimismo, a los 30 min, la curva empezó a hacerse horizontal, lo que indicó el taponamiento de la membrana, debido a que el flujo de alimentación era perpendicular a la membrana. En términos generales, la prueba de flujo normal permitió evaluar la selectividad de la membrana para separar los compuestos de interés. Los resultados obtenidos con esta configuración, mostraron que la membrana seleccionada presenta una eficiencia de separación adecuada, permitiendo el paso de los compuestos de interés (PM < 600 Da) hacia el permeado,

mientras la fracción retenida está compuesta principalmente por glicéridos, los cuales no son relevantes para los objetivos de este estudio.

5.3.1.2. Configuración de flujo tangencial;

Se trabajó con un volumen de alimentación de 620 mL y se corrieron 2 lotes. Asimismo, se calculó el factor de concentración volumétrica (FCV) al final de las corridas con la Ecuación 3. Los FCV de las corridas de NF fueron de 4.27 y de 4.38 para los Lotes 1 y 2, respectivamente, por lo que el volumen del extracto inicial se concentró volumétricamente ~4 veces. La Figura 14 muestra la variación del flux a lo largo del tiempo para ambas configuraciones de NF, en donde, puede observarse que el flux de la membrana BO600 fue mucho mayor (~7 veces) en la configuración tangencial, con un flux inicial de 145 L/m²h y un flux final de 116 L/m²h. Este comportamiento se debe a que el flujo tangencial provoca turbulencia en la superficie de la membrana, lo que evita la aglomeración y adsorción de solutos en la misma, y a su vez provoca disminuciones en el fenómeno de taponamiento [47]. Asimismo, se observó que, aunque después de 60 min el flujo comenzó a disminuir, no llegó a ser una limitante para el proceso (Figura 14). El proceso de nanofiltración en configuración tangencial se detuvo una vez que se alcanzó un factor de concentración volumétrico igual a 4.

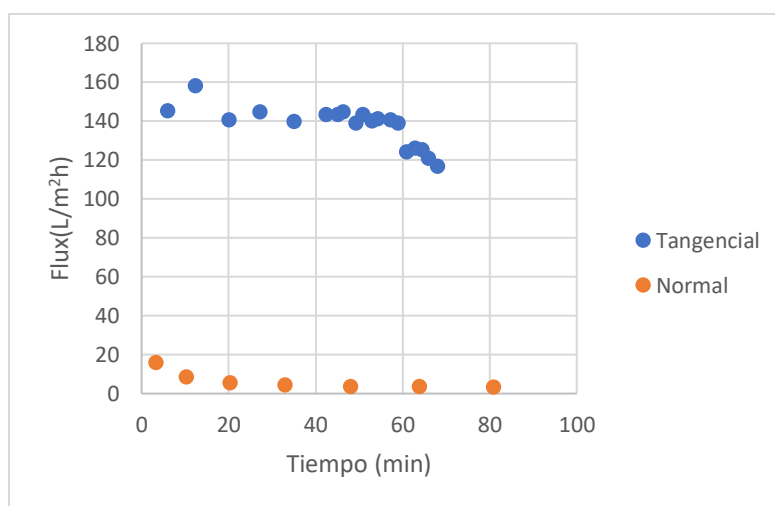


Figura 14. Variación del flux de permeado del extracto de aceite de semilla de cáñamo en función del tiempo empleando una membrana de nanofiltración con disolventes orgánicos Borsig de 600 Da para las configuraciones de flujo normal y tangencial.

Al terminar el proceso de nanofiltración en configuración tangencial, se determinó el factor de concentración del aceite para el retenido, y el factor de rechazo de cada lote, usando la Ecuación 4, y la Ecuación 2, respectivamente, en donde, el componente *i* correspondió a la concentración de aceite. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 17.

Tabla 17. Parámetros de evaluación de la eficiencia de la membrana Borsig de 600 Da en el proceso de nanofiltración con disolventes orgánicos de extractos hexánicos de aceite de semilla de cáñamo en configuración tangencial.

Lote	Flux (L/m ² h)	FCi	%R
1	149	3.4	99.2
2	145	3.5	99.1
Promedio	147±2.8	3.5±0.05	99.2±0.08

Se presenta la media ± la desviación estándar (n=2). %R: Factor de rechazo;
FCi: Factor de concentración del componente i en el retenido.

Como puede observarse, el porcentaje de rechazo en ambos lotes es superior al 99%, lo que indica que el extracto de aceite de cáñamo contiene en mayor proporción compuestos con un PMC superior a 600 Da, los cuales, quedan en el retenido de la nanofiltración. Como se mencionó previamente, la fase grasa del aceite de semilla de cáñamo está constituida principalmente por glicéridos, que representan entre el 95 y el 98 % de los lípidos totales y poseen pesos moleculares de 300 a 900 Da. Estos glicéridos constituyen la fracción mayoritaria del extracto, por lo que un rechazo del 99 % en configuración tangencial sugiere una retención casi completa de estas especies lipídicas. Por otra parte, el factor de concentración del aceite (FCi), que indica la concentración de aceite en el retenido es aproximadamente de 3.5.

Esta primera etapa de NF se utilizó en este proyecto como una etapa previa para remover los glicéridos, y subsecuentemente procesar el permeado en una segunda etapa de nanofiltración (NF-E2) usando una membrana con un peso molecular de corte nominal de 150 Da. Al término de la etapa 1 de NF (NF-E1), se evaporó el disolvente del permeado y se calculó el rendimiento de extracto obtenido en ambos lotes. En total, por cada lote de extracto hexánico procesado, se recuperaron 0.75 ± 0.04 g de extracto seco en la fracción del permeado (1.5 g por ambos lotes). Asimismo, en el retenido se obtuvieron 29.4 ± 6 g de aceite, que corresponden al 86 % del aceite introducido en la alimentación, lo que refleja una alta eficiencia de retención del sistema.

5.3.1.3. Diafiltración

Se realizó la diafiltración (DF) de los retenidos obtenidos a partir del proceso de nanofiltración en configuración de flujo tangencial que se reportó en la subsección anterior (membrana BO600). La fracción retenida de la NF se colocó en el tanque de alimentación, al cual se agregó disolvente fresco hasta completar 4 volúmenes de diafiltración (Ecuación 5). Adicionalmente, se calculó el FCV, obteniéndose un valor de 3.9 para el Lote 1 y de 4.3 para el Lote 2. Respecto al rendimiento de la membrana, se tuvo un flux inicial de 160 L/m²h y un flux final de 93.96 L/m²h, observando una disminución progresiva del flujo a partir de los 60 min, sin llegar a ser una limitante para el

proceso. El proceso de diafiltración en configuración tangencial se detuvo una vez que se obtuvo un volumen de diafiltración (VD) igual a 4. Al finalizar el proceso, se evaporó el disolvente del permeado y se calculó el rendimiento del diafiltrado para ambos lotes, obteniéndose un total de 1.2 g de extracto seco. Esta fracción se mezcló posteriormente con el extracto recuperado (1.5 g) del permeado en la nanofiltración tangencial (NF-E1), alcanzando un rendimiento total de 2.7 g de extracto. Por lo tanto, el aporte de la diafiltración representó aproximadamente el 44.4 % del extracto total obtenido a partir del permeado, lo que resalta su importancia como una etapa complementaria para la recuperación de compuestos de bajo peso molecular. Sereewatthanawut et al. [51] indicaron que después de procesar 4 volúmenes de diafiltración en aceite de salvado de arroz, lograron incrementar un 80% la recuperación de γ -orizanol en el permeado. De acuerdo a estos resultados, el proceso de diafiltración fue de gran utilidad ya sea para remover impurezas del retenido y para aumentar el rendimiento de recuperación de los solutos de interés en el permeado de la primera etapa de nanofiltración.

5.3.2. Segunda etapa de nanofiltración (NF-E2) usando una membrana de 150 Da

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de esta etapa de NF, fue la concentración de compuestos de interés como tocoferoles, cannabinoides y terpenos, presentes en el permeado obtenido en la primera etapa de nanofiltración (NF-E1). Con este fin se propuso el uso de una membrana de nanofiltración OSN con un PMCN de 150 Da (DM150). De manera similar a la etapa anterior, en esta etapa de NF se emplearon las configuraciones de flujo normal y tangencial.

5.3.2.1. Configuración de flujo normal

Se realizaron pruebas de nanofiltración en configuración de flujo normal con el objetivo de caracterizar la selectividad de la membrana empleada en la segunda etapa del proceso, para la concentración de los compuestos presentes en el permeado obtenido en la etapa NF-E1. Inicialmente, se procesó el permeado disuelto en hexano; sin embargo, el flujo observado fue demasiado bajo ($< 0.3 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}$), lo que limitó la viabilidad del proceso. Por lo tanto, debido a las características de esta membrana, como su estructura entrecruzada y su polaridad, fue necesario buscar un sistema compatible que permitiera el procesamiento eficiente del extracto. Se requería un disolvente con una polaridad intermedia, que pudiera disolver los compuestos presentes en los extractos obtenidos en la primera etapa de nanofiltración, pero también que fuese compatible con las características de la membrana DM150. Para ello, se analizaron las estructuras químicas y constantes dieléctricas de diversos disolventes. Finalmente, considerando las características

del sistema soluto–disolvente–membrana, se determinó que era necesario sustituir el disolvente inicial (hexano) por tetrahidrofurano (THF). La elección del THF se basó en su constante dieléctrica (~ 7.6), su buena capacidad para disolver compuestos lipofílicos y su compatibilidad con membranas de naturaleza polimérica, como la DM150. Para las pruebas con esta configuración, se utilizó un volumen inicial de 150 mL de THF, obteniéndose un flujo promedio de 2 L/m²h. Si bien este valor sigue siendo bajo en comparación con el flujo registrado en la etapa NF-E1, representa una mejora significativa respecto al sistema anterior con hexano (0.3 vs 2 L/m²h). Este comportamiento era de esperarse, considerando el bajo PMC y la naturaleza estructural de la membrana.

5.3.2.2. Configuración de flujo tangencial

Se trabajó con un volumen de alimentación de 500 mL y se corrieron 2 lotes. Asimismo, se calculó el factor de concentración volumétrica (FCV) con la Ecuación 3. Para el Lote 1, el FCV fue de 2 y de 1.9 para el Lote 2, lo que indica que, de manera general, el volumen del extracto inicial se concentró ~ 2 veces. Por otra parte, en esta configuración, en general, se obtuvieron fluxes de permeado muy bajos en relación con los obtenidos en la etapa de NF anterior: ~ 2 y ~ 0.7 L/m²h, al inicio y al final de las corridas, respectivamente (Tabla 18).

Tabla 18. Parámetros de evaluación de la eficiencia de la membrana Duramem de 150 Da en el proceso de nanofiltración en configuración tangencial.

Lote	Flux (L/m ² h)	FCV
1	1.84	2.04
2	1.25	1.9
Promedio	1.55 $\pm$ 0.42	1.97 $\pm$ 0.09

Se presenta la media $\pm$ la desviación estándar (n=2). FCV: Factor de concentración volumétrica

Aunque los valores de flux obtenidos fueron bajos en comparación con los de la etapa de filtración previa (NF-E1), se ha reportado que las membranas Duramem presentan valores de flux inferiores a 5 L/m²h, lo que sugiere que los resultados obtenidos están dentro de los valores reportados (2-8 L/m²h) [51], sin embargo, no implica que sean flujos adecuados para un procesamiento a escala productiva. Después de 49 horas de proceso (7 h diarias durante 7 días) por lote, la nanofiltración se detuvo debido a la disminución drástica del Flux (~ 0.7 L/m²h). Considerando el bajo peso molecular de corte (150 Da) y la estructura entrecruzada de las membranas se esperaba que el flux fuese bajo; sin embargo, las limitaciones de flujo que se tuvieron fueron demasiado críticas, resultando en un proceso lento. Esto implica que en el futuro se deberían de buscar alternativas tecnológicas para mejorar el desempeño de las membranas, es decir, obtener fluxes más elevados en el orden de los obtenidos en la etapa NF-E1, o al menos

por arriba de 50 L/m²h. En esta etapa se buscaba principalmente eliminar los ácidos grasos libres y concentrar compuestos bioactivos de interés, tales como cannabinoides, terpenos y tocoferoles. Según el factor de concentración volumétrica (Tabla 18), el extracto se concentró aproximadamente dos veces, lo que indica que esta etapa fue efectiva para la retención de compuestos de interés. No obstante, no se implementó el proceso de diafiltración debido al bajo Flux obtenido, el cual habría limitado significativamente su viabilidad operativa. A partir del proceso de nanofiltración con la membrana DM150, se introdujeron al sistema 2.7 g de extracto disueltos en THF, los cuales fueron procesados en dos lotes. Como resultado, se recuperaron 0.42 ± 0.2 g por lote en el retenido y 0.039 ± 0.01 g por lote en el permeado, lo que representa un total de 0.918 g recuperados al finalizar ambos lotes. Este valor corresponde a un rendimiento del 34 % con respecto a la masa total introducida. El rendimiento obtenido también refleja pérdidas significativas del extracto, probablemente atribuidas al remanente que quedó en el equipo.

5.3.3. Análisis global del sistema de fraccionamiento por nanofiltración

Adicionalmente, con el propósito de comprender el fraccionamiento progresivo de la muestra, se llevó a cabo un balance de materia considerando la concentración de aceite presente en cada una de las etapas de nanofiltración implementadas en el presente estudio.

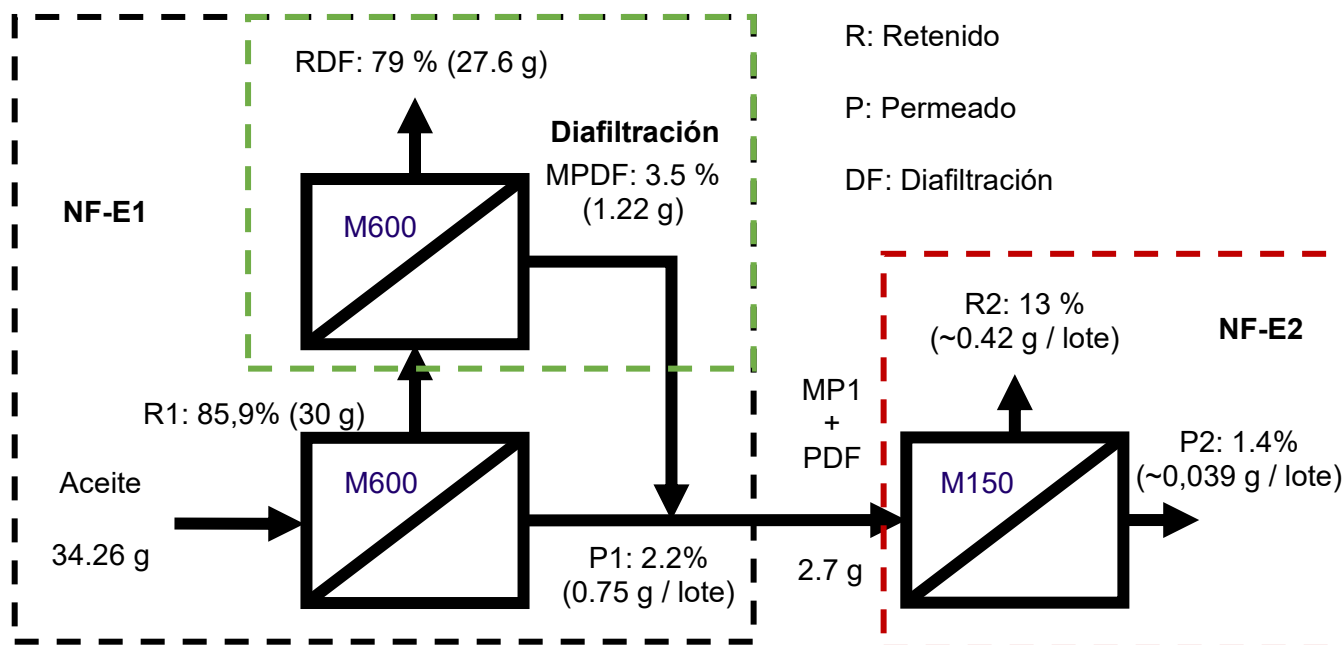


Figura 15. Balance de materia de extracto de aceite de cáñamo pasado por membranas de nanofiltración (NF) resistentes a disolventes orgánicos. NF-E1: Primera etapa de NF (Borsig, 600 Da); DF: diafiltración; NF-E2: Segunda etapa de NF (Duramem, 150 Da); P: Fracción permeada; R: Fracción retenida.

5.3.4. Primera etapa de nanofiltración (NF-E1) usando una membrana de 600 Da

Como se observa en la en Figura 15, el mayor porcentaje de aceite recuperado se obtuvo en el retenido R1, con un 85.9 % del extracto inicial procesado. Después de realizar el proceso de diafiltración, la cantidad de aceite en el retenido disminuyó ligeramente, hasta un 79.0 %, lo que se debe probablemente a la remoción de compuestos de bajo peso molecular hacia el permeado durante el lavado por diafiltración. El permeado correspondiente a la primera etapa de nanofiltración (NF-E1-P) representó el 2.2 % del extracto inicial (5.5% por los 2 lotes). Por otra parte, a partir del permeado generado tras la diafiltración (DF-P) se recuperó un 3.5 % adicional (en total por 2 lotes), en relación con el extracto de alimentación. Esto se esperaba debido a que durante la primera etapa de NF se removió la mayor parte de los compuestos de bajo peso molecular (inferiores a 600 Da), lo que redujo la concentración de estos compuestos en las siguientes etapas.

Posteriormente, se realizó la mezcla del aceite obtenido en ambos lotes de permeado (NF-E1-P) y del permeado de diafiltración (DF-P). Esta mezcla dio lugar a un extracto con una cantidad total de aceite de 2.7 g, el cual fue utilizado como extracto de alimentación para la siguiente etapa de NF (NF-E2). De acuerdo a los resultados obtenidos, puede observarse que durante esta primera etapa se tuvo una alta eficiencia (recuperando alrededor del 88 % en las corrientes de permeado y retenido), y también que el proceso de diafiltración ayudó a la recuperación de una mayor cantidad de los compuestos de interés presentes en el retenido de la nanofiltración que de otra manera se hubieran perdido.

5.3.5. Segunda etapa de nanofiltración (NF-E2) usando una membrana de 150 Da

A partir del proceso de nanofiltración utilizando la membrana DM150, con un peso de corte molecular de 150 Da, se obtuvo un permeado que representa aproximadamente el 1.2% (recuperándose el 2.9% por los 2 lotes procesados) de la cantidad total de aceite presente en el extracto de alimentación al sistema. Por otra parte, en el retenido se recuperaron aproximadamente el 31.1 % por los 2 lotes procesados. Estos resultados evidencian una baja eficiencia de la membrana DM150 para retener compuestos de este peso molecular, lo que sugiere que una parte significativa de la muestra atraviesa la membrana, sin embargo, también puede observarse que la cantidad de muestra presente en el permeado representa aproximadamente el 1.2% lo indica que hubo pérdidas significativas en el sistema. Estas pérdidas se atribuyen principalmente a posibles remanentes en las paredes internas del equipo y al proceso de trasvasado de las mismas durante el proceso de nanofiltración. Los resultados

presentes, indican el bajo porcentaje de recuperación que presentaron las membranas de nanofiltración Duramem 150. Lo anterior podría atribuirse a la estructura entrecruzada de la membrana, la cual, al tener un peso molecular de corte (PMC) bajo, es más propensa a sufrir polarización en etapas tempranas del proceso. Esto genera una rápida disminución del flux, lo que limita la capacidad del sistema para seguir concentrando compuestos, afectando negativamente la recuperación total. Asimismo, la selectividad de la membrana hacia compuestos no polares podría ser otro factor determinante, ya que este tipo de membranas suele presentar mejor desempeño con moléculas medianamente polares. Además de que el tipo de muestra y la naturaleza química de los compuestos presentes también influyen en la eficiencia del proceso.

En términos de balance de masa, durante la segunda etapa de nanofiltración se estimó que aproximadamente el 72% del aceite total no fue recuperado ni en el permeado ni en el retenido, lo que indica pérdidas potenciales en el sistema. Estas pérdidas representan una limitante técnica para procesos de recuperación de aceite mediante nanofiltración y sugieren la necesidad de optimizar las condiciones operativas, evaluar otras membranas con un menor peso de corte molecular o implementar estrategias adicionales, como etapas de pretratamiento, para mejorar la eficiencia del proceso. A continuación, en la Tabla 19 se presentan los resultados del balance de masa, en los cuales se muestra el porcentaje de extracto recuperado por lote en cada etapa del proceso de nanofiltración con disolventes orgánicos.

Tabla 19. Rendimiento de las fracciones obtenidas en las 2 etapas de nanofiltración con disolventes orgánicos.

Etapa	Proceso	Membrana	Corriente	Recuperación en proceso (%)
NF-E1	NF	BO (600 Da)	Retenido	85.9±0.04
NF-E1	NF	BO (600 Da)	Permeado	5.5±6
NF-E1	DF	BO (600 Da)	Retenido	79±3
NF-E1	DF	BO (600 Da)	Permeado	3.5*
NF-E2	NF	DMT1 (150 Da)	Retenido	31.1±0.01
NF-E2	NF	DMT1 (150 Da)	Permeado	2.9±12.3

Se presenta la media ± desviación estándar (n=2). P: permeado; R: retenido; DF: Diafiltración; NF: Nanofiltración; * Indica que solo se obtuvo un lote

Como se muestra en la Tabla 19, la etapa en las que se obtuvieron los mayores valores de balance de masa fue la etapa NF-E1. En contraste, a partir de la segunda etapa NF-E2, en la

que se empleó una membrana Duramem 150, la contabilización de masa disminuyó significativamente.

De acuerdo a lo anterior, ocurrió una pérdida significativa en la segunda etapa de nanofiltración, la cual fue cercana al 80%. Esta pérdida podría deberse a que, posterior a dicha etapa, se realizaron varias filtraciones adicionales con el fin de eliminar impurezas presentes en los extractos, durante las cuales una fracción del material pudo haber quedado retenida. A pesar de lo mencionado anteriormente, la primera etapa de nanofiltración NF-E1 utilizando la membrana BO600 mostró una alta eficiencia. De acuerdo a los componentes reportados en el aceite de cáñamo (Tabla 16), se estima que en el retenido obtenido tras la segunda etapa de nanofiltración con la membrana DM150 se encuentran concentrados compuestos con pesos moleculares entre 500 y 200 Da, tales como tocoferoles y cannabinoides.

5.4. Determinación de actividad antioxidante

5.4.1. Actividad antioxidante del aceite de semilla de cáñamo crudo

Se determinó la actividad antioxidante del extracto crudo de aceite de semilla de cáñamo mediante la medición de la capacidad de éste para inhibir el radical DPPH. La Tabla 20 presenta los resultados obtenidos.

Tabla 20. Actividad antioxidante del aceite crudo de semilla de cáñamo.

Actividad antioxidante (mg Trolox/100 g muestra)		
Aceite de cáñamo obtenido	Uluata et al. [65]	Senila et al. [66]
45.7±0.6	62.37	100
Se presenta la media ± la desviación estándar (n=3).		

Asimismo, se determinó el valor de IC₅₀ del aceite de semilla de cáñamo, de acuerdo con lo descrito en la Sección 4.6.1. Este valor representa la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50 % de los radicales libres DPPH. El resultado obtenido fue de 55.4 g/L, en contraste, el estándar Trolox, presentó un IC₅₀ de 0.025 g/L. Esto significa que la concentración de aceite para alcanzar una inhibición del 50 % del radical DPPH es aproximadamente 2100 veces mayor que la requerida por el estándar Trolox, lo que refleja una menor capacidad antioxidante. Para permitir una mejor comparación con la literatura, se calculó la actividad antioxidante en equivalentes Trolox (Tabla 20), obteniéndose un valor de 45.7 mg Trolox/100 g de muestra. Uluata et al. [65] reportaron una actividad antioxidante para el aceite de semilla de cáñamo de

62.37 mg Trolox/100 g de aceite, lo cual indica que el aceite de semilla de cáñamo obtenido presenta una capacidad antioxidante menor en comparación con el reportado por dichos autores. De igual forma, Senila et al. [67] reportaron una actividad antioxidante superior a la de este trabajo: 100 mg Trolox/100 g de aceite.

Aunque el aceite de semilla de cáñamo contiene compuestos antioxidantes como tocoferoles y tocotrienoles (presentes en una proporción aproximada del 0.1% [40]) el aceite empleado, presentó una baja actividad antioxidante, en comparación con otros aceites, como el aceite de laurel: 85.8 mg Trolox/ 100 g aceite, y el aceite de ortiga: 85.8 mg Trolox/100 g aceite [67]. No obstante, el valor obtenido para el aceite de semilla de cáñamo es consistente con lo reportado en la literatura. De acuerdo a Ostapczuk et al. [67] la baja actividad antioxidante del aceite de semilla de cáñamo, puede atribuirse a su inestabilidad, debido a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales, tienden a la oxidación [67]. Si bien el poder antioxidante encontrado para el aceite de semilla de cáñamo no es elevado en comparación con otros aceites comerciales, no se descarta que sea un producto que pueda tener potencial mediante la concentración de sus constituyentes y por ende tener efectos benéficos a la salud. Con base en esta consideración, el objetivo principal del presente trabajo fue concentrar los compuestos lipofílicos presentes en el extracto hexánico de la semilla de cáñamo. A continuación, la Tabla 21 presenta los resultados obtenidos al evaluar la actividad antioxidante de cada una de las fracciones obtenidas mediante nanofiltración resistente a disolventes orgánicos (OSN).

Tabla 21. Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas por nanofiltración con disolventes orgánicos empleando membranas de 600 y 150 Da.

Etapa	Membrana	Corriente	Actividad antioxidante (mg Trolox/100 g muestra)
Aceite inicial	-	-	45.7±0.6 ^a
NF-E1	BO (600 Da)	Retenido	31±1.0 ^b
NF-E1	BO (600 Da)	Permeado	96.5±1.0^c
NF-E2	DMT1 (150 Da)	Retenido	70.2±3.3 ^d

Se presenta la media ± la desviación estándar (n=3). Las letras diferentes indican que existe una diferencia significativa de acuerdo a los resultados de la prueba Tukey (p < 0.05).

5.4.2. Primera etapa de nanofiltración (NF-E1) usando una membrana de 600 Da

5.4.2.1. Retenido

Se determinó la actividad antioxidante del retenido obtenido en la primera etapa de nanofiltración (NF-E1) la cual, se espera está compuesta principalmente por glicéridos (diglicéridos y triglicéridos). Como se observa en la Tabla 21, la actividad antioxidante del retenido fue de 31

mg Trolox por 100 g de muestra, lo que representa una disminución de aproximadamente 1.5 veces en comparación con el aceite de semilla de cáñamo inicial (45.7 ± 0.6 mg Trolox/100 g muestra). Esta disminución sugiere que, durante la nanofiltración, compuestos con actividad antioxidante, como tocoferoles y cannabinoides, fueron removidos en el permeado. Sin embargo, a pesar de lo mencionado anteriormente, el retenido de esta etapa de nanofiltración aún muestra actividad antioxidante, que puede atribuirse a la formación de asociaciones químicas entre compuestos antioxidantes y lipídicos [68]. Estas asociaciones pueden estabilizar los radicales libres, contribuyendo a la actividad observada.

5.4.2.2. *Permeado*

La actividad antioxidante del permeado de la etapa NF-E1, que incluyó la fracción obtenida durante la diafiltración (mezcla de permeados), presentó un aumento significativo respecto al aceite de semilla de cáñamo sin tratar. De acuerdo con los datos presentados en la Tabla 21, la actividad antioxidante aumentó aproximadamente al doble, pasando de 45.7 a 96.5 mg Trolox/100 g de muestra, con un incremento del 111% respecto al valor inicial. Este aumento sugiere que los compuestos antioxidantes presentes en el aceite poseen, en su mayoría, pesos moleculares inferiores al peso molecular de corte real de la membrana (PMCN = 600 Da), por lo que lograron atravesar la membrana. Entre los compuestos de bajo peso molecular presentes en el aceite de semilla de cáñamo de acuerdo a la literatura (Tabla 16) se encuentran los tocoferoles, principalmente el γ -tocoferol (416 Da), conocido por su potencial antioxidante. Asimismo, otros compuestos que pudieron posiblemente contribuir a esta actividad fueron el cannabidiol (CBD, 314.47 Da) y algunos terpenos como el mirceno (136.23 Da).

Estos resultados indican que la membrana Borsig ONF-1, con un peso molecular de corte nominal de 600 Da, permitió una separación eficiente de los principales compuestos antioxidantes del aceite. La presencia de estos compuestos en el permeado se reflejó en una mayor actividad antioxidante, lo cual, destaca el potencial de la nanofiltración como una técnica viable para la concentración de compuestos de interés. Cabe destacar que la actividad antioxidante del permeado superó a la observada en varios aceites comerciales, como los mencionados en la sección anterior.

5.4.3. Segunda etapa de nanofiltración (NF-E2) usando una membrana de 150 Da

5.4.3.1. *Retenido*

Durante esta etapa del proceso, se esperaba que la concentración de compuestos antioxidantes en el retenido aumentara, lo que implicaría una mayor actividad antioxidante. Las fracciones analizadas. No obstante, como se muestra en la Tabla 21, la actividad antioxidante del permeado

(96.5 mg T/100 g muestra) obtenido durante la primera etapa de nanofiltración (NF-E1) fue aproximadamente 1.3 veces mayor que la del retenido (70.2 mg T/100 g muestra) correspondiente a la etapa NF-E2. Este comportamiento puede atribuirse a diversos factores. En primer lugar, la selectividad de la membrana de 150 Da, ya que probablemente permitió el paso de una fracción de los compuestos antioxidantes más pequeños hacia el permeado. No obstante, es importante destacar que, pese a no alcanzar la actividad antioxidante del permeado NF-E1, el retenido de la membrana de 150 Da mostró una actividad antioxidante 1.5 veces mayor que la del aceite de semilla de cáñamo sin tratar, lo que indica que el proceso de fraccionamiento permitió la retención parcial de compuestos y representa una mejora respecto al aceite original. Asimismo, es importante señalar que las fracciones obtenidas (NF-E1 y NF-E2) fueron evaluadas dentro de un rango similar de concentración (10 a 55 g/L), lo que sugiere que las diferencias observadas en la actividad antioxidante no se deben a la cantidad de muestra utilizada, sino a una variación en la composición de las mismas.

Los resultados indican que la membrana DM150 logró retener compuestos con actividad antioxidante; no obstante, esta fracción no mostró un aumento significativo en dicha actividad en comparación con el permeado obtenido en la etapa NF-E1. Estos resultados sugieren la necesidad de desarrollar membranas con una mayor eficiencia en la separación de compuestos de bajo peso molecular, empleando materiales alternativos que permitan optimizar el proceso y obtener fracciones con una mayor actividad antioxidante, además de obtener buenos flujos del permeado.

5.5. Actividad antimicrobiana del aceite crudo de semilla de cáñamo y sus fracciones obtenidas por nanofiltración

5.5.1. Crecimiento de microorganismos patógenos

Se trabajó con 3 microorganismos patógenos relacionados con enfermedades transmitidas por alimentos (ETA): *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) y *Listeria monocytogenes*. La Tabla 22 presenta el crecimiento alcanzado por *L. monocytogenes* a las 16 h y para *E. coli* y *S. typhi* a las 20 h de incubación. Como puede observarse, el orden de crecimiento de las 3 cepas fue alrededor de 10^7 - 10^9 UFC/mL, lo cual corresponde a los valores reportados en estudios de evaluación de actividad antimicrobiana [40,69,70].

Tabla 22. Crecimiento de microorganismos patógenos a las 16 y 20 h de incubación.

Microorganismo	Crecimiento (UFC/mL)
<i>Listeria monocytogenes</i> ^a	9.3x10 ⁸ ±0.04
<i>Salmonella typhi</i> ^b	1.5x10 ⁹ ±0.05
<i>Escherichia coli</i> ^b	6.7x10 ⁷ ±0.02

Se presenta la media ± la desviación estándar (n=3). Tiempos de incubación: 16 h^a, 12 h^b.

5.5.2. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas mediante nanofiltración, así como, del aceite de semilla de cáñamo sin procesar, se presentan en la Tabla 23. En estos ensayos, se determinaron los halos de inhibición (en mm) contra *L. monocytogenes*, *S. typhi* y *E. coli* a concentraciones de 1, 10 y 50 mg/mL.

En general, se observó que la actividad antimicrobiana fue dependiente de la concentración del extracto. No hubo inhibición en ninguna de las fracciones ni del aceite a concentraciones de 1 o 10 mg/mL. Solo a la concentración de 50 mg/mL se presentaron halos de inhibición, lo que indica que se requieren concentraciones elevadas para observar un efecto antimicrobiano. Asimismo, se observa que el proceso de nanofiltración con disolventes orgánicos fue eficaz, ya que permitió concentrar compuestos bioactivos en algunas fracciones, las cuales mostraron actividad antimicrobiana contra los patógenos evaluados, en los cuales el aceite sin procesar no presentó ningún efecto, como es el caso de *L. monocytogenes* y *S. typhi*.

Tabla 23. Halos de inhibición producidos por las fracciones de nanofiltración contra microorganismos patógenos.

Microorganismo patógeno de prueba		<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Salmonella typhi</i>			<i>Escherichia coli</i>		
Concentración (mg/mL):		1	10	50	1	10	50	1	10	50
Etapa	Corriente	Halos de inhibición (mm)								
Aceite		0	0	1.1±0.2 ^a	0	0	0 ^a	0	0	0
NF-E1	Retenido	0	0	0.8±0.2 ^{ab}	0	0	1.8±0.0 ^b	0	0	0
NF-E1	Permeado	0	0	0.4±0.4 ^{bc}	0	0	1.2±0.5 ^c	0	0	0
NF-E2	Retenido	0	0	0.3±0.5 ^c	0	0	1±0.8 ^c	0	0	0
NF-E2	Permeado	0	0	0.2±0.3 ^c	0	0	0 ^a	0	0	0

R: retenido, P: permeado, L: lote. Se presenta la media ± desviación estándar (n = 3). El análisis se realizó de forma independiente para cada columna. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, según los resultados de la prueba de Tukey (p < 0.05).

El tratamiento más efectivo contra *L. monocytogenes*, fue el aceite de cáñamo sin procesar, con un halo de inhibición de 1.1 ± 0.2 mm, seguido del retenido de la primera etapa de nanofiltración (NF-E1), que presentó un halo de inhibición 0.8 ± 0.2 mm (Figura 16). De acuerdo con la prueba

de Tukey ($p < 0.05$), ambas fracciones presentaron diferencias significativas respecto al resto de fracciones evaluadas. En el caso de *S. typhi*, el extracto crudo no presentó actividad antimicrobiana, sin embargo, el retenido de la NF-E1 presentó un halo de inhibición de 1.8 ± 0.0 mm, seguido del permeado de la NF-E1 con 1.2 ± 0.5 mm de inhibición y el retenido de la NF-E2 con 1.0 ± 0.8 mm. Para ECEP, no se observó actividad antimicrobiana en ninguna fracción ni en el aceite.

A diferencia de los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante, el aceite sin procesar y el retenido obtenido en la etapa de nanofiltración NF-E1 presentaron la mayor actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. En el caso de *S. typhi*, el retenido de la NF-E1 mostró un halo de inhibición significativamente mayor en comparación con el resto de las fracciones. Dado que estas fracciones se componen principalmente de glicéridos, es probable que tanto estos compuestos como los ácidos grasos que los integran contribuyan a la actividad antimicrobiana observada. Mikulcová et al. [40] han señalado que dicha actividad se asocia principalmente a ácidos grasos insaturados de cadena larga, como el ácido oleico, linoleico y linolénico. No obstante, con base en los resultados de la actividad antioxidante, se esperaba que el permeado de la NF-E1 fuera una de las fracciones con mayor actividad antimicrobiana. Asimismo, se anticipaba que el retenido de la NF-E2 presentara la mayor eficacia antimicrobiana. Sin embargo, esta última fracción no mostró diferencias significativas respecto al permeado de la NF-E1.

Los resultados muestran que *L. monocytogenes* (Gram +) fue la más susceptible, seguida de *S. typhi* (Gram -), mientras que *E. coli* fue completamente resistente. Esta resistencia puede explicarse por la presencia de una membrana externa de lipopolisacáridos presente en las bacterias Gram negativas, la cual actúa como una capa protectora haciéndola más resistente a los compuestos lipofílicos presentes en los extractos de aceite de cáñamo y sus fracciones nanofiltradas [67]. Además, se ha reportado que la cantidad de lipopolisacáridos en la membrana de las bacterias Gram negativas puede determinar la eficacia de algunos cannabinoides contra ciertos microorganismos patógenos, esto es que cuanto mayor sea el contenido de lipopolisacáridos, menor será la probabilidad de que los cannabinoides ejerzan su actividad antimicrobiana [67]. Sin embargo, a pesar de que *S. typhi* es una bacteria gramnegativa, diversos informes han señalado que suele ser más susceptible a ciertos ácidos grasos debido a la composición de su membrana celular. [71].

Ostapczuk et al. [67] han reportado que incluso pequeñas cantidades de cannabidiol (CBD) pueden tener actividad contra bacterias Gram positivas. Asimismo, Ali et al. [70] reportaron mayor

actividad antimicrobiana del HSO frente a bacterias Gram positivas. Por su parte, Mikulcová et. al [40] evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite de semilla de cáñamo contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos en donde se observó que ECEP fue uno de los microorganismos más resistentes (0.0 mm de inhibición). Asimismo, estos autores, reportaron halos de inhibición para microorganismos Gram positivos como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus* en un rango de 2 a 3 mm.

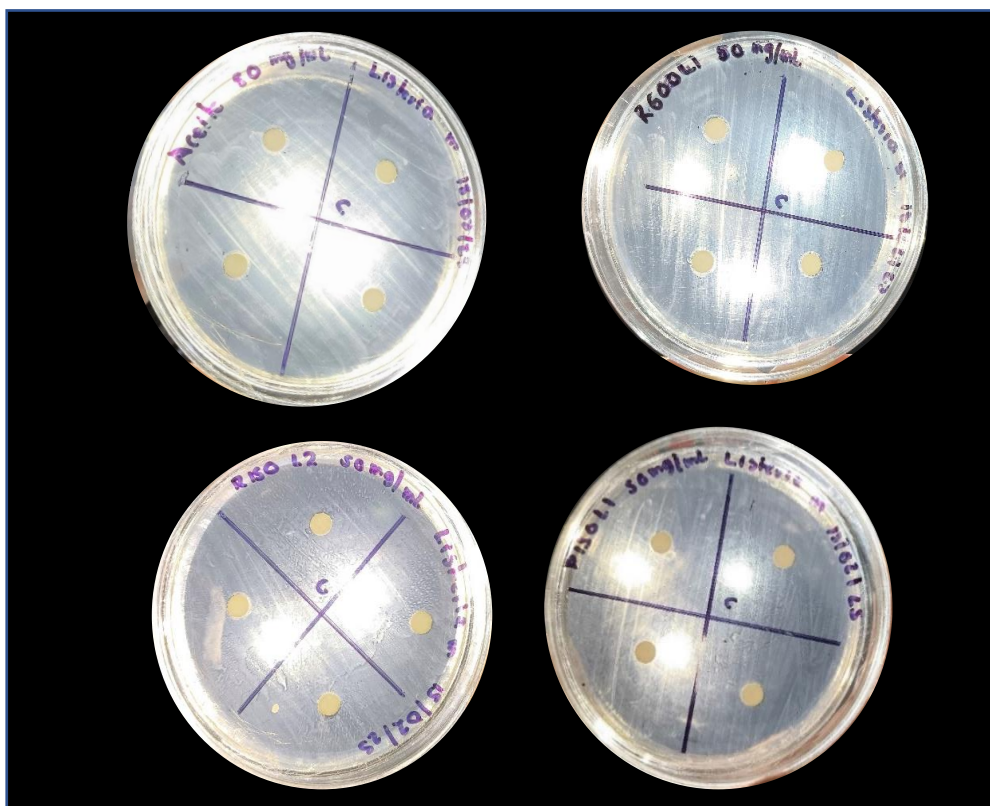


Figura 16 Actividad antimicrobiana del extracto de aceite crudo de la semilla de cáñamo, así como sus fracciones obtenidas por nanofiltración con solventes orgánicos contra *L. monocytogenes* a una concentración de 50 mg/mL: a) Aceite sin procesar, b) NF-E1 R, c) NF-E2 R, d) NF-E2 P.

De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que el aceite de semilla de cáñamo presentó actividad únicamente frente al microorganismo patógeno en alimentos *L. monocytogenes*, que es un microorganismo Gram positivo, mientras que tuvieron poco o nulo efecto sobre células de *S. typhi* y ECEP, bacterias Gram negativas. No obstante, es importante señalar que los valores de halo de inhibición obtenidos fueron relativamente bajos, lo que sugiere una actividad antimicrobiana limitada. Este resultado podría atribuirse a las características de la muestra utilizada, así como a la baja concentración de compuestos antimicrobianos presentes en la muestra original. Se ha reportado que el HSO comercial contiene aproximadamente 10 mg/kg de CBD, lo que podría ser insuficiente para generar una inhibición significativa frente a bacterias

Gram negativas [67]. Sin embargo, a pesar de ello, posteriormente, se recomienda caracterizar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana observada. Se ha sugerido que otros compuestos como ácidos grasos, omega-3, tocoferoles y terpenos podrían contribuir al efecto antimicrobiano [17,40,67].

6. CONCLUSIONES

En la presente investigación, se llevó a cabo la extracción y refinación de aceite de semilla de cáñamo mediante nanofiltración con disolventes orgánicos, así como la evaluación de su actividad antioxidante y antimicrobiana. El análisis proximal mostró que la materia prima elegida es una adecuada fuente de lípidos (52.5%). El proceso de extracción sólido-líquido en dos etapas utilizando hexano como disolvente, alcanzó una eficiencia del 97.6% bajo las condiciones evaluadas (55°C, 3 horas, 200 rpm), considerando la extracción Soxhlet como el modelo de extracción total, lo que mostró una alta eficiencia.

Para realizar el fraccionamiento y concentración de los extractos hexánicos crudos, se implementó un sistema de nanofiltración (NF) con disolventes orgánicos de dos etapas. En la primera etapa (NF-E1) se usó una membrana de NF BO600 con un peso molecular de corte nominal (PMCN) de 600 Da en un proceso de nanofiltración seguido por diafiltración. En la segunda etapa (NF-E2) se empleó una membrana DM150 con un PMCN de 150 Da. Respecto al desempeño del proceso, en la etapa NF-E1, la nanofiltración demostró ser eficiente, con valores de flujo óptimos ($\sim 147 \pm 2.8 \text{ L/m}^2\text{h}$) y factores de rechazo superiores al 99%, permitiendo una adecuada separación de los glicéridos del aceite. Asimismo, el proceso subsecuente de diafiltración en esta etapa ayudó a la recuperación de compuestos que no fueron removidos en el proceso de nanofiltración (44%).

Por otra parte, en la segunda etapa del sistema de separación, se identificaron limitaciones importantes en el uso de membranas de 150 Da (DM150), ya que, a pesar de permitir una separación de los compuestos presentes en el permeado de la primera etapa ($\sim 34\%$), el flux de trabajo fue insuficiente para una operación eficiente ($1.55 \pm 0.42 \text{ L/m}^2\text{h}$).

Con respecto a los resultados de actividad antioxidante, se observó que el aceite de semilla de cáñamo sin procesar mostró resultados comparables con lo reportado en la literatura (45.7 mg Trolox/100 g). Al evaluar la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas mediante nanofiltración, se observó un incremento significativo en la misma, particularmente en el permeado obtenido en la etapa NF-E1, usando la membrana BO600, donde se duplicó la actividad respecto a la muestra original (45.7 vs 96.5 mg Trolox/100 g). El retenido de la NF-E2 también presentó una mejora (70.2 mg Trolox/100 g), aunque menor a la del permeado NF-E1, lo que indica que parte de los compuestos antioxidantes lograron ser concentrados.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, aunque el aceite sin procesar no presentó actividad significativa, la mayoría de las fracciones obtenidas por nanofiltración mostraron inhibición contra

Listeria monocytogenes y *Salmonella typhi* a concentraciones en el orden de 50 mg/mL . Estos resultados sugieren que la nanofiltración es una técnica prometedora para concentrar compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

Finalmente, en esta investigación se pudo comprobar el potencial de la nanofiltración como herramienta para la concentración de compuestos de interés. Uno de los aportes más significativos de este trabajo fue haber logrado, por primera vez en esta área de estudio, un fraccionamiento del extracto lipofílico de aceite de semilla de cáñamo mediante nanofiltración en dos etapas que permitió lograr un fraccionamiento selectivo de los componentes del aceite. Particularmente, la etapa NF-E1 (600 Da) no solo permitió remover eficientemente los glicéridos de alto peso molecular, sino que también generó un permeado rico en compuestos antioxidantes, cuya actividad antioxidante fue más del doble respecto al aceite sin tratar. Asimismo, se evidenció una mejora en la actividad antimicrobiana en las fracciones obtenidas, especialmente frente a *L. monocytogenes* y *S. typhi*. En el caso de la etapa de nanofiltración de alto refinamiento (NF-E2), que involucra una separación en el orden de los 150 Da, el proceso mostró problemas técnicos importantes relacionados al desempeño del flujo volumétrico del permeado; tales limitaciones pueden impulsar una nueva línea de investigación enfocada en la creación de nuevas membranas de nanofiltración para la separación de compuestos orgánicos no polares, que tengan productividades volumétricas adecuadas para su escalamiento a nivel comercial. En general este proyecto cumplió con los objetivos planteados al concentrar los compuestos presentes en el aceite de semilla de cáñamo y se puede aplicar para realizar separaciones de distintos tipos de compuestos bioactivos a nivel industrial, y con eso la posibilidad de potenciar la producción de extractos con propiedades nutracéuticas, cosméticas o farmacológicas, contribuyendo al desarrollo de ingredientes naturales con aplicaciones específicas en la industria de alimentos.

7. PERSPECTIVAS

El presente trabajo evaluó la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite de semilla de cáñamo y de sus fracciones obtenidas mediante nanofiltración con disolventes orgánicos. Para conocer qué compuestos son los que presentan dicha actividad, se propone como siguiente paso la identificación y cuantificación de los compuestos bioactivos presentes en las fracciones de permeado y retenido (Etapas 1 y 2) mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), así como el análisis del perfil de ácidos grasos mediante el método FAME. Asimismo, se considera necesario el desarrollo de nuevas membranas con un menor peso molecular de corte, que permitan optimizar el flujo durante la nanofiltración, especialmente cuando se emplean disolventes no polares como el hexano, aumentando la selectividad y dando lugar a procesos más eficientes, así como también identificar con precisión los componentes limitantes del sistema, particularmente la interacción soluto-disolvente, que pueden afectar directamente la compatibilidad con las membranas. Asimismo, se recomienda el procesamiento por nanofiltración de otras partes de la planta de cáñamo, como las hojas, tallos o flores, las cuales también son ricas en compuestos bioactivos

Finalmente, se propone para desarrollos futuros, evaluar otras propiedades biológicas relevantes (antiinflamatorias, anticancerígenas, anticonvulsivas, analgésicas, antieméticas, entre otras). de las fracciones obtenidas por nanofiltración. La caracterización de estas fracciones permitirá tener una perspectiva mayor respecto a la aplicación de estas en la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética como ingredientes funcionales o compuestos bioactivos de alto valor agregado.

8. REFERENCIAS

- [1] J.C. Callaway, Hempseed as a nutritional resource: An overview, *Euphytica*. 140 (2004) 65–72. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4811-6>.
- [2] T. Chen, J. He, J. Zhang, H. Zhang, P. Qian, J. Hao, L. Li, Analytical characterization of hempseed (Seed of *Cannabis sativa* L.) oil from eight regions in China, *J. Diet. Suppl.* 7 (2010) 117–129. <https://doi.org/10.3109/19390211003781669>.
- [3] E. Formukong, A. Evans, F. Evans, Analgesic and antiinflammatory activity of constituents of *Cannabis sativa* L., *Inflammation*. 12 (1988) 361–371. <https://doi.org/10.1007/BF00915771>.
- [4] A. Shrivastava, P.M. Kuzontkoski, J.E. Groopman, A. Prasad, Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy, *Mol. Cancer Ther.* 10 (2011) 1161–1172. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-1100>.
- [5] O. Devinsky, M.R. Cilio, H. Cross, J. Fernandez-Ruiz, J. French, C. Hill, R. Katz, V. Di Marzo, D. Jutras-Aswad, W.G. Notcutt, J. Martinez-Orgado, P.J. Robson, B.G. Rohrback, E. Thiele, B. Whalley, D. Friedman, Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders, *Epilepsia*. 55 (2014) 791–802. <https://doi.org/10.1111/epi.12631>.
- [6] M. Eroglu S., Toprak S., Urgan O, MD, Ozge E. Onur, MD, Arzu Denizbasi, MD, Haldun Akoglu, MD, Cigdem Ozpolat, MD, Ebru Akoglu, Hemp - Industrial Production and Uses Edited, 2012.
- [7] B. Tanwar, A. Goyal, Oilseeds : Health Attributes and Food Applications, 2021.
- [8] S. Munné-Bosch, L. Alegre, The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants, *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 21 (2002) 31–57. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044179>.
- [9] C. Benkirane, A. Ben Moumen, M.-L. Fauconnier, K. Belhaj, M. Abid, H.S. Caid, A. Elamrani, F. Mansouri, Bioactive compounds from hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds: optimization of phenolic antioxidant extraction using simplex lattice mixture design and HPLC-DAD/ESI-MS 2 analysis , *RSC Adv.* 12 (2022) 25764–25777. <https://doi.org/10.1039/d2ra04081f>.

- [10] J. Kanabus, M. Bryła, M. Roszko, M. Modrzewska, A. Pierzgalski, Cannabinoids—characteristics and potential for use in food production, *Molecules*. 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26216723>.
- [11] A. Hazekamp, J.T. Fishedick, Cannabis - from cultivar to chemovar., *Drug Test. Anal.* 4 (2012) 660–667. <https://doi.org/10.1002/dta.407>.
- [12] I.J. Flores-Sanchez, R. Verpoorte, Secondary metabolism in cannabis, *Phytochem. Rev.* 7 (2008) 615–639. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9094-4>.
- [13] F. Pellati, V. Borgonetti, V. Brighenti, M. Biagi, S. Benvenuti, L. Corsi, Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer, *Biomed Res. Int.* 2018 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>.
- [14] A. Rahemi, R. Dhakal, V.W. Temu, L. Rutto, M.K. Kering, Performance of different-use type industrial hemp cultivars under mid-atlantic region conditions, *Agronomy*. 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/agronomy11112321>.
- [15] M.S. Isahq, M.S. Afridi, J. Ali, M.M. Hussain, S. Ahmad, F. Kanwal, Proximate composition, phytochemical screening, GC-MS studies of biologically active cannabinoids and antimicrobial activities of Cannabis indica, *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 5 (2015) 897–902. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60953-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60953-7).
- [16] J. Xu, M. Bai, H. Song, L. Yang, D. Zhu, H. Liu, Hemp (Cannabis sativa subsp. sativa) Chemical Composition and the Application of Hempseeds in Food Formulations, *Plant Foods Hum. Nutr.* (2022) 504–513. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-01013-x>.
- [17] C. Leizer, D.M. Ribnicky, A. Poulev, D. Dushenkov, I. Raskin, The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition, *J. Nutraceuticals, Funct. Med. Foods*. 2 (2015) 35–53. https://doi.org/10.1300/J133v02n04_04.
- [18] C. Citti, B. Pacchetti, M.A. Vandelli, F. Forni, G. Cannazza, Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149 (2018) 532–540. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.044>.
- [19] J. Deferne, D.W. Pate, Hemp seed oil: A source of valuable essential fatty acids, *J. Int. Hemp Assoc.* 3 (1996) 1, 4–7.

- [20] R.A. Burton, M. Andres, M. Cole, J.M. Cowley, M.A. Augustin, Industrial hemp seed: from the field to value-added food ingredients, *J. Cannabis Res.* 4 (2022). <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00156-7>.
- [21] C. Da Porto, D. Decorti, F. Tubaro, Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide, *Ind. Crop. Prod.* 36 (2012) 401–404. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.09.015>.
- [22] A. Smeriglio, E.M. Galati, M.T. Monforte, F. Lanuzza, V. D'Angelo, C. Circosta, Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of Cold-Pressed Seed Oil from Finola Cultivar of *Cannabis sativa* L, *Phyther. Res.* (2016) 1298–1307. <https://doi.org/10.1002/ptr.5623>.
- [23] B. Farinon, R. Molinari, L. Costantini, N. Merendino, The Seed of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.): Human Health and Nutrition, *Nutrients*. (2020).
- [24] Y. Taaifi, A. Benmoumen, K. Belhaj, S. Aazza, M. Abid, E. Azeroual, A. Elamrani, F. Mansouri, H. Serghini Caid, Seed composition of non-industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties from four regions in northern Morocco, 2021. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15136>.
- [25] S.A. Salami, F. Martinelli, A. Giovino, A. Bachari, N. Arad, N. Mantri, It Is Our Turn to Get Cannabis High: Put Cannabinoids in Food and Health Baskets, *Molecules*. 25 (2020) 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules25184036>.
- [26] M. Solinas, P. Massi, V. Cinquina, M. Valenti, D. Bolognini, M. Gariboldi, E. Monti, T. Rubino, D. Parolaro, Cannabidiol, a Non-Psychoactive Cannabinoid Compound, Inhibits Proliferation and Invasion in U87-MG and T98G Glioma Cells through a Multitarget Effect, *PLoS One*. 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076918>.
- [27] E.B. Russo, Cannabis therapeutics and the future of neurology, *Front. Integr. Neurosci.* 12 (2018) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnint.2018.00051>.
- [28] S. Frassinetti, E. Moccia, L. Caltavuturo, M. Gabriele, V. Longo, L. Bellani, G. Giorgi, L. Giorgetti, Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts, *Food Chem.* 262 (2018) 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.078>.
- [29] S. Pisanti, A.M. Malfitano, E. Ciaglia, A. Lamberti, R. Ranieri, G. Cuomo, M. Abate, G. Faggiana, M.C. Proto, D. Fiore, C. Laezza, M. Bifulco, Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications, *Pharmacol. Ther.* 175 (2017) 133–150.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.041>.

- [30] M. Tura, D. Ansorena, I. Astiasar, M. Mandrioli, T.G. Toschi, Evaluation of Hemp Seed Oils Stability under Accelerated Storage Test, Antioxidants. 11 (2022) 490. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antiox 11030490>.
- [31] J. Duke, Agricultural Research Service, Phytochem. Database. (1999). . www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/.
- [32] A. Lees, H. Mok, R. Lees, M. McCluskey, S. Grundy, Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance, Atherosclerosis. 28 (1977) 325–338.
- [33] F. Mattson, S. Grundy, J. Crouse, Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man, Am. J. Clin. Nutr. 35 (1982) 697–700.
- [34] W. Stone, A. Papas, Tocopherols and the etiology of colon cancer, J. Natl. Cancer Inst. 89 (1997) 1006–1014.
- [35] F. Shahidi, Y. Zhong, Measurement of antioxidant activity, J. Funct. Foods. 18 (2015) 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.
- [36] M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, Methods for testing antioxidant activity, Analyst. 127 (2002) 183–198. <https://doi.org/10.1039/b009171p>.
- [37] E.S.S. Abdel-Hameed, S.A. Bazaid, O. Alzahrani, Y. El-Halmouch, M.M. El-Sayed, A.E. El-Wakil, Chemical composition of volatile components, antimicrobial and anticancer activity of n-hexane extract and essential oil from *Trachyspermum ammi* L. seeds, Orient. J. Chem. 30 (2014) 1653–1662. <https://doi.org/10.13005/ojc/300425>.
- [38] G. Appendino, S. Gibbons, A. Giana, A. Pagani, G. Grassi, M. Stavri, E. Smith, M.M. Rahman, Antibacterial Cannabinoids from *Cannabis sativa* : A Structure - Activity Study, (2008) 1427–1430.
- [39] S. Jin, M.-Y. Lee, The ameliorative effect of hemp seed hexane extracts on the *Propionibacterium acnes*-induced inflammation and lipogenesis in sebocytes, PLoS One. 13 (2018). <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202933>.
- [40] V. Mikulcová, V. Kašpárková, P. Humpolíček, L. Buňková, Formulation, characterization and properties of hemp seed oil and its emulsions, Molecules. 22 (2017) 1–13.

<https://doi.org/10.3390/molecules22050700>.

- [41] M.A. Wagner-Graham, H. Barndt, M.A. Sunderland, Measurement of antibacterial properties of foil-backed electrospun nanofibers, *Fash. Text.* 6 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40691-019-0186-0>.
- [42] V. Lavenburg, K. Rosentrater, S. Jung, Extraction Methods of Oils and Phytochemicals from Seeds and Their Environmental and Economic Impacts, *Processes*. 9 (2021) 1–14.
- [43] W. Golimowski, M. Teleszko, D. Marcinkowski, D. Kmiecik, A. Grygier, A. Kwaśnica, Quality of Oil Pressed from Hemp Seed Varieties: ‘Ealina 8FC’, ‘Secueni Jubileu’ and ‘Finola,’ *Molecules*. 27 (2022) 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules27103171>.
- [44] J.I. Alonso-Esteban, M.J. González-Fernández, D. Fabrikov, E. Torija-Isasa, M. de C. Sánchez-Mata, J.L. Guil-Guerrero, Hemp (*Cannabis sativa* L.) Varieties: Fatty Acid Profiles and Upgrading of γ -Linolenic Acid-Containing Hemp Seed Oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 122 (2020) 1–21. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900445>.
- [45] E. Nortjie, M. Basitere, D. Moyo, P. Nyamukamba, Extraction Methods , Quantitative and Qualitative Phytochemical Screening of Medicinal Plants for Antimicrobial Textiles : A Review, (2022).
- [46] Z. Lei, C. Li, B. Chen, Extractive distillation: A review, *Sep. Purif. Rev.* 32 (2003) 121–213. <https://doi.org/10.1081/SPM-120026627>.
- [47] K. Scott, Introduction To Membrane Separations, *Handb. Ind. Membr.* (1995) 3–185. <https://doi.org/10.1016/b978-185617233-2/50004-0>.
- [48] T. Matsuura, Membrane Preparation, *Synth. Membr. Membr. Sep. Process.* (2020) 47–98. <https://doi.org/10.1201/9781003068037-3>.
- [49] Z.F. Cui, H.S. Muralidhara, *Membrane Technology*, 2010. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-19129-8>.
- [50] P. Marchetti, M.F. Jimenez Solomon, G. Szekely, A.G. Livingston, Molecular separation with organic solvent nanofiltration: A critical review, *Chem. Rev.* 114 (2014) 10735–10806. <https://doi.org/10.1021/cr500006j>.
- [51] I. Sereewatthanawut, I.I.R. Baptista, A.T. Boam, A. Hodgson, A.G. Livingston, Nanofiltration process for the nutritional enrichment and refining of rice bran oil, *J. Food*

- Eng. 102 (2011) 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.07.020>.
- [52] X. Li, J. Li, M. Processes, T. Polytechnic, Encyclopedia of Membranes, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-44324-8>.
- [53] A. Stefanescu, T.M.S. Chang, Use of the lab-scale tangential flow diafiltrator to remove tetrameric hemoglobin from polyhemoglobin, purify hemolysate, and concentrate polyhemoglobin, *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* 37 (2009) 61–68. <https://doi.org/10.1080/10731190902742455>.
- [54] S. Gharby, Refining Vegetable Oils: Chemical and Physical Refining, *Sci. World J.* 2022 (2022). <https://doi.org/10.1155/2022/6627013>.
- [55] M. Priske, M. Lazar, C. Schnitzer, G. Baumgarten, Recent Applications of Organic Solvent Nanofiltration, *Chemie-Ingenieur-Technik.* 88 (2016) 39–49. <https://doi.org/10.1002/cite.201500084>.
- [56] S. Darvishmanesh, T. Robberecht, P. Luis, J. Degève, B. Van Der Bruggen, Performance of nanofiltration membranes for solvent purification in the oil industry, *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 88 (2011) 1255–1261. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1779-y>.
- [57] K. Werth, P. Kaupenjohann, M. Skiborowski, The potential of organic solvent nanofiltration processes for oleochemical industry, *Sep. Purif. Technol.* 182 (2017) 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.03.050>.
- [58] G. Peev, P. Penchev, D. Peshev, G. Angelov, Chemical Engineering Research and Design Solvent extraction of rosmarinic acid from lemon balm and concentration of extracts by nanofiltration: Effect of plant pre-treatment by supercritical carbon dioxide, *Chem. Eng. Res. Des.* 89 (2011) 2236–2243. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.04.014>.
- [59] D. Peshev, L.G. Peeva, G. Peev, I.I.R. Baptista, A.T. Boam, Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), *Chem. Eng. Res. Des.* 89 (2011) 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2010.07.002>.
- [60] F. Marina, F. Fay, F. Marina, F. Fay, Análisis proximal en alimentos Fundamentos teóricos y técnicas experimentales, n.d.
- [61] J.Y. Lin, Q.X. Zeng, Q. An, Q.Z. Zeng, L.X. Jian, Z.W. Zhu, Ultrasonic extraction of hempseed oil, *J. Food Process Eng.* 35 (2012) 76–90. <https://doi.org/10.1111/j.1745->

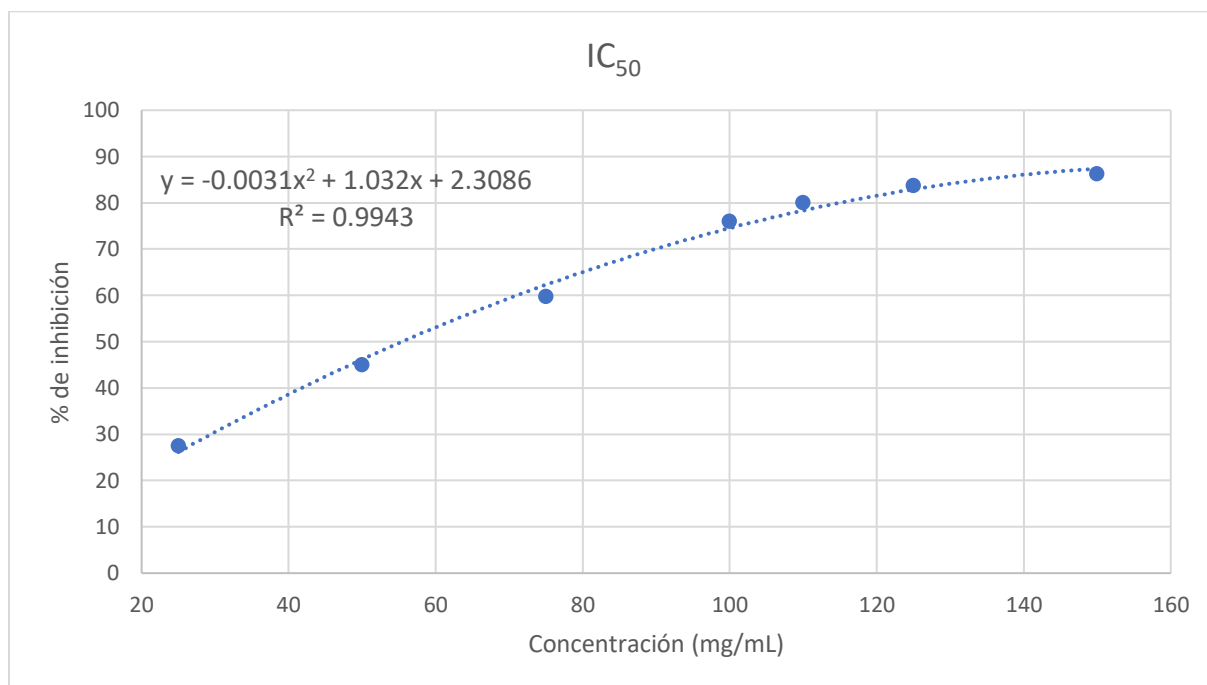
4530.2010.00601.x.

- [62] V. Bhardwaj, Antimicrobial Potential of *Cocos nucifera* (Coconut) Oil on Bacterial Isolates, (2023). https://doi.org/10.1007/5584_2023_786.
- [63] A.H. Banskota, A. Jones, J.P.M. Hui, R. Stefanova, Triacylglycerols and Other Lipids Profiling of Hemp By-Products, *Molecules*. 27 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27072339>.
- [64] B.D. Oomah, M. Busson, D. V. Godfrey, J.C.G. Drover, Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil, *Food Chem.* 76 (2002) 33–43. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00245-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00245-X).
- [65] S. Uluata, N. Özdemir, Antioxidant activities and oxidative stabilities of some unconventional oilseeds, *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 89 (2012) 551–559. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1955-0>.
- [66] L. Senila, E. Neag, O. Cadar, M.H. Kovacs, A. Becze, M. Senila, Chemical, nutritional and antioxidant characteristics of different food seeds, *Appl. Sci.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/app10051589>.
- [67] K. Ostapczuk, S.O. Apori, G. Estrada, F. Tian, Hemp growth factors and extraction methods effect on antimicrobial activity of hemp seed oil: A systematic review, *Separations*. 8 (2021) 1–18. <https://doi.org/10.3390/separations8100183>.
- [68] M. Gaiqin, W. Yuanyuan, L. Yuefan, L. Zhang, G. Yuan, L. Qi, Y. Xiuzhu, Antioxidant properties of lipid concomitants in edible oils: A review, *Food Chem.* 422 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136219>.
- [69] A. Kara, E. Caglak, B. Karsli, Optimization and Bioactive Properties of Nanoemulsion Formulated with Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Oil and Aloe vera (*Barbadensis miller* Stockton) Gel, *ChemistrySelect*. 9 (2024). <https://doi.org/10.1002/slct.202305110>.
- [70] E.M.M. Ali, A.Z.I. Almagboul, S.M.E. Khogali, U.M.A. Gergeir, Antimicrobial Activity of *Cannabis sativa* L., *Chin. Med.* 03 (2012) 61–64. <https://doi.org/10.4236/cm.2012.31010>.
- [71] A.P. Desbois, V.J. Smith, Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (2010) 1629–1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>.

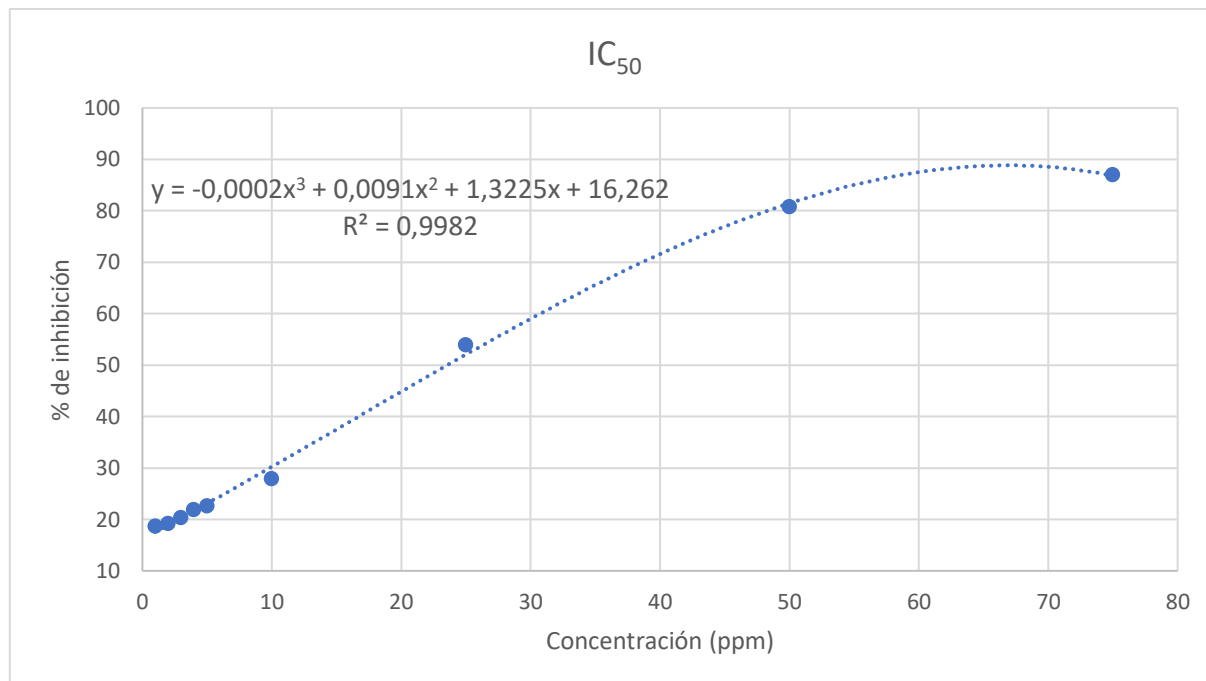
9. APÉNDICE

A. Actividad antioxidante

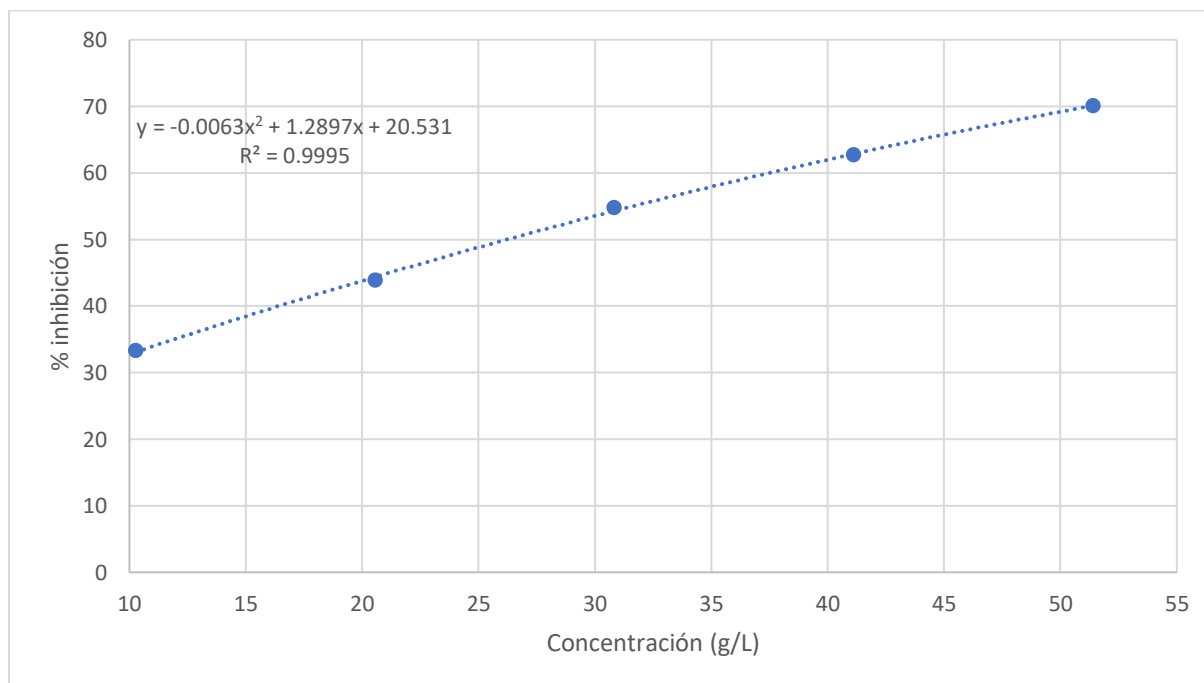
A.1. Curva para el cálculo de IC_{50} por el ensayo de DPPH del aceite de semilla de cáñamo.



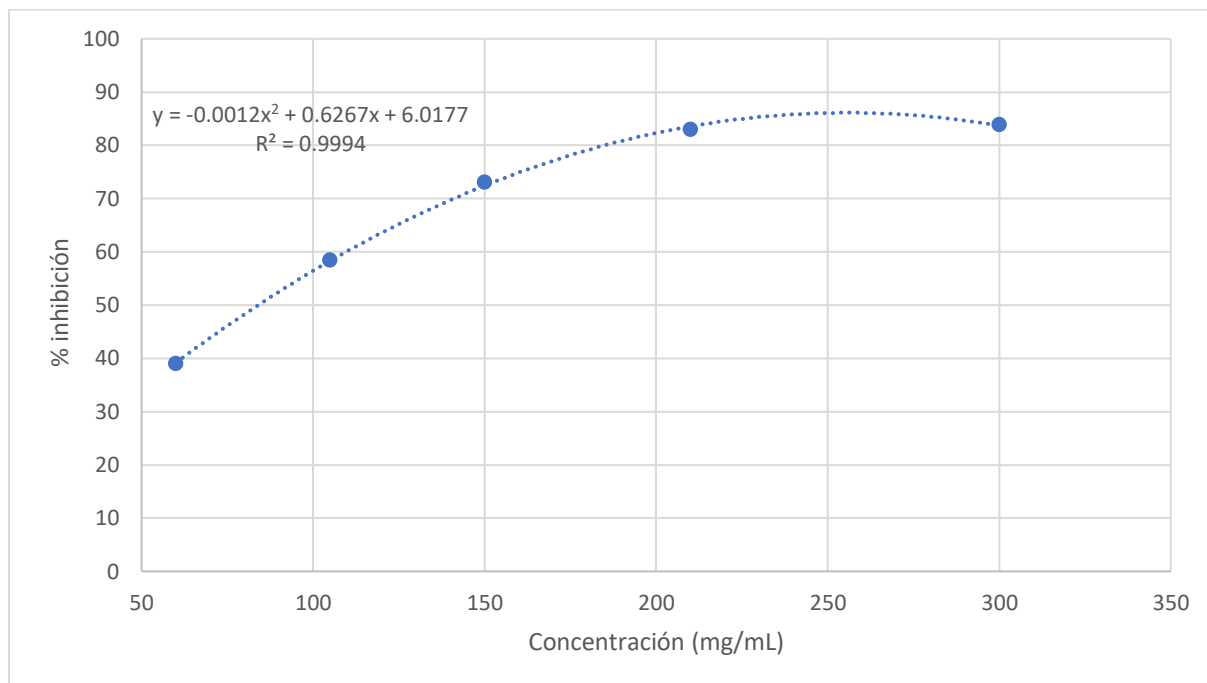
A.2. Curva para el cálculo de IC₅₀ por el ensayo de DPPH del Trolox.



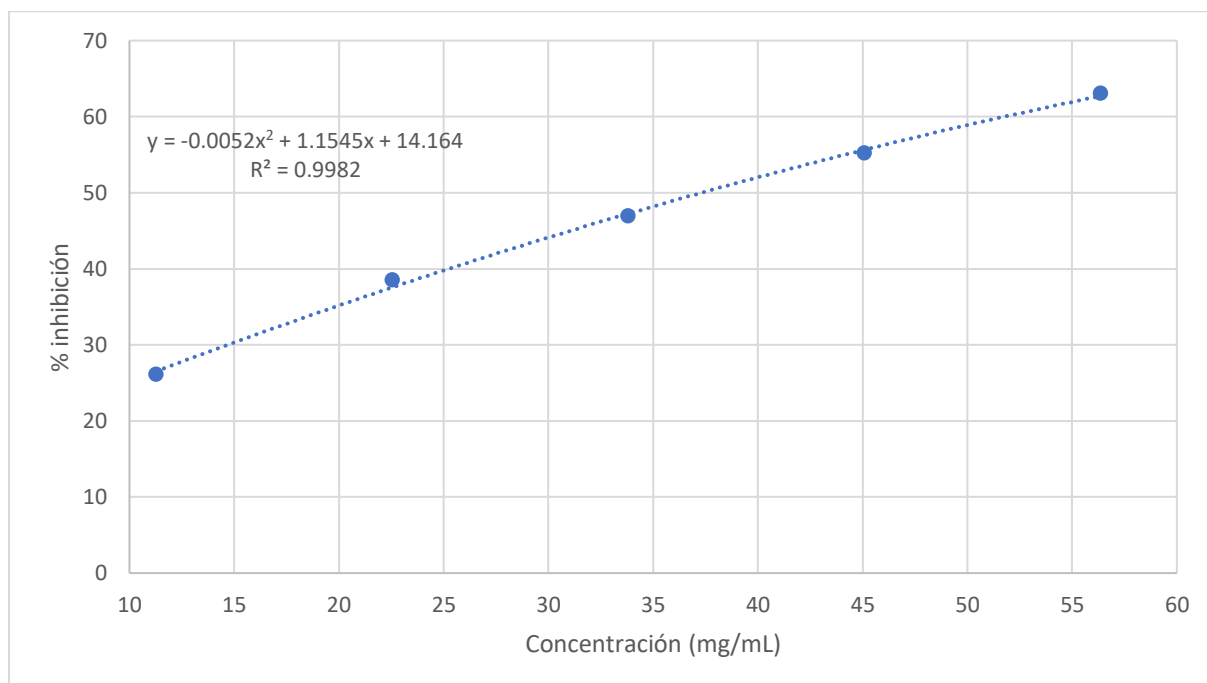
A.3. Curva para el cálculo de IC₅₀ por el ensayo de DPPH del permeado de la primera etapa de nanofiltración (600 Da)



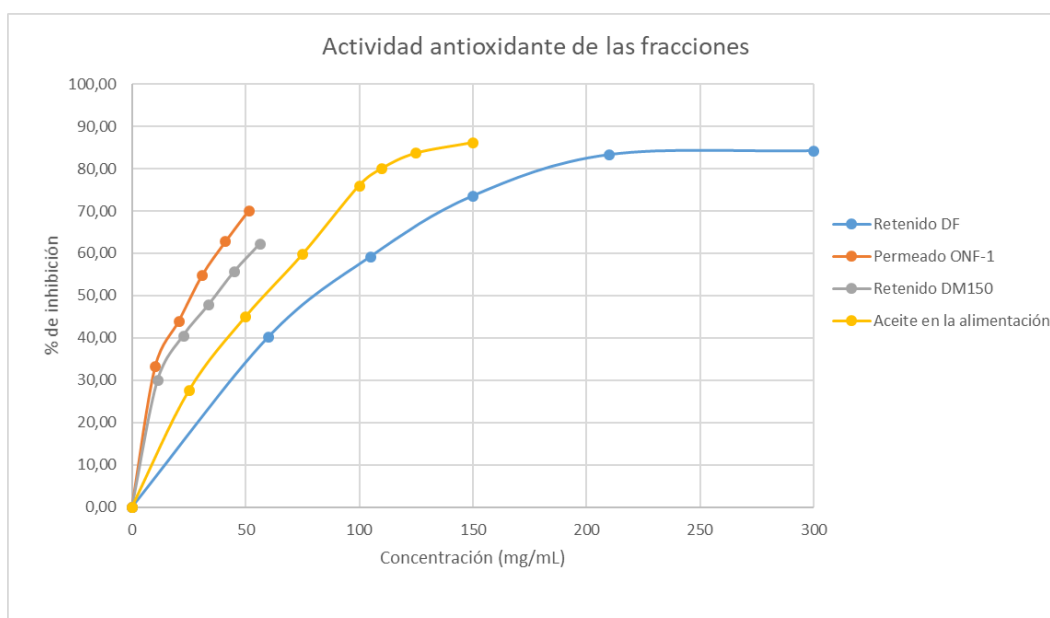
A.4. Curva para el cálculo de IC₅₀ por el ensayo de DPPH del retenido de la primera etapa de nanofiltración (NF-E1)



A.5. Curva para el cálculo de IC₅₀ por el ensayo de DPPH del retenido de la segunda etapa de nanofiltración (NF-E2)



A.6. Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas por nanofiltración con disolventes orgánicos.



NO REPRODUCIR

Todos los derechos reservados

Ninguna parte de este Trabajo Profesional puede reproducirse o transmitirse bajo forma o por ningún medio, electrónico ni mecánico, incluyendo fotocopiado o grabación, ni por ningún sistema de almacenamiento y recuperación de información, sin permiso por escrito del autor.

IMPRESO EN MEXICO/PRINTED IN MEXICO

POR: **IMPRIMAX**
Expertos en Tesis

(IMPRESIONES Y EMPASTADOS
DE TESIS)

DIRECCIONES:

■ **MATRIZ**

Priv. de Margaritas N° 101
Col. Ex. marquezado. Oaxaca, Oax.

■ **SUCURSAL MADERO**

Calz. Madero 943 "A"
Col. Ex. marquezado. Oaxaca, Oax.

■ **SUCURSAL C.U**

Av. universidad N° 307
a 3 locales de Dominos Pizza. Oaxaca, Oax.

Tel. (951) 51 6 70 64

Tel. (951) 51 2 72 80

Tel. (951) 207 10 64

Cel (044) 951 199 03 69 y (044) 951 134 20 47



tesis_imprimax@hotmail.com



<http://tesisimprimax.wixsite.com/home>