

ALUMNO: NÓBILE LUCAS JOSÉ

DIRECTOR: MONZÓN CELINA MARÍA

ASIGNATURA: PRÁCTICA ELECTIVA

TEMA:



ÍNDICE

1. Introducción	3
1.1 CANNABIS	3
1.1.1 Planta, origen, composición y estructuras	3
1.1.2 Beneficios: Usos medicinales y terapias asociadas	5
1.1.3 Limitaciones de los cannabinoides	7
1.1.4 Reglamentación vigente	7
1.2 HPLC.....	8
1.2.1 Fundamento	8
1.2.2 Usos	8
1.2.3 Aplicación en cannabinoides	9
2. Objetivos generales y particulares.....	10
3. Determinación y cuantificación de Cannabidiol: Pretratamiento de muestras.....	10
4. Determinación y cuantificación de Cannabidiol: Procedimiento	11
4.1 Determinación cualitativa de CBD	11
4.2 Determinación cuantitativa de CBD	13
5. Determinación y cuantificación de Cannabidiol: Resultados y discusión	15
5.1 Determinación cualitativa de CBD.....	15
5.2 Determinación cuantitativa de CBD	17
6. Conclusiones	18
7. Agradecimientos.....	18
8. Bibliografía	19
9. Anexos	20
9.1 Anexo 1	20
9.2 Anexo 2	24

1. Introducción

1.1 CANNABIS

1.1.1 Planta, origen, composición y estructuras

La marihuana, también llamada cáñamo o *Cannabis sativa* es una planta herbácea de la familia *Cannabaceae* originaria de Asia, aunque en la actualidad la producción de la hierba de cannabis está muy extendida, prácticamente en todos los países del mundo.

El ciclo natural de *Cannabis sativa* comienza en la primavera con la germinación de las semillas. La etapa de crecimiento vegetativo se lleva a cabo a mediados del verano, hasta que las plantas comienzan a florecer. El desarrollo floral se mantiene durante dos o tres meses y, para la mayoría de las variedades, la cosecha óptima se da a principios del otoño.

En cuanto a su estructura, se caracteriza por ser una planta de tallo erguido, recto y rígido, con sección transversal cilíndrica, raíz pivotante, de aspecto áspero, color verde oscuro y con ramas cortas y frágiles. Las hojas de esta planta se diferencian según su ubicación; las hojas inferiores son opuestas, palmeadas, presentando de cinco a siete hojillas lanceoladas, de bordes aserrados y enteros en los extremos; poseen un pecíolo muy largo con una vaina en la base. Las hojas superiores, ubicadas en las proximidades de las inflorescencias son alternadas o aisladas y de morfología diferente, no presentan pecíolo y pueden ser simples y poseer dos o tres segmentos.

Poseen una cara delantera o haz de color verde claro y una cara trasera o envés de color más oscuro que el haz. (figura 1-a).

Las plantas de marihuana macho muestran su sexo con unas pequeñas “bolas” (flores machos), que producirán el polen una vez se abran. En cambio, las plantas de marihuana hembra suelen mostrar en sus tallos y brotes unos estigmas o pistilos de un color blanco intenso, similares a pequeños pelos gruesos. (figura 1-b).

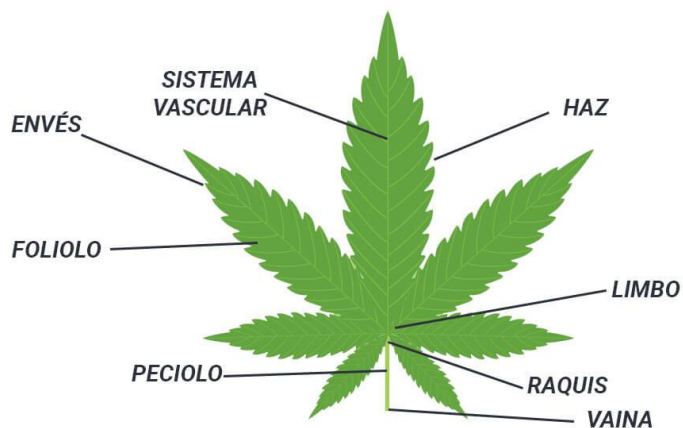


Fig. 1-a. Partes de la planta de marihuana

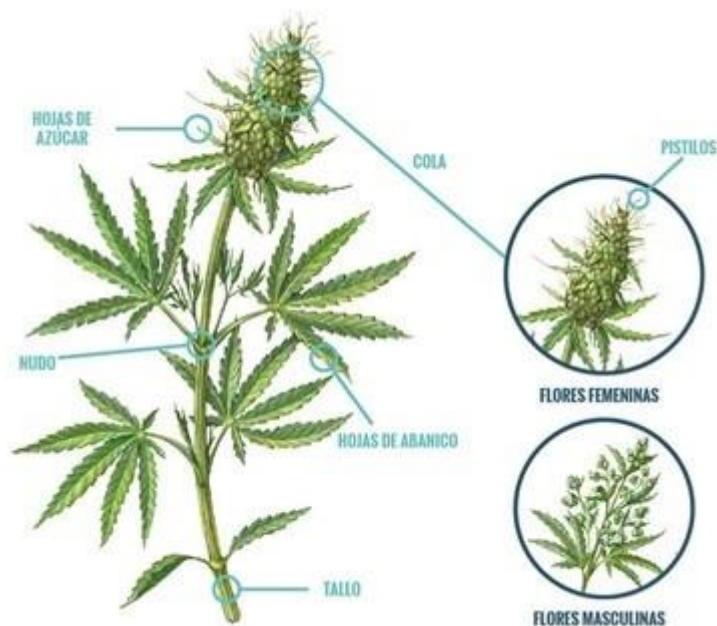
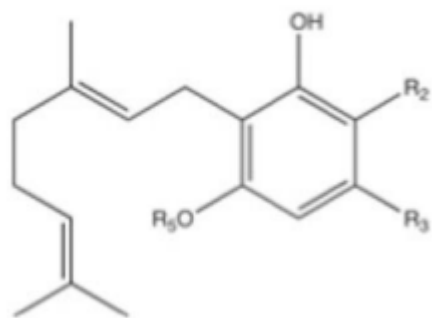


Fig. 1-b. Plantas macho y hembra

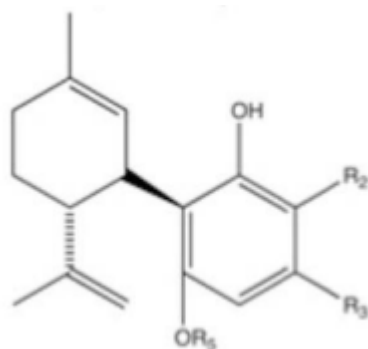
Refiriéndonos a la composición química de *Cannabis sativa* nos encontramos con una amplia variedad de compuestos, aproximadamente 500. Los que se hallan en mayor abundancia son los cannabinoides (fitocannabinoides). Estos, se encuentran presentes en las flores y hojas de la planta de Cannabis.

Fitocannabinoides

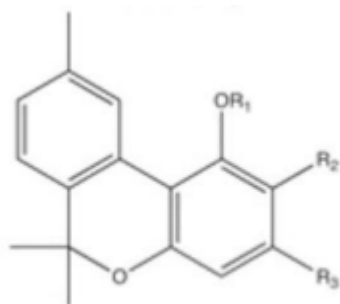
Los fitocannabinoides (*Fito*: plantas. Cannabinoides de planta) hacen referencia a una clase de compuestos terpenofenólicos caracterizados por 21 átomos de carbono que aparecen únicamente en la naturaleza en la especie *Cannabis sativa* L. Se han descubierto ya en torno a 70 fitocannabinoides. Entre los más destacados se encuentran: (figura 2).



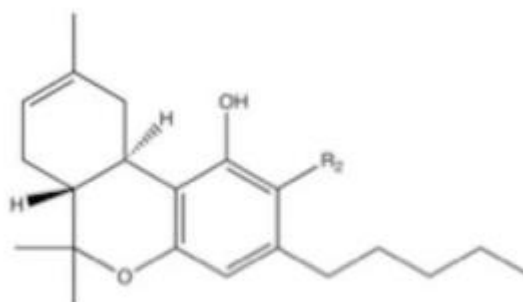
Tipo Cannabigerol (CBG)



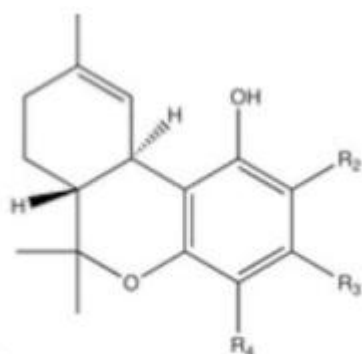
Tipo Cannabidiol (CBD)



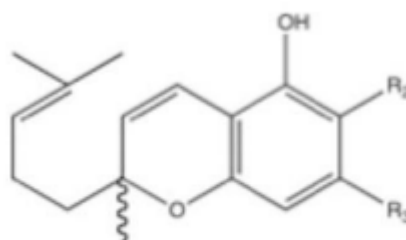
Tipo Cannabinol (CBN)



Tipo Δ⁸-Tetrahydrocannabinol (Δ⁸-THC)



Tipo Δ⁹-Tetrahydrocannabinol (Δ⁹-THC)



Tipo Cannabichromeno (CBC)

Fig. 2. Estructuras químicas de los principales cannabinoides

Otros componentes químicos de la planta que se encuentran en menor proporción son: terpenos, flavonoides, alcaloides, estilbenos, amidas fenólicas y lignanamidas. Algunos de estos compuestos son biológicamente activos y parecen tener ciertos efectos comunes con los cannabinoides, mientras que otros parecen participar activamente en los mecanismos de defensa de la planta (Fuentes, Álvarez, Rodríguez, Ramos, Propéro, Mesa & Zabicky, 2015).

1.1.2 Beneficios: Usos medicinales y terapias asociadas

El cannabis como uso medicinal surge gracias a la existencia del sistema endocannabinoide (SEC) en el cerebro. El sistema endocannabinoide es un sistema que se encuentra en todos los mamíferos cuyo fin es regular las funciones del cuerpo a nivel celular. El término “endo” (dentro) hace referencia a que fisiológicamente nuestro cuerpo produce cannabinoides de manera natural, estos son derivados de ácidos grasos, especialmente ácido araquidónico. Ellos, se acoplan a receptores cannabinoides (CB) activándolos. Juntos, receptores CB y endocannabinoides, constituyen el sistema endocannabinoide cuyo objetivo es mantener la homeostasis del cuerpo.

Se han identificado dos tipos de receptores cannabinoides, los CB1 y los CB2, ambos acoplados a proteína G. Los receptores CB1 se encuentran principalmente en las neuronas del cerebro, la médula espinal y el sistema nervioso periférico, aunque también están presentes en ciertos órganos y tejidos periféricos, como glándulas endocrinas, glándulas salivales, leucocitos, bazo, corazón y en determinadas zonas de los aparatos reproductor, urinario y gastrointestinal. Los receptores CB2 se encuentran principalmente en las células inmunitarias, entre ellas los leucocitos, el bazo y las amígdalas.

Cuando los receptores CB1 y CB2 están deficientes de los endocannabinoides se pueden llegar a desencadenar una serie de enfermedades tales como: artritis reumatoidea, fibromialgia, inflamación gastrointestinal, Alzheimer, Parkinson, cáncer, entre otras. Debido a esto se descubrió que existe la “deficiencia clínica del sistema endocannabinoide” (CECD), lo cual no solo lleva a desencadenar enfermedades, sino que el tratamiento de las mismas no siempre resulta exitoso con fármacos y conlleva a la utilización de otras terapias. De allí que surge la necesidad de buscar cannabinoides de otras fuentes, donde los fitocannabinoides tomaron mucha fuerza y su estudio comenzó a emerger en mayor profundidad principalmente el del Cannabidiol (CBD). El CBD se enlaza a otros fito y endocannabinoides actuando como agente amplificador, aumentando sus capacidades para nutrir al sistema endocannabinoide, por lo que consumir CBD permitiría mantener a este sistema funcionando de manera óptima, sobre todo en los pacientes con déficit en endocannabinoides.

Hasta hoy los mecanismos de acción del CBD (farmacodinamia) no se encuentran completamente claros, sin embargo, se estima que la ausencia de su efecto psicoactivo se explicaría porque éste muestra, con respecto al Δ^9 -THC, una menor afinidad a los receptores cannabinoides CB1 y CB2.

En cuanto a sus propiedades, las más vistas son: propiedades analgésicas, relajantes musculares, antidepresivas, hipnóticas, inmunosupresoras, antiinflamatorias, ansiolíticas, broncodilatadoras, entre otras. (Ángeles Lopéz, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

Entre las principales terapias asociadas se encuentran: (Ligresti y cols., 2016, Hess y cols., 2016).

- **Cáncer**
- **VIH**
- **Migrañas**
- **Deficiencia de apetito**
- **Diabetes**
- **Alzheimer**
- **Esclerosis múltiple**
- **Parkinson**
- **Insomnio**
- **Glaucoma y úlceras en la córnea**
- **Afecciones dermatológicas**

Cosméticos: Cremas de uso tópico.

Algunas investigaciones sugieren que el uso tópico del Cannabidiol podría ser efectivo en afecciones de la piel como eczema, psoriasis, prurito e inflamación. En cuanto a las formas tópicas en las cuales es posible hallar al CBD, las cremas y las lociones representan cerca del 50% de todos los formatos, sin embargo, también se encuentran otros como bálsamos, barras, aceites y geles.

1. **ANTIOXIDANTE:** Se trata de uno de los captadores de radicales libres más poderosos.
2. **CALMANTE:** Tiene un gran poder antiinflamatorio, ayuda a reducir y atenuar las irritaciones e inflamaciones de la piel.
3. **HIDRATANTE:** Contiene casi un 85% de ácidos grasos esenciales. Particularmente, ácido alfa-linolénico (Omega 3) y ácido linoleico (Omega 6), además de ácido gamma-linolénico y ácido estearidónico. Se trata de un activo súper nutritivo que además regula la producción de grasa y ayuda a mantener el equilibrio en la epidermis.
4. **CICATRIZACIÓN:** Mayor rapidez en la cicatrización de heridas, reduce ampollas y mejora el dolor.
5. **ACNÉ Y SEBORREA:** El CBD no solo reduce la producción de lípidos, sino que es capaz de normalizar la lipogénesis en un estado de desequilibrio.

[illegible]

A continuación, se resumen las diferentes vías de administración de cannabinoides y sus posibles aplicaciones (figura 4). Se resalta la vía tópica ya que es la utilizada en este trabajo para la determinación de cannabinoides.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN	TIPO DE PREPARADO	VENTAJAS	INCONVENIENTES	POSIBLES APLICACIONES
INHALACIÓN (vaporizadores)	Flores, extractos, aceites	Efecto rápido, elevada biodisponibilidad, sobredosificación fácil de evitar	Efecto poco duradero, dosificación poco consistente	Crisis agudas
ORAL/OROMUCOSAL/ SUBLINGUAL	Extractos, aceites	Efecto prolongado	Efecto lento	Tratamientos crónicos
TOPICA	Cremas, ungüentos, lociones, parches dérmicos	Efecto prolongado, efecto localizado, no psicoactividad	Efecto lento, poca penetrabilidad	Tratamientos locales superficiales, afecciones de la piel
RECTAL	Supositorios	Vía alternativa cuando no se pueden utilizar otras, efecto localizado	Muy baja biodisponibilidad	Tratamientos locales

6

1.1.3 Limitaciones de los cannabinoides

Los ensayos clínicos sugieren que el CBD es bien tolerado, sin embargo, el uso de CBD no está exento de riesgos pues tiene interacciones farmacológicas con otras drogas, lo que se debería evaluar por el profesional médico antes de recomendar su uso, así como potenciales efectos adversos, entre los cuales no son infrecuentes la somnolencia, la fatiga o trastornos gastrointestinales, y otros más raros pero graves, como la elevación de las pruebas de función hepática. Esto ocurre así porque el CBD se metaboliza principalmente en el hígado y el intestino por lo que un uso excesivo del mismo o en forma crónica podría generar cierta toxicidad a nivel hepático, según se comprobó en experimentos en ratas. (Laura E. Ewing, Charles M. Skinner, 2019).

1.1.4 Reglamentación vigente

En Argentina, el 29 de marzo de 2017, el Senado y la Cámara de Diputados de la Nación reglamentó la ley 27.350, con el título "*Investigación médica y científica del uso medicinal de la planta de Cannabis y sus derivados*" que autoriza el uso terapéutico y paliativo del cannabis.

Entre sus principales objetivos se encuentran:

- Garantizar el acceso gratuito al aceite de cáñamo y demás derivados del cannabis a toda persona que se incorpore al programa.
- Desarrollar evidencia científica sobre diferentes alternativas terapéuticas a problemas de salud, que no abordan los tratamientos médicos convencionales.
- Investigar los fines terapéuticos y científicos de la planta de cannabis y sus derivados en la terapéutica humana.
- Establecer la eficacia para cada indicación terapéutica, que permita el uso adecuado y la universalización del acceso al tratamiento.
- Conocer los efectos secundarios del uso medicinal de la planta de cannabis y sus derivados, y establecer la seguridad y las limitaciones para su uso, promoviendo el cuidado de la población en su conjunto.
- Proveer asesoramiento, cobertura adecuada y completo seguimiento del tratamiento a la población afectada que participe del programa.
- Contribuir a la capacitación continua de profesionales de la salud en todo lo referente al cuidado integral de las personas que presentan las patologías involucradas, a la mejora de su calidad de vida, y al uso medicinal de la planta de cannabis y sus derivados.

Cabe aclarar que esta ley no contempla el autocultivo ya que no habría manera de controlar si su uso estará destinado realmente como medicinal o con fines de narcotráfico.

La Autoridad de Aplicación, organismo del Estado encargado del cumplimiento de lo establecido en una norma, podrá autorizar el cultivo de cannabis por parte del CONICET e INTA con fines de investigación médica y/o científica. Se priorizará y fomentará la producción a través de los laboratorios públicos nucleados en la Agencia Nacional de Laboratorios Públicos (ANLAP).

La ANMAT, por su parte, permitirá la importación de aceite de cannabis y sus derivados cuando sea requerida por pacientes que presenten las enfermedades contempladas en el programa y cuenten con la indicación médica pertinente.

Por otro lado, gracias a esta ley, hoy en día las farmacias y dietéticas de todo el país pueden realizar venta libre de productos que tengan cannabis medicinal (cremas, aceites, etc.).

1.2 HPLC

1.2.1 Fundamento

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés: *High-performance liquid chromatography*) es una técnica de separación utilizada para ver si existe la presencia de un analito en la muestra y además permite su cuantificación. Es una técnica relativamente sencilla y que se puede aplicar a gran cantidad de muestras.

Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla (Fallon, Booth y Bell, 1987). Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes.

El funcionamiento de un HPLC se basa en que una bomba de tipo pistón empuja la fase móvil desde el depósito hasta el detector, pasando por todos los componentes del circuito. En un punto de este circuito (antes de llegar a la columna) se inyecta una pequeña cantidad de muestra a través de un inyector, esta muestra separa los analitos que la componen en la columna. Finalmente, el detector manda la señal a un dispositivo de recopilación de datos (una computadora).

En la figura 5 se esquematiza el funcionamiento de HPLC:

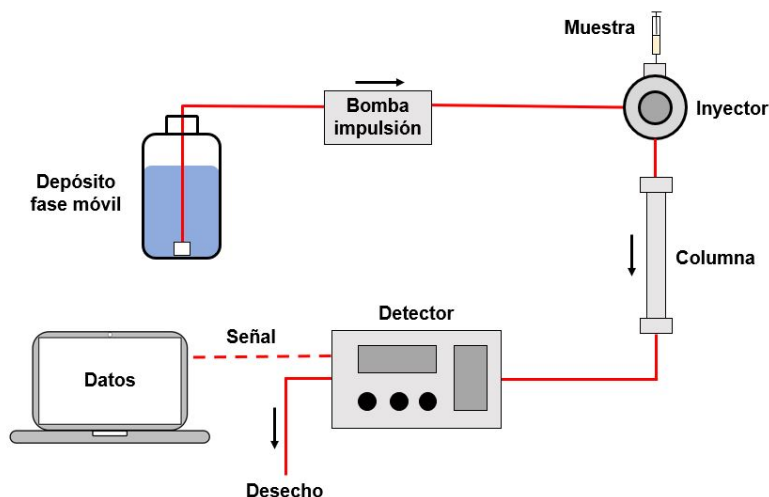


Fig. 5. Representación esquemática HPLC

1.2.2 Usos

Existen amplios campos de aplicaciones entre los que se incluyen:

- Farmacía: Antibióticos, sedantes esteroides, analgésicos.
- Bioquímica: Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos.
- Bromatología: Edulcorantes artificiales, antioxidantes, toxinas, aditivos.
- Contaminantes: Fenoles, pesticidas, herbicidas.
- Química forense: Drogas, venenos, alcohol en sangre, narcóticos.
- Medicina clínica: Ácidos biliares, metabolitos de drogas, metabolitos en orina, estrógenos.

1.2.3 Aplicación en cannabinoides

Para llevar a cabo la determinación de cannabinoides por este método, previamente hay que realizar pruebas para la elección de la fase móvil, flujo, longitud de onda, tipo de columna y temperatura de trabajo.

Estudios realizados en la Universidad de Valladolid, España, demostraron que se obtiene una buena resolución de los picos correspondiente a los cannabinoides utilizando como **fase móvil** una mezcla de metanol, acetonitrilo y agua en proporción 60:30:10.

En otro trabajo realizado en Cuca, Colombia en 2019, las muestras con cannabinoides analizadas mostraron una mayor solubilidad en Acetonitrilo (ACN) y metanol, sin embargo, en este último resultaba una mayor cantidad de sólidos, razón por la cual el solvente más adecuado para el análisis de las muestras fue el ACN. Se vio, además, que si se trata el ACN con ácido fosfórico se obtiene una mejora de las señales, mayor número de picos, buena separación y resolución de los mismos.

En cuando al **flujo**, se demostró que el de 0,5 ml/min presentó ensanchamiento de los picos y tiempos de retención demasiado largos. Con el flujo de 1 ml/min, la resolución de los picos mejoró significativamente, las señales fueron más claras, lo cual permitió identificar algunos picos con base a lo reportado por la literatura y relacionarlos según el orden de elución con: Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CBN), Delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) y Ácido delta-9-tetrahidrocannabinólico (THCA). (Figura 6).

En cuanto a la **longitud de onda**, el mismo trabajo realizado menciona que la longitud de onda a 220 nm es la energía óptima para que las moléculas cannabinoides absorban energía, esto se debe a la estructura química de estos compuestos y al tipo de insaturaciones propias de anillos aromáticos y dobles enlaces en las estructuras de compuestos cannabinoides.

Para la **fase estacionaria**, la cual deber ser hidrófoba para permitir la retención de los analitos de interés, se utiliza la columna C18 (octadecilsilano), la cual tiene una cadena de 18 átomos de carbono unida a las partículas de sílice dentro de la columna. El hecho de tener una larga cadena de carbonos, brinda una mayor interacción entre los analitos y las fases unidas. Como resultado, los solutos se separan gradualmente de la columna obteniéndose una buena resolución en los picos. Los compuestos no polares interactúan mientras viajan por la fase estacionaria. Por tanto, si la mezcla de muestra contiene dos compuestos donde uno es más hidrófobo que otro, el compuesto menos hidrofóbico eluirá más rápidamente que los compuestos más hidrofóbicos.

Por último, en lo referido a la **temperatura de trabajo** se comprobó que, si se quieren determinar los cannabinoides neutros: THC o CBD a partir de los compuestos ácidos precursores de los mismos (ácido delta-9-tetrahidrocannabinólico (THCA) y ácido cannabidiólico (CBDA), respectivamente) se debe trabajar a temperaturas elevadas ya que con el aumento de temperatura los ácidos se transforman en neutros, la temperatura de trabajo recomendada en este caso es de 60 a 90°C mientras que si queremos determinar THC o CBD como tales, basta con trabajar a temperatura ambiente (20-25°C).

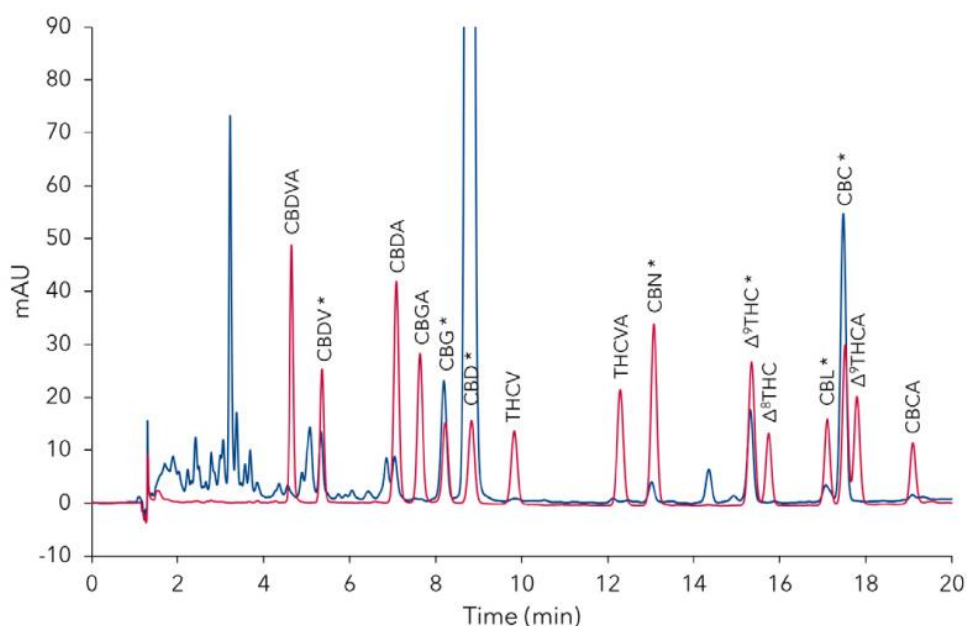


Fig. 6. Orden de elución de los distintos cannabinoides (picos rojos) en HPLC

2. Objetivos generales y particulares

Generales:

- Brindar al alumno que está finalizando el Ciclo de Formación Profesional, un espacio curricular que le permita profundizar su capacitación en distintos campos disciplinares de la Bioquímica.
- Posibilitar un mayor desarrollo de competencias en aspectos no tradicionales del perfil profesional y que presentan una importante demanda como: Análisis instrumental, Investigación Básica, Investigación Aplicada.
- Adquirir destreza en el desarrollo de técnicas instrumentales para la determinación de analitos e interpretación de resultados.

Particulares:

- Introducir sobre el uso de cannabis medicinal como terapia complementaria.
- Capacitarse en técnicas de screening (tubo y placa).
- Adquirir destreza y experiencia en el uso y manejo de material de laboratorio para la cuantificación de cannabinoides.
- Realizar la extracción de cannabinoides en productos comerciales.
- Determinar el contenido de los principales cannabinoides (cannabinol, cannabidiol y tetrahidrocannabinol) en productos de venta masiva.

3. Determinación y cuantificación de Cannabidiol: Pretratamiento de muestras

Las muestras utilizadas para la determinación de cannabinoides en cremas de uso tópico fueron 3:

- a) Crema humectante Átomo® CBD.
- b) Crema Ratisalil® CBD.
- c) Crema humectante Curflex® CBD.

Debido a que las cremas se encuentran en un estado semisólido se solubilizaron en un solvente orgánico, donde los cannabinoides son solubles en este medio.

Se utilizó como solvente orgánico alcohol etílico puro (Punto de fusión: -114°C. Punto de ebullición: 78°C). Se pesó aproximadamente 100mg de crema, se solubilizó con 1ml de etanol y luego se filtró en una jeringa con filtro para asegurar la eliminación de cualquier resto sólido que haya quedado.

De esta manera las muestras quedaron listas para ser utilizadas en las determinaciones cualitativas y cuantitativas de CBD. (Figura 7).

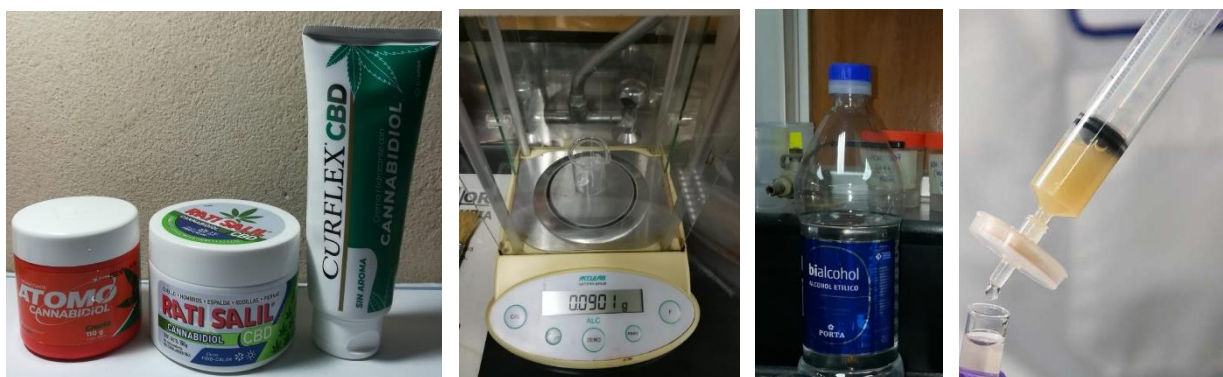


Fig. 7. Pretratamiento de muestras

4. Determinación y cuantificación de Cannabidiol: Procedimiento

4.1 Determinación cualitativa de CBD

La determinación cualitativa de CBD se realizó mediante test colorimétricos: Beam y Fast Blue, realizadas en placa de toque y Duquenois-Levine modificado, realizada en tubos de ensayo. A continuación, se describe el fundamento de las mismas y su esquematización:

Beam

Es una técnica selectiva para la determinación de CBD, el cual se oxida formando quinonas que presentan color violáceo-morado. Reactivo de Beam: KOH al 5% en etanol. Se pesaron 2,5g KOH en 50ml de etanol.

Aclaración: Si bien es selectiva para CBD se puede observar, en ocasiones, una tonalidad anaranjada para Δ^9 -THC.

Fast Blue

Es una técnica para la determinación de CBD, CBN y Δ^9 -THC, utiliza como reactivo Azul sólido B (Fast blue B): 0,25g de azul sólido B (dicloruro de 3,3'-dimetoxibifenil-4,4'-bis diazonium) en 50 mL de agua destilada. En caso de reacción positiva se obtendrán los siguientes resultados:

CBD: color amarillo/naranja.

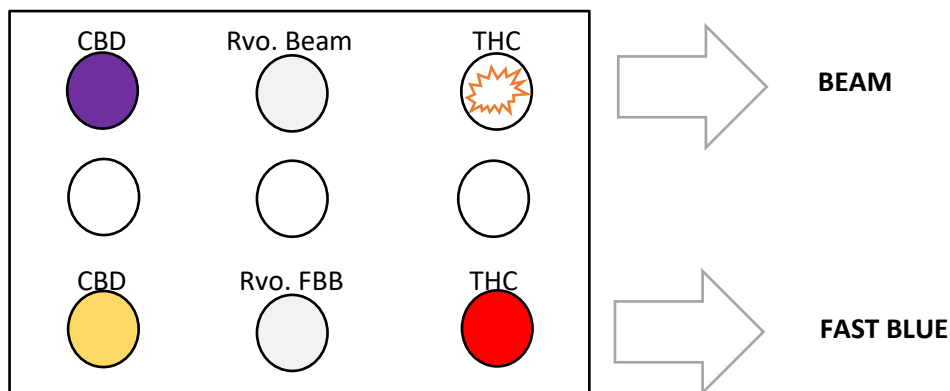
CBN: color púrpura.

Δ^9 -THC: color rojo.



Fig. 8. Reactivos utilizados para determinar CBD mediante Beam y Fast Blue

Esquema de reacción:



Duquenois-Levine

El THC en presencia del reactivo de Duquenois y por agregado posterior de ácido clorhídrico concentrado, forma un color verde, azul o violeta. Si se agrega cloroformo, el color violeta se extrae y pasa a la fase orgánica.

El reactivo de Duquenois-Levine contiene:

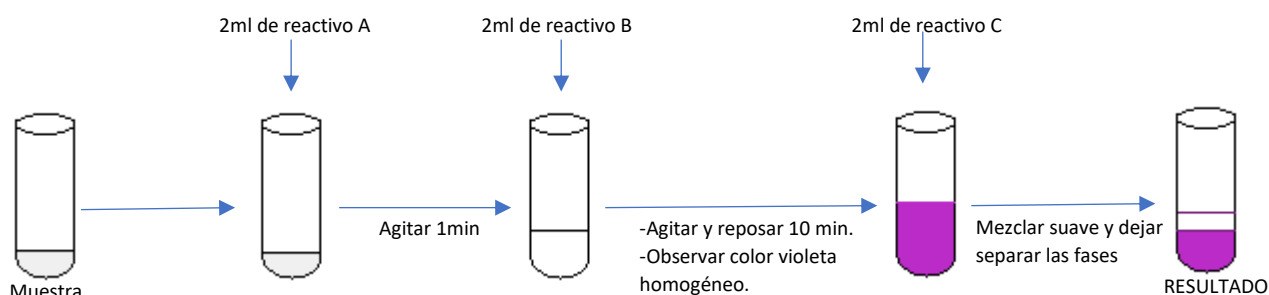
- 0,4g de vainillina y 0,5ml de acetaldehído en 20ml de etanol 95%. (reactivo A).
- 2ml HCl. (reactivo B).
- 2ml Cloroformo (reactivo C).

Presencia de cannabinoides: la fase inferior (orgánica) se vuelve violeta.



Fig. 9. Reactivos utilizados para determinar CBD mediante Duquenois-Levine

Esquema de reacción:



Nota: Si no se agrega cloroformo (reactivo C) la solución queda homogénea violeta.

4.2 Determinación cuantitativa de CBD

La cuantificación de Cannabidiol (CBD) se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), donde en primer lugar se realizó una curva de calibración con diluciones de un patrón CBD.

- Patrón utilizado: PATRÓN CBD 1000 $\mu\text{g/ml}$ =1000ppm=1000mg/l fabricado por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI). (Figura 10).
- Para realizar las diluciones se utilizó Metanol absoluto 0,1% H_2O . (Figura 11).



Fig. 10. Patrón CBD



Fig. 11. Metanol absoluto 0,1% H_2O

Las diluciones que se realizaron fueron de 100, 80, 60 40 y 20 ppm, realizadas de la siguiente manera:

- ✓ **Concentración 100ppm:** 100 μl de patrón puro + 900 μl de metanol. (1)
- ✓ **Concentración 80ppm:** 800 μl de (1) + 200 μl de metanol. (2)
- ✓ **Concentración 60ppm:** 750 μl de (2) + 250 μl de metanol. (3)
- ✓ **Concentración 40ppm:** 670 μl de (3) + 330 μl de metanol. (4)
- ✓ **Concentración 20ppm:** 500 μl de (4) + 500 μl de metanol. (5)

De acuerdo a lo datos teóricos mencionados en la sección de “aplicación de HPLC en cannabinoides” (pág.9), para la realización de este trabajo se utilizó las siguientes condiciones de HPLC:

Fase estacionaria: Columna: C18.

Temperatura: 25°C.

Fase móvil: Solución de buffer fosfato (ácido fosfórico 1g/L; pH: 2,5) : Acetonitrilo (1+3).

Flujo: 1,2 ml/min.

Detector: 220nm.

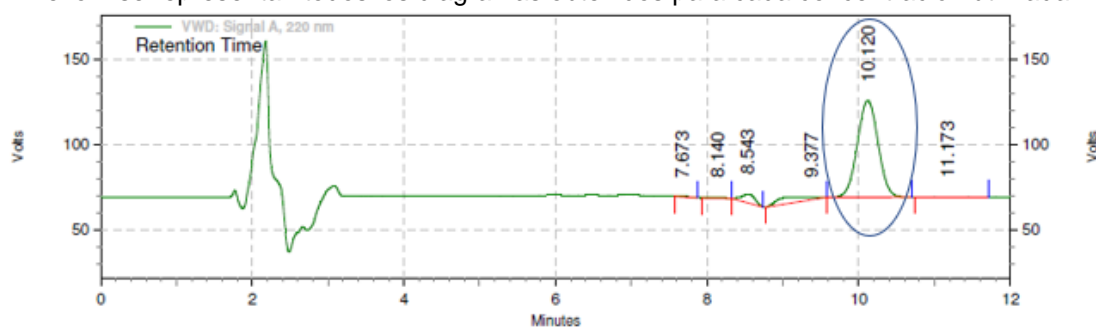


Fig. 12. Equipo HPLC

Con las diluciones obtenidas se procedió a inyectarlas al equipo HPLC (Figura 12) por triplicado, donde para cada una de ellas se obtuvo un área correspondiente a un cierto tiempo dado. Para CBD el pico se obtuvo entre los 7 y 10 minutos para cada una de las corridas. Ese tiempo generalmente es menor que para Δ^9 -THC, por ejemplo, por ser este más hidrofóbico y consecuentemente más afín a la fase estacionaria que el CBD, por lo cual, este último eluye en primer lugar, y generalmente siempre dentro de ese intervalo de tiempo previamente mencionado. (ver figura 6).

A modo de ejemplo se muestra a continuación un diagrama obtenido por el equipo HPLC donde se observa un único pico correspondiente a CBD, se puede observar además el tiempo en el que apareció el pico y su respectiva área. (figura 13).

En el Anexo 1 se representan todos los diagramas obtenidos para cada concentración utilizada.



VWD: Signal A,
220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.673	66123	0.31	6091	0.56
8.140	140863	0.67	11971	1.10
8.543	1081274	5.12	85848	7.91
9.377	1667522	7.89	26184	2.41
10.120	18114814	85.70	952463	87.81

Fig. 13. Diagrama arrojado por el equipo HPLC luego de cada corrida

A continuación, se representa la curva de calibración obtenida al graficar el área en función de la concentración. (Figura 14).

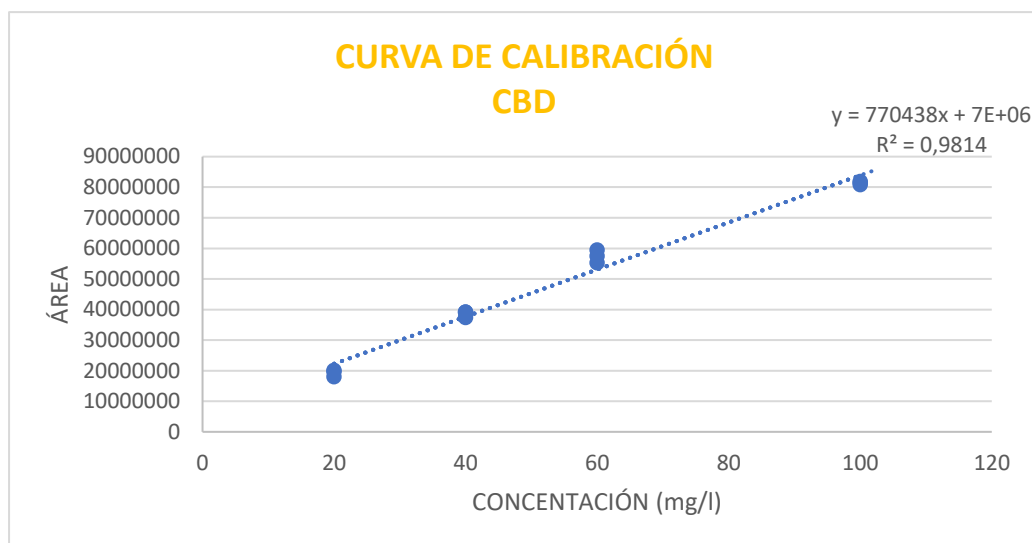


Fig. 14. Curva de calibración para CBD

5. Determinación y cuantificación de Cannabidiol: Resultados y discusión

5.1 Determinación cualitativa de CBD

Para la determinación cualitativa de CBD se utilizaron como vegetales, yerba mate (V1) y marihuana (V2). Las muestras (M) 1, 2 y 3 corresponden a Ratisalil®, Átomo® y Curflex® respectivamente. Además, se utilizó un control positivo para CBD y THC.

 **Beam**



Fig. 15. Determinación cualitativa de CBD mediante Beam

En la figura 15 se puede observar que para las 3 muestras se obtuvo una coloración violeta indicando la presencia de CBD en las mismas. Observamos además que la tonalidad del color violeta en el control positivo de CBD es más intenso que en el de las muestras indicando que estas últimas poseen CBD, pero en menor concentración que dicho control.

Fast Blue

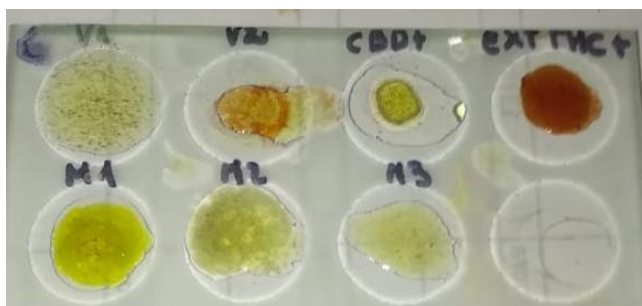


Fig. 16. Determinación cualitativa de CBD mediante Fast Blue

Si bien esta técnica nos dice que el color indicativo de positividad para CBD es amarillo/naranja y para THC es rojo, vemos en la figura 16 que el control THC es naranja oscuro mientras que el de CBD es amarillo verdoso y que este último coincide con las 3 muestras en estudio.

De acuerdo a lo mencionado, se asume igualmente dicha positividad ya que las muestras y el control de CBD tienen el mismo color y se puede decir que este cambio de colores en los controles puede ser debido a que el reactivo de Fast Blue no se encontraba en óptimas condiciones al momento de realizar esta prueba.

Duquenois-Levine

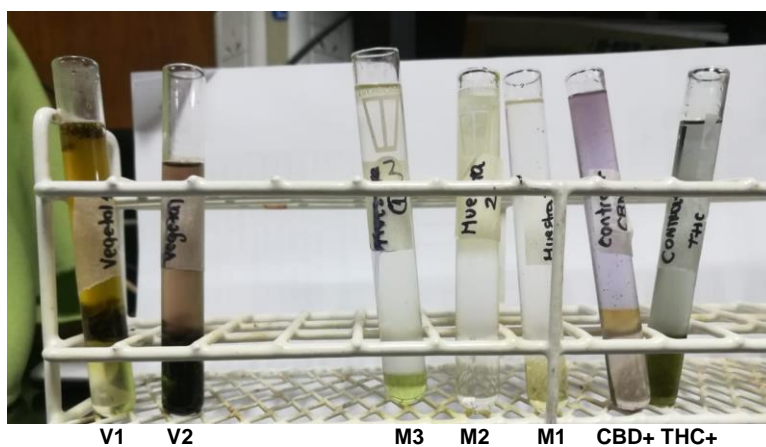


Fig. 17. Determinación cualitativa de CBD mediante Duquenois-Levine

Podemos observar que en ninguna de las 3 muestras analizadas se observa el color violeta característico de positividad. Previo al agregado de cloroformo, el control positivo de CBD muestra un color violeta pero no tan intenso, con lo cual, solo se puede asumir que el contenido de CBD en las muestras es muy inferior al del control y que este método posee una baja sensibilidad para la detección de CBD. (Figura 17).

Debido a la baja sensibilidad de este método para CBD algunos autores desaconsejan usar dicha técnica para detectar CBD (*MANUAL DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS TOXICOLÓGICOS PARA LABORATORIOS DE BAJA COMPLEJIDAD*. 2007. Pág. 81).

5.2 Determinación cuantitativa de CBD

Una vez finalizado el pretratamiento de muestras, obtenida la curva de calibración correspondiente y comprobando cualitativamente que todas las cremas poseen CBD se procedió a realizar la corrida de cada una de las muestras por triplicado en el equipo HPLC para cuantificar el contenido de dicho cannabinoide (figura 18).

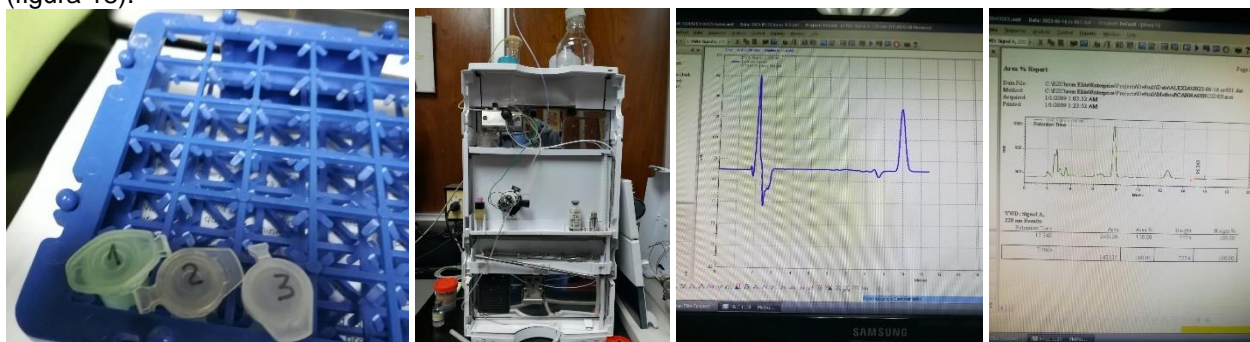


Fig. 18. Cuantificación de CBD en ÁTOMO®, RATISALIL® y CURFLEX®

Con el valor de cada área arrojada por el equipo HPLC, se procedió a reemplazar dichos valores en la ecuación de la recta de la curva de calibración (figura 14) y a despejar el valor de concentración.

$$\text{Ecuación de la recta: } y = 770438x + 7.10^6$$

Siendo (y) el área obtenida y (x) la concentración.

$$x = \frac{(y - 7.10^6)}{770438}$$

Luego se realizó un promedio de dichas concentraciones. En la tabla 1 se resume lo mencionado y en el anexo 2 se representan los diagramas obtenidos por el equipo HPLC para cada una de las cremas utilizadas.

ÁREAS		CONCENTRACIONES (mg/l)	PROMEDIO
ÁTOMO®	71713725	84,00	86,05 mg/l
	74771676	87,97	
	73401700	86,19	
RATISALIL®	71460579	83,67	84,05 mg/l
	71516203	83,74	
	72279959	84,73	
CURFLEX®	93634071	112,45	132,38 mg/l
	122633794	150,09	
	110692439	134,59	

Tabla 1. Áreas y concentraciones obtenidas para cada crema utilizada

Como se observa en la tabla 1 las cremas Átomo® y Ratisalil® poseen una concentración similar mientras que Curflex® es la que mayor concentración de CBD contiene.

Como solamente se realizó la curva de calibración para CBD, solo se pudo hallar la concentración para dicho cannabinoide. Para la cuantificación de otros cannabinoides es necesario previamente obtener una curva de calibración para estos compuestos.

6. Conclusiones

- ❖ Se brindó información importante sobre el uso de cannabis medicinal como terapia complementaria a la farmacológica.
- ❖ Se adquirió destreza en el uso de los materiales de laboratorio como así también en el uso y manejo del equipo de HPLC.
- ❖ Se determinó cualitativamente Cannabidiol (CBD) en cremas de uso tópico mediante los métodos de Fast Blue y Beam en placa de toque y mediante Duquenois-Levine en tubo.
- ❖ Se determinó cuantitativamente CBD en cremas de uso tópico mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

7. Agradecimientos

Quiero agradecer en este espacio a la Dra. Celina Monzón, directora del plan de trabajo, quien me acompañó durante este tiempo a poder realizar estas prácticas, como así también al Dr. Mario Delfino, Patricia Fochesatto y a la bioquímica Nahiara Mendez que se tomaron su tiempo en ayudarme y hacer que este trabajo sea posible.

¡GRACIAS!

8. Bibliografía

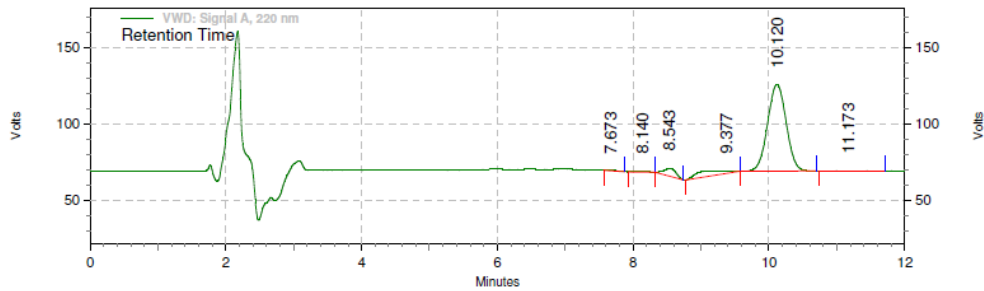
1. Blanca Bórquez Polloni. (2021). *Cannabidiol (CBD): ¿qué es y para qué se utiliza?*. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile, vol.5, pp. 1-16
2. Daniela Suarez Ospina. (2018). *Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas*. Fundación Universidad de América. Revista Semilleros, vol.4, pp. 7-14
3. Johnnatan Mauricio Giraldo. (2019). *Determinación y comparación cualitativa de cannabinoides presentes en productos naturales comerciales del departamento del Cauca, Colombia*. Revista Colombiana de Ciencias Químicas - Farmacéuticas, vol.48, pp. 789-810
4. Chris Conrad. (Rosario, 2014). *Marihuana en Argentina Historia, rendimiento, usos industriales y terapéuticos de la cannabis sativa*
5. José Antonio Ramos Atance. (2017). *Efectos terapéuticos de los cannabinoides*. Instituto universitario de Investigación en Neuroquímica
6. Semillas Low Cost. (octubre, 2018). *Conceptos básicos cultivo de la marihuana: todo sobre las hojas de marihuana*
7. Iwanna Grow. (junio, 2019). *Hoja de marihuana – Todo lo que necesitas saber*
8. Laura E. Ewing. (2019). *Hepatotoxicity of a Cannabidiol-Rich Cannabis Extract in the Mouse Model*. *Molecules*, vol.24, pp. 1-17
9. Constanza Guerra Calderón. (2018). *Validación de un método analítico por cromatografía gaseosa para la cuantificación de cannabinoides*. Universidad de Valparaíso, Chile; facultad de farmacia escuela de química y farmacia laboratorio QUIFAC
10. Covarrubias-Torres N. (2019). *Uso medicinal de la Marihuana*. *Anestesia en México*, vol.31, pp. 49-58
11. Paola Ibáñez García. (2021). *Estudio para la determinación de cannabidiol (CBD). Aplicación a su determinación en plantas de cannabis*. Universidad de Valladolid, Facultad de Ciencias, España, pp. 1-70
12. Ciencia y datos. (2019). *¿Qué es una columna HPLC C18?*
13. Seyed Sadjadi. (2019). *¿Por qué C18 es la fase estacionaria más popular para fase reversa?*. Phenomenex; Ciencia sin filtrar, pp. 1-10
14. Marta G. Michetti. — Emilio Monzó. — Eugenio Inchausti. — Juan P. Tunessi. (2017). *Investigación médica y científica. Ley 27350. Uso Medicinal de la Planta de Cannabis y sus derivados*. Senado y Cámara de Diputados de la Nación Argentina
15. Eduardo L. de Vito. (2017). *Argentina tiene su primera ley sobre el uso medicinal de la planta de cannabis. historia y perspectivas*. Medicina-Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires, Argentina, vol.77, pp. 388-393
16. Dulce María Soria. (2019). *El Sistema de Endocannabinoides como regulador de la lipogénesis y su posible modulación por la mangiferina*. *Revista Biomédica*, vol.30, pp. 83-102
17. Gabriela Fiorenza Biancucci. (2007). *Manual de procedimientos analíticos toxicológicos para laboratorios de baja complejidad*
18. Carmen Osorio Pavón. (2016). *Uso terapéutico del cannabis*. Universidad de Cantabria, España, pp. 1-25
19. Mora Vaca, Milton Santiago Zumbana Brito, Ricardo Xavier. (2022). *Uso de cannabidiol tópico en el tratamiento fisioterapéutico del adulto con patologías reumáticas*. Universidad nacional de Chimborazo facultad de ciencias de la salud carrera de terapia física y deportiva; Riobamba, Ecuador. 1-59
20. León Gómez, Sofía Torres, Yessica Palacios Cadena. (2022). *Formulación de una crema con cannabidiol (CBD) extraído del cannabis sativa dirigido al cuidado de la piel luego de procedimientos agresivos*. *Cosmetics*, 9, pp. 1-8
21. Cristian A. Vaccarini. (2020). *Determinación de cannabinoides en distintas estructuras de la planta de Cannabis sativa sp. y derivados de la misma mediante HPLC/UV-DAD*. Universidad Nacional de La Plata-Facultad de Ciencias Exactas, Licenciatura en Biotecnología y Biología molecular
22. Organización de las Naciones Unidas. (2010). *Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis*. Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito (UNODC), Nueva York
23. Alvaro Lucci. (2021). *Usos generales del Cannabis*. Programa Cannabis UNSL, San Luis

9. Anexos

9.1 Anexo 1

Curva de calibración

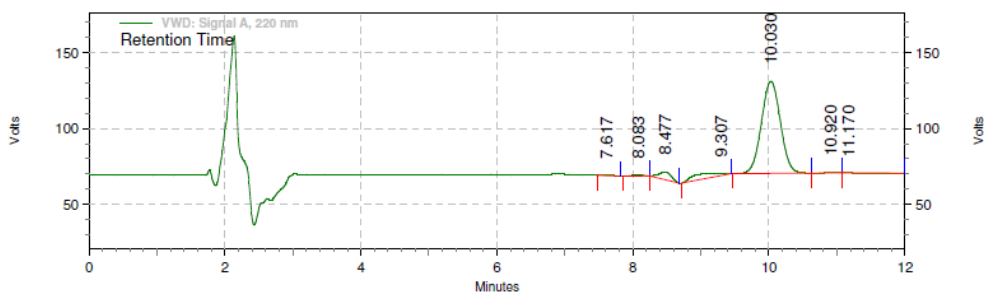
20ppm (1)



VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.673	66123	0.31	6091	0.56
8.140	140863	0.67	11971	1.10
8.543	1081274	5.12	85848	7.91
9.377	1667522	7.89	26184	2.41
10.120	18114814	85.70	952463	87.81

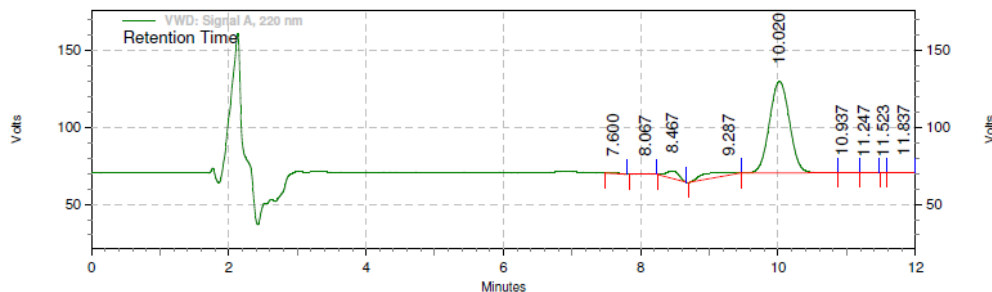
20ppm (2)



VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.617	91265	0.40	8321	0.73
8.083	129981	0.58	11251	0.98
8.477	1112871	4.93	86161	7.53
9.307	1511634	6.69	20805	1.82
10.030	19732018	87.33	1017622	88.88

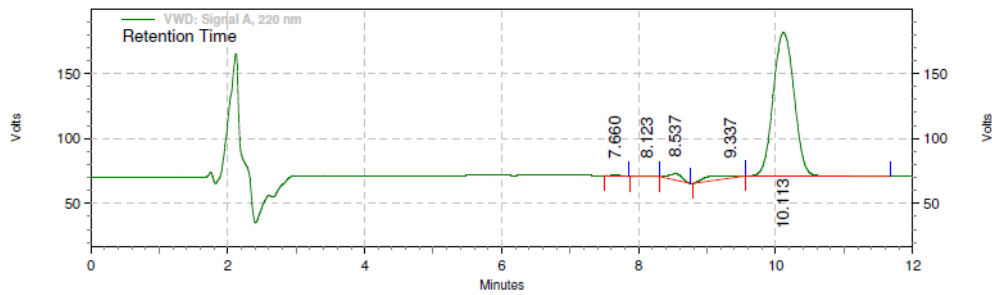
20ppm (3)



VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.600	74343	0.32	6967	0.62
8.067	137520	0.60	11513	1.03
8.467	1059340	4.62	83070	7.40
9.287	1530204	6.67	24969	2.22
10.020	20136767	87.75	995695	88.67

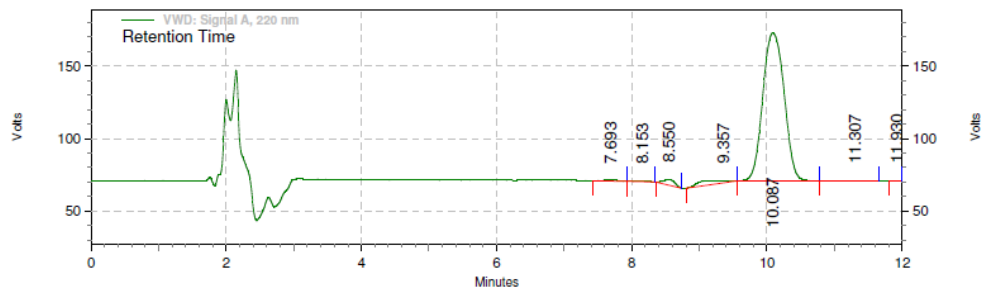
40ppm (1)



VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.660	111016	0.26	10180	0.51
8.123	158983	0.38	12298	0.62
8.537	1058079	2.52	80944	4.08
9.337	1519092	3.61	30244	1.52
10.113	39184394	93.23	1852094	93.27

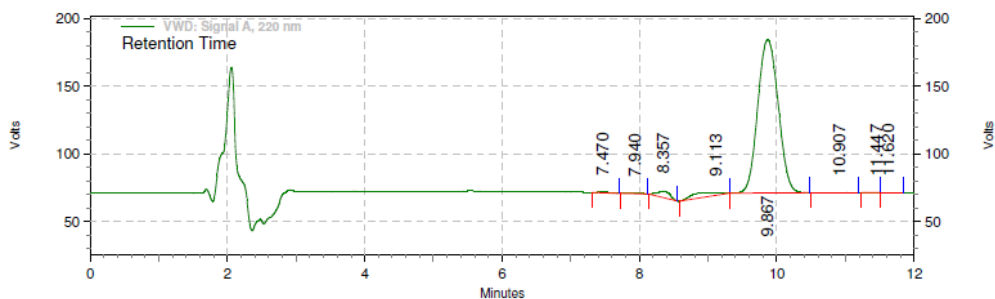
40ppm (2)



VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.693	167774	0.42	11677	0.64
8.153	119232	0.30	9098	0.50
8.550	757853	1.90	65193	3.58
9.357	1294213	3.25	25926	1.42
10.087	37495712	94.09	1708704	93.82

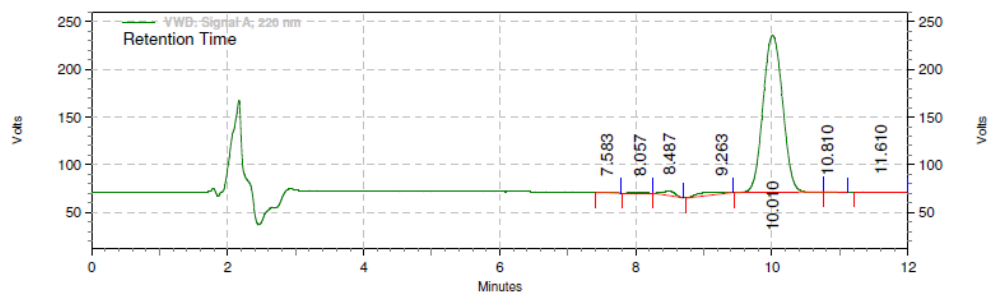
40ppm (3)



VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.470	118345	0.28	9568	0.47
7.940	121611	0.29	9962	0.49
8.357	1022892	2.44	81206	4.01
9.113	1386758	3.31	28631	1.41
9.867	39183506	93.61	1894353	93.55

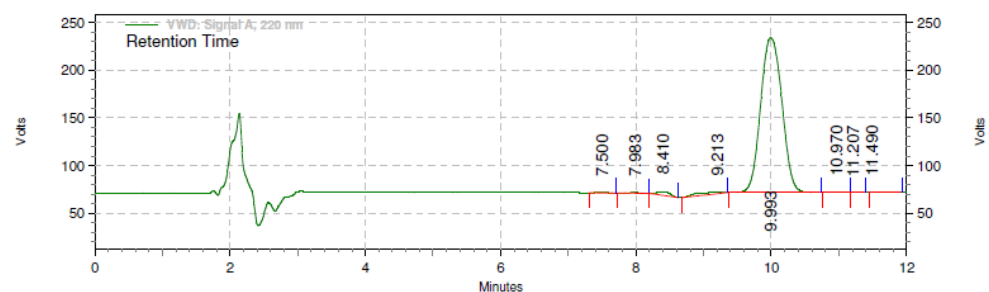
60ppm (1)



VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.583	113247	0.20	9518	0.33
8.057	164639	0.28	12022	0.42
8.487	1033377	1.78	77974	2.70
9.263	1262925	2.18	23859	0.83
10.010	55305788	95.48	2760669	95.67

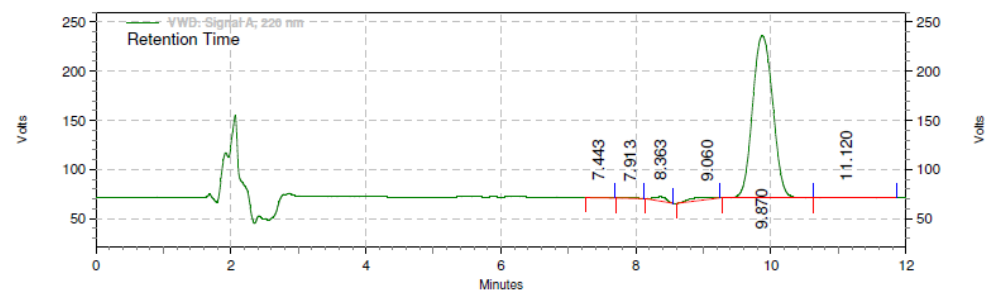
60ppm (2)



VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.500	123157	0.20	9871	0.35
7.983	157071	0.25	10809	0.38
8.410	869384	1.41	67146	2.37
9.213	1084889	1.76	19363	0.68
9.993	59552573	96.37	2720728	96.19

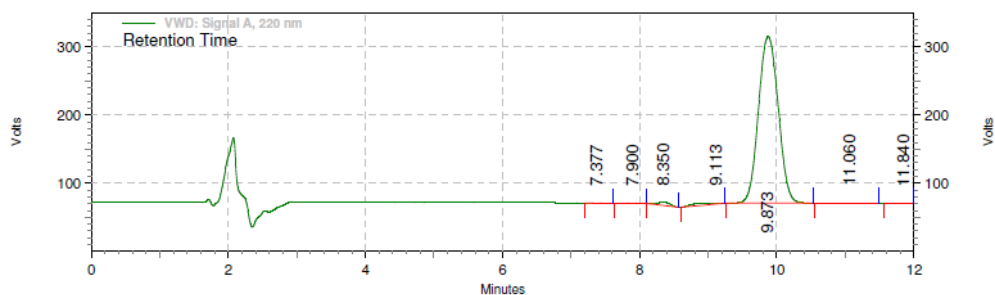
60ppm (3)



VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.443	111161	0.19	8115	0.28
7.913	123727	0.21	8602	0.30
8.363	913873	1.53	72928	2.52
9.060	1061878	1.78	28406	0.98
9.870	57509248	96.19	2770974	95.86

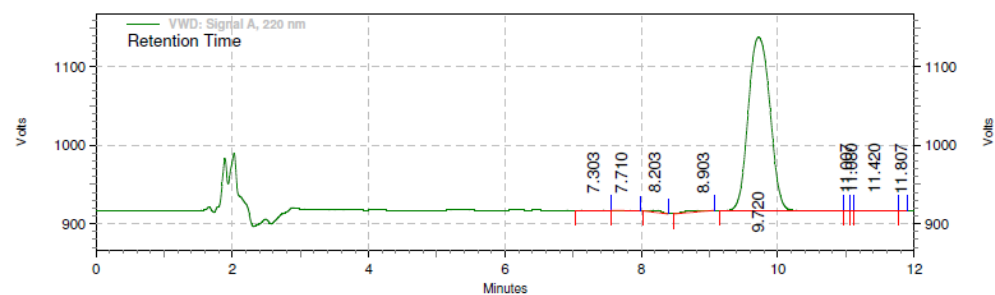
100ppm (1)



VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.377	100954	0.12	7413	0.18
7.900	177345	0.21	12542	0.30
8.350	1066044	1.26	77728	1.84
9.113	1153389	1.36	21769	0.52
9.873	81979732	96.95	4092327	97.09

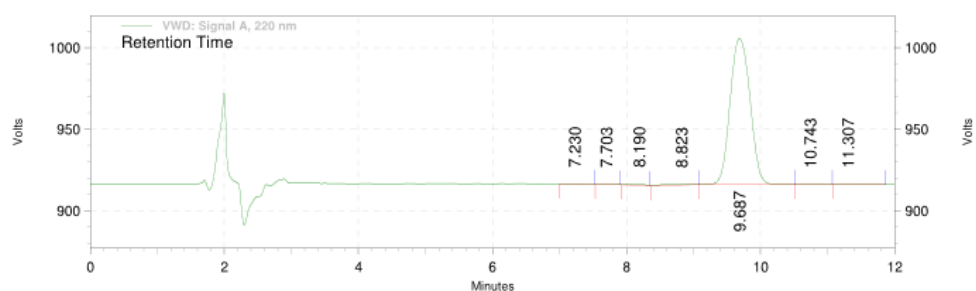
100ppm (2)



VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.303	109072	0.13	6733	0.18
7.710	105766	0.13	6292	0.17
8.203	546874	0.66	47484	1.25
8.903	684664	0.83	19592	0.52
9.720	81481674	98.24	3703260	97.87

100ppm (3)



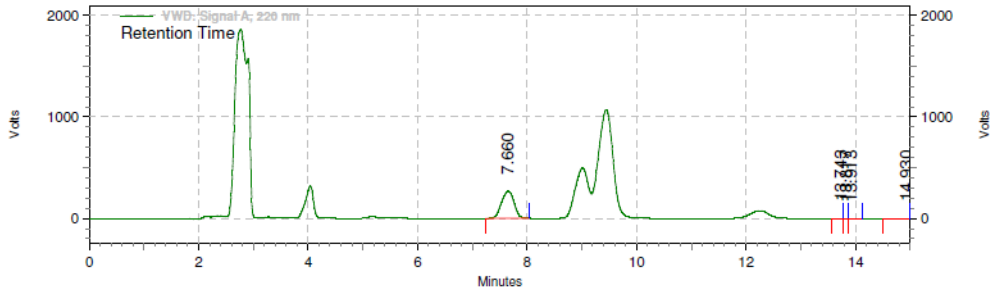
VWD: Signal A, 220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.230	57325	0.18	3644	0.24
7.703	58467	0.19	4847	0.32
8.190	165185	0.53	14529	0.95
8.823	207086	0.66	6099	0.40
9.687	80875040	98.39	1499763	98.04

9.2 Anexo 2

Cremas

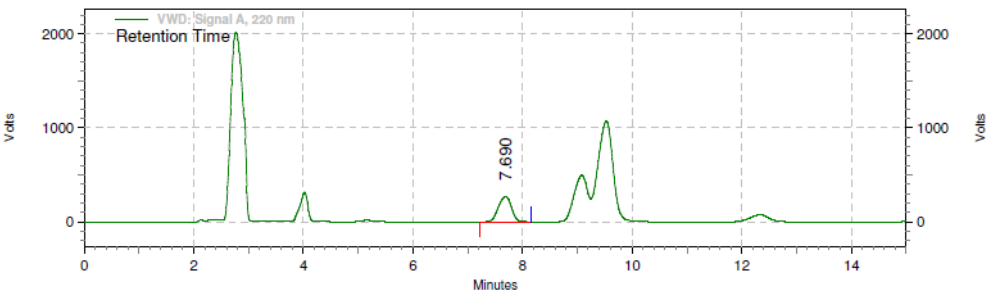
ÁTOMO® (1)



VWD: Signal A,
220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.660	71713725	99.88	4465953	99.91

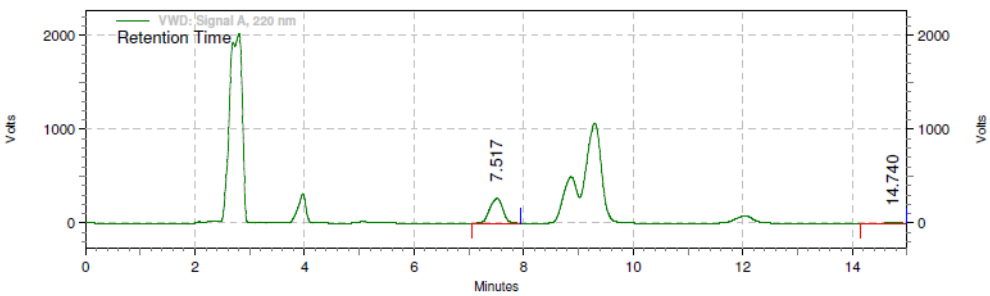
ÁTOMO® (2)



VWD: Signal A,
220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.690	74771676	100.00	4499207	100.00

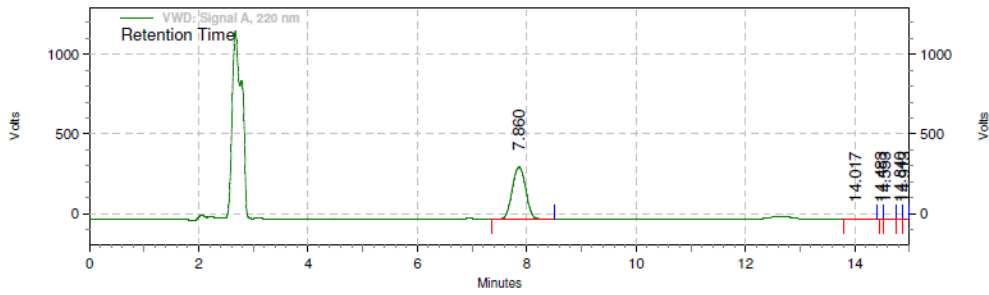
ÁTOMO® (3)



VWD: Signal A,
220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.517	73401700	99.47	4451944	99.69

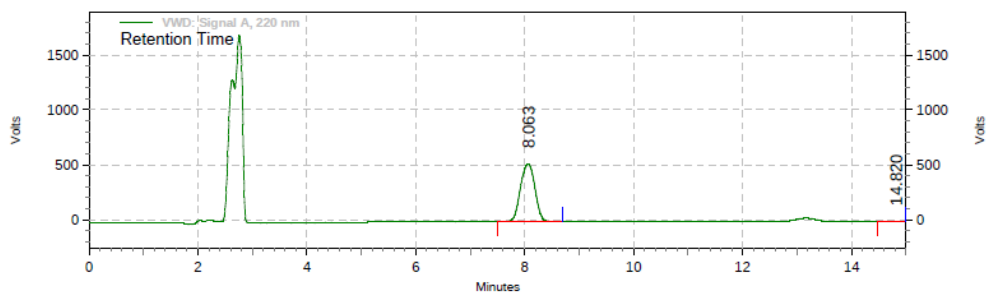
CURFLEX® (1)



VWD: Signal A,
220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.860	93634071	99.99	5442529	99.99

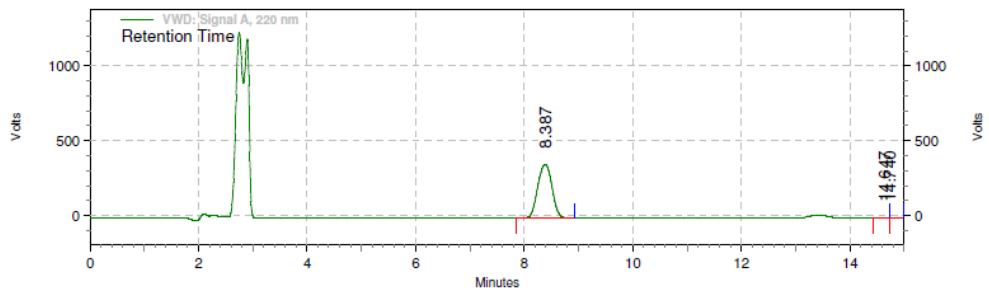
CURFLEX® (2)



VWD: Signal A,
220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
8.063	122633794	99.99	6774647	99.99

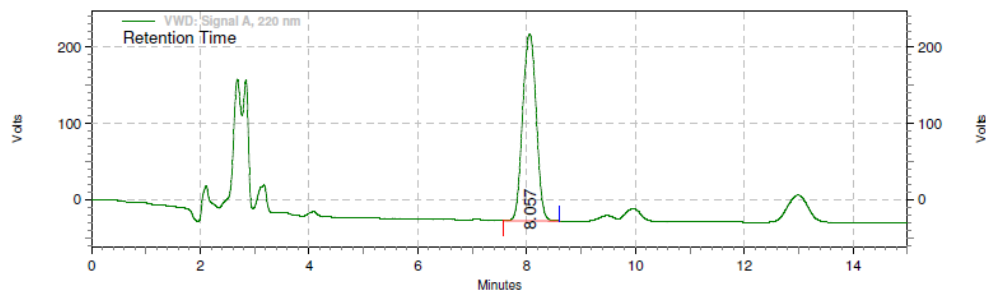
CURFLEX® (3)



VWD: Signal A,
220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
8.387	110692439	100.00	6013267	100.00

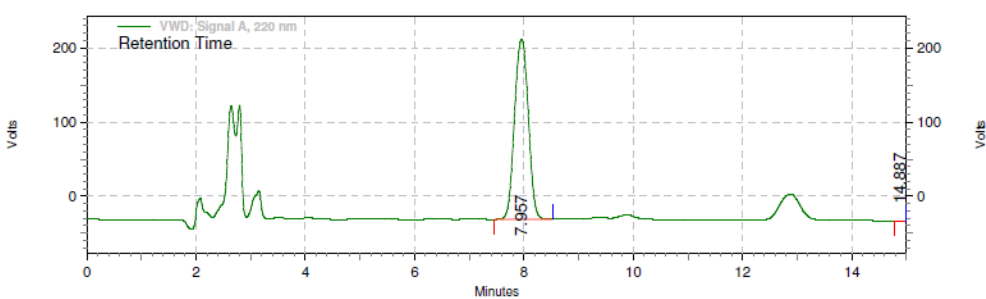
RATISALIL® (1)



VWD: Signal A,
220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
8.057	71460579	100.00	4109877	100.00

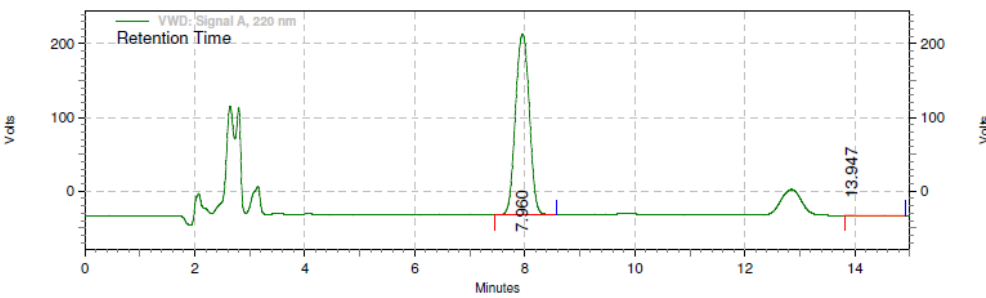
RATISALIL® (2)



VWD: Signal A,
220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.957	71516203	100.00	4078116	100.00

RATISALIL® (3)



VWD: Signal A,
220 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
7.960	72279959	99.97	4117573	99.99