



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Licenciatura en Biotecnología y Biología molecular

Trabajo Final

Determinación de cannabinoides en distintas estructuras de la planta de Cannabis sativa sp. y derivados de la misma mediante HPLC/UV-DAD.

Cristian A. Vaccarini

Director:

Dr. Darío Andrinolo

Tutora:

Dra. Daniela Sedan

Centro de Investigaciones del Medioambiente (CIM)

2020

Agradecimientos...

Agradezco a las instituciones, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), que me brindaron sus instalaciones y plantel docente para desarrollar mis estudios Universitarios y mi trabajo experimental de tesina.

Al Dr. Andrés Porta, director del Centro de Investigaciones del Medioambiente (CIM), por permitir utilizar las instalaciones del instituto, al Dr. Damián Marino por su colaboración en este trabajo y a todos los integrantes del CIM.

Al Dres. Federico Villena y Marcos Vogliolo por el material de investigación aportado.

Un agradecimiento muy especial al Club de Cultivo y Asociación Cultural Jardín del Unicornio, a la Asociación Cultivo en Familia La Plata y a la Asociación Civil Acceda por su aporte fundamental en la creación del Primer Cultivo Universitario de Cannabis. También agradecer a Mamá Cultiva, Doing Canna, Programa Quinto Elemento, al Dr. Marcelo Morante y al Dr. Patricio De Urza por acompañarnos durante estos años formando parte del proyecto de extensión "Cannabis y Salud".

A mis compañeros del proyecto (Lucho, Cristina, Mar, Juli, Julián, Antual y a todos los que formaron parte) por el trabajo realizado en conjunto, por las experiencias vividas y por la responsabilidad de llevar esto adelante. Especialmente a Dante, compañero, amigo y fotógrafo oficial de esta tesina, con quien realizamos el mantenimiento del Cultivo de Cannabis junto a Lore y Ana. En nombre de todos nosotros quiero agradecer a Egon, Nermi, Yaky, Candela, Pollo, Ale y Harry por compartirnos sus conocimientos sobre el cultivo de esta planta y los saberes de la Cultura Cannábica. Al Grow Shop Ganesh por la disponibilidad de los insumos para el cultivo.

A mi director Darío, por su compromiso, por la oportunidad y la confianza depositada en mí. A mi tutora Daniela, por su predisposición, dedicación y por, sobre todo, su paciencia a la hora de resolver mis dudas. En fin, les agradezco a ambos por prepararme, enseñarme y formarme como profesional.

Finalmente agradecer a mi familia, a mis hermanas, a mi novia por acompañarme en esta última etapa y a mis amigos, pero en especial, quiero agradecerles a mis padres. Nada de esto hubiera sido posible sin su apoyo, sin su contención y sin el esfuerzo de ambos para que hoy pueda estar terminando mis estudios.

Gracias.

Trabajo Final – Cristian A. Vaccarini.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

- **Objetivo General**
- **Objetivos específicos**

MATERIALES y MÉTODOS

1. Material vegetal empleado.

1.1. Material vegetal cultivado en indoor en el Cultivo de *Cannabis* Universitario.

1.2. Material vegetal proveniente de otras fuentes.

2. Obtención y caracterización de Aceites a base de *Cannabis* empleando variedades CAT1 y CAT2.

3. Determinación del perfil de cannabinoides en distintas estructuras de la variedad de *Cannabis sp.* “Quinto Elemento” cultivada en condiciones outdoor.

4. Estabilización y primer estudio de Cepas Argentinas Terapéuticas CAT 1, 2 y 3 en condiciones de cultivo indoor.

5. Ensayo de caracterización en la Cepa Argentina Terapéutica N° 3 en condiciones indoor.

6. Procesamiento de muestras y determinación analítica de Cannabinoides por HPLC/UV-DAD.

6.1. Extracción de cannabinoides a partir de diversas muestras.

6.1.1. Material vegetal.

6.1.2. Aceites y resinas.

6.2. Limpieza de matriz de los extractos alcohólicos obtenidos.

6.3. Determinación analítica de cannabinoides por HPLC/UV-DAD.

7. Purificación de cannabinoides.

8. Análisis Estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1: Cepas Argentinas Terapéuticas CAT1, CAT2 y CAT3. Características generales y aplicaciones.

- 1. Validación del Método de Determinación de Cannabinoides por HPLC/UV-DAD.**
- 2. Características generales de las Cepas Argentinas Terapéuticas CAT 1, 2 y 3. Determinaciones de parámetros básicos en los primeros ciclos de cultivo indoor.**
- 3. Obtención y caracterización de Aceites a base de Cannabis empleando variedades CAT1 y CAT2.**

Capítulo 2: Determinación del perfil de cannabinoides en distintas estructuras de la variedad de *Cannabis sp.* “Quinto Elemento” cultivada en condiciones outdoor.

- 1. Descripción de la planta y muestras estudiadas.**
- 2. Determinación del perfil cannabinoide en semillas, raíces, hojas, tallo e inflorescencias de la variedad “Quinto Elemento” y en aceite derivado de la misma.**

Capítulo 3: Caracterización en la Cepa Argentina Terapéutica N° 3 (CAT3) en condiciones de cultivo indoor.

- 1. Características y parámetros de desarrollo de CAT 3 en cultivo indoor.**
- 2. Perfil de cannabinoides en las inflorescencias de CAT3.**

Capítulo 4: Purificación de Cannabinoides a partir de material vegetal.

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

El Cannabis (*Cannabis sativa L.*) es una planta de crecimiento anual originaria de las cordilleras del Himalaya que ha sido utilizada desde hace miles de años por sus propiedades terapéuticas e industriales (Ben Amar et al., 2006; Mechoulam et al., 2013). El registro más antiguo del uso de Cannabis como medicina se encuentra en la farmacopea del emperador chino ShenNung y data de hace más de 4000 años, en la cual se recomendaba para el tratamiento del dolor y trastornos menstruales (Spinella et al., 2001).

Dentro de la especie *Cannabis sativa L.*, se pueden hallar varias subespecies entre las cuales las más conocidas y empleadas son: *Cannabis sativa sativa*, *Cannabis sativa indica* y *Cannabis sativa ruderalis* (Small y Cronquist., 1976). Se trata de una especie dioica que presenta inflorescencias femeninas donde los cálices de las flores se agrupan en densos racimos a lo largo del tallo y de las ramas. En estos racimos y en sus proximidades se presentan tricomas sistólicos, anterales, bulbosos y glandulares. Dentro de los tricomas glandulares, los entallados son los de mayor importancia desde el punto de vista terapéutico, ya que son los que producen y contienen la mayor cantidad de cannabinoides y terpenos (Zwenger et al., 2014).

A modo ilustrativo, en la *Figura 1* se muestran ejemplares femeninos y masculinos de *Cannabis sp.* en el comienzo de su desarrollo.



Figura 1. En la imagen A puede observarse un ejemplar de *Cannabis sp.* en el que se indica con flechas rojas la presencia de las primeras flores femeninas, a menudo muy difícil de distinguir, que consisten en una bráctea verde con un par de pistilos blancos ubicadas detrás de las estípulas. En la imagen B, se ve otro ejemplar de *Cannabis sp.* que ya dio a conocer los primordios estaminíferos (flores masculinas tempranas) indicadas con flechas rojas, siendo más fáciles de distinguir que las flores hembras a simple vista.

Los fitocannabinoides son los principales responsables de los efectos que el Cannabis produce en el organismo. Son moléculas lipofílicas cuya acción terapéutica se debe a

que son agonistas de los receptores del sistema endocannabinoide (CB1 y CB2) desencadenando los mismos efectos que los endocannabinoides, anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Di Marzo et al., 2015). Por lo tanto, actúan como moduladores de muchos procesos fisiológicos donde interviene el sistema endocannabinoide, cuyo papel principal es regular la homeostasis del organismo. Poco a poco se van descubriendo nuevos mecanismos y acciones del sistema endocannabinoide, lo cual permite cada vez conocer mejor su papel en la implicación de diferentes enfermedades. (De Pterocellis y Di Marzo., 2009)

Se han identificado unos 554 compuestos en las plantas de *Cannabis sp.*, entre ellos 113 fitocannabinoides (El Sohly et al., 2014; Ahmed et al., 2015) y más de 120 terpenos (El Sohly et al., 2005). Los fitocannabinoides más conocidos y estudiados son el Δ^9 – tetrahidrocannabinol (THC), el cannabidiol (CBD) y el cannabinol (CBN); los cuales constituyen los principales principios activos del Cannabis y presentan diversas propiedades y efectos. El THC está vinculado fundamentalmente a los efectos psicoactivos del Cannabis, pero también resulta muy efectivo como analgésico en el tratamiento del dolor crónico en adultos, como antiemético en el tratamiento de las náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia, así como en la mejora de los síntomas de espasticidad de la esclerosis múltiple (NAS., 2017). Por otro lado, el CBD es una sustancia sin poder psicoactivo a la cual se atribuyen propiedades anti-inflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antipsicóticas; y finalmente el CBN presenta propiedades anticonvulsivas (Greydanus et al., 2013; Pertwee et al., 2014). Estos cannabinoides neutros no se encuentran en gran cantidad en las plantas frescas ya que los mismos se biosintetizan como ácidos carboxílicos aromáticos prenilados que pueden convertirse en sus homólogos neutros por descarboxilación espontánea en presencia de luz o calor (Aizpurua et al., 2014).

El primer cannabinoide en la vía biosintética, como se muestra en la *Figura 2*, es el ácido cannabigerólico (CBGA), formado a partir de la combinación de pirofosfato de geranilo y ácido olivetólico, que se transforma secuencialmente en ácido tetrahidrocannabinólico (THCA), ácido cannabidiólico (CBDA) y ácido cannabicroménico (CBCA), cada uno por una enzima sintasa particular (Sirikantamas et al., 2007). Los cannabinoides ácidos también poseen varias propiedades farmacológicas, pero no muestran actividad psicotrópica simplemente porque no pueden cruzar la barrera hematoencefálica (Citti et al., 2016).

Los cannabinoides también pueden oxidarse, como en el caso del tetrahidrocannabinol (THC), que puede transformarse en cannabinol (CBN) (Russo et al., 2007) o Δ^8 – tetrahidrocannabinol (Δ^8 – THC), mientras que THCA puede degradarse en ácido cannabinólico (CBNA) (Turner et al., 1980). Tanto los cannabinoides ácidos como los

neutros no solo tienen propiedades terapéuticas reconocidas (EISOhly, 2002), sino que al ser administrados en conjunto con otras sustancias (terpenos, flavonoides, esteroides, etc.) contenidas en los fitopreparados, provocan un efecto final diferente gracias a la interacción conjunta de todos estos compuestos sobre los sistemas biológicos, según la presencia y concentración que tenga la variedad de Cannabis utilizada; fenómeno que se ha designado como “efecto séquito” (Russo et al., 2011).

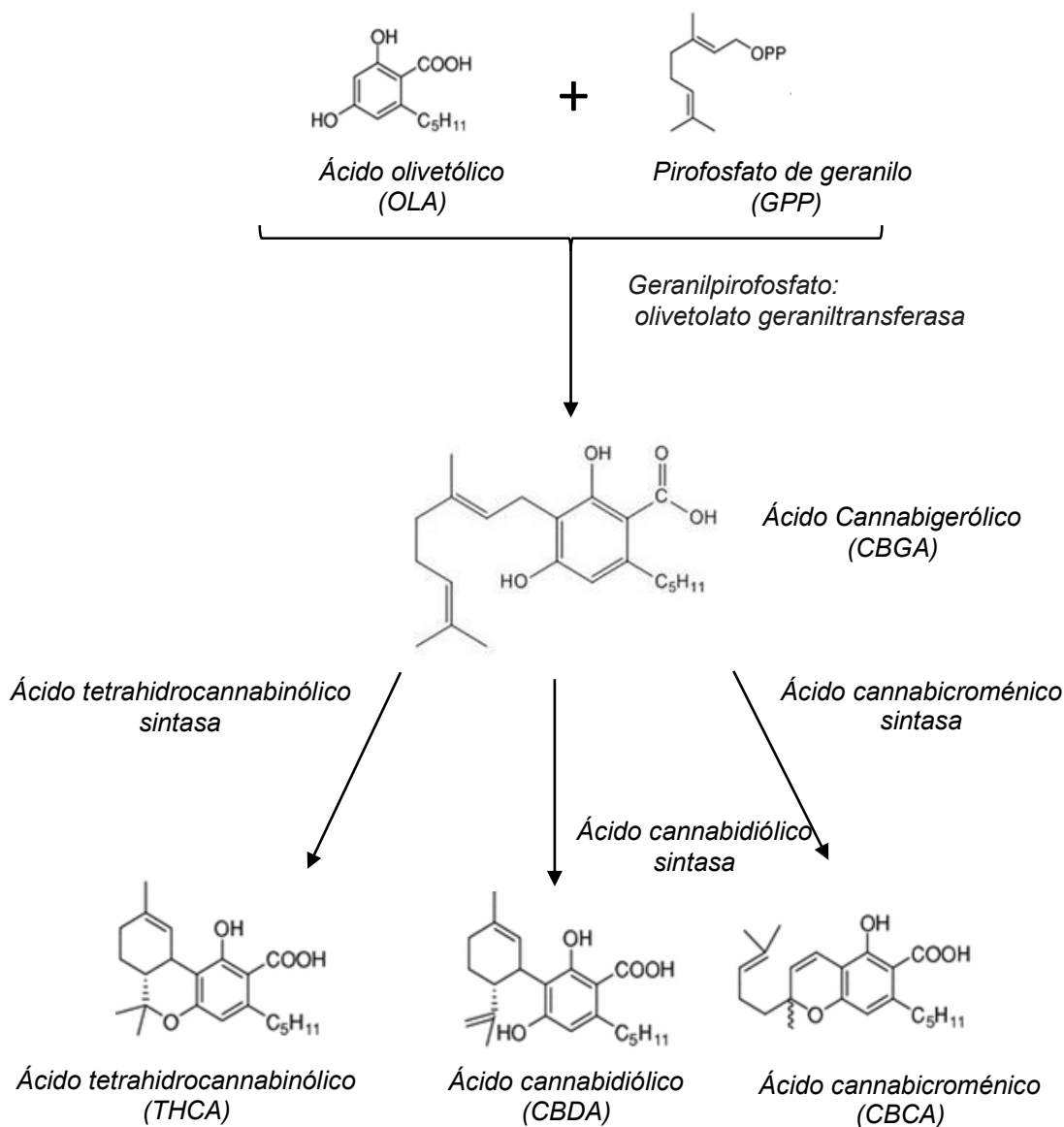


Figura 2. Ruta biosintética de cannabinoides. Esquema tomado y modificado del trabajo realizado por Sirikantarmas et al., 2007.

Cada vez es más frecuente que los pacientes, especialmente aquellos que sufren enfermedades graves, incapacitantes o terminales, decidan el uso terapéutico del Cannabis y le soliciten a su médico que los acompañe en el proceso. El seguimiento médico es fundamental para el manejo de las dosis y asesoramiento de pacientes con

enfermedades que demande su uso como en la Epilepsia Refractaria Infantil, Parkinson, Alzheimer, pacientes en tratamientos oncológicos, manejo paliativo del dolor, Fibromialgias, entre otras (Ben Amar et al., 2006). Países como Canadá, España, Holanda, EEUU, Bélgica y Uruguay son un claro ejemplo de la amplitud de criterios con la que médicos dedicados a este tema pueden indicar los derivados de esta planta.

En la Argentina, en general, los preparados se realizan de manera casera por familiares u ONGs dedicadas a esta problemática donde se emplean diversas variedades de *Cannabis sp.* sin conocimiento de sus componentes principales, por lo que ha surgido la necesidad de distinguir entre variedades de plantas de Cannabis por fuera de la clasificación basada en la morfología de la planta, que considera características como la forma de la hoja, la altura de la planta, el color, el olor y la velocidad de crecimiento. Dentro de esta clasificación, se identifican principalmente los tipos de *Cannabis sativa* versus *Cannabis indica*. Es de importancia destacar que hoy en día cuando se habla de sativas e índicas, ya no se refiere ni a una indica ni a una sativa pura sino a los denominados híbridos modernos.

Debido a que cada variedad de Cannabis presenta un perfil químico distinto y estas etiquetas no reflejan una diferencia real en su composición, ha surgido la necesidad de una nueva clasificación basada en variedades químicas (quimiovariedades) con un perfil químico complejo, pero bien definido y reproducible (Hazekamp et al., 2016). Se definen entonces 3 quimiotipos de Cannabis en base a la relación de sus principales cannabinoides. Los primeros quimiotipos definidos fueron el I, con altas cantidades de THC (THC: CBD \gg 1), el II con iguales cantidades de THC y CBD, (THC: CBD = 1, aceptable entre 0.5-2) y el III con alto contenido de CBD (THC: CBD \ll 1) (Pacífico et al., 2007).

Así mismo, derivado de la experiencia que han acumulado las ONGs dedicadas al uso terapéutico del Cannabis, existe un conocimiento empírico que asigna propiedades beneficiosas a ciertas variedades de Cannabis siendo éstas las más empleadas por la comunidad para la terapéutica coadyuvante de una gran cantidad de sintomatología y/o patologías. Sin embargo, no existe hasta el momento evidencia científica que permita caracterizar o describir el quimiotipo de las mismas.

Con el propósito de comenzar la quimiotipificación de variedades locales, muy utilizadas en la región, hemos planteado los ensayos de cuantificación de cannabinoides en las distintas estructuras de la variedad local denominada “Quinto elemento” cultivada en exterior y la caracterización in vitro de dicha variedad. La misma fue producida por Daniel Loza, cultivador solidario muy querido en nuestra ciudad que, tras ser allanado y privado de su libertad en mayo de 2018, falleció dejándonos como legado esta planta

que, por la historia de solidaridad de su creador, representa para nuestra región mucho más que su potencial terapéutico.

De igual manera, es necesario comenzar a desarrollar sistemas de detección, caracterización y control de fitopreparados en el marco de actividades científicas en Universidades y entidades vinculadas al Sistema Científico, de modo que podamos por un lado proveer materiales necesarios para investigación básica y aplicada y por otro funcionar como nexos entre pacientes y médicos en cuanto a proporcionar información necesaria para evaluación de dosis y reducción de daños.

OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Generar conocimiento y herramientas tecnológicas y de análisis para la investigación del uso terapéutico de la planta de *Cannabis*, sus derivados y tratamientos no convencionales. Avanzar en la caracterización de las cepas de *Cannabis sp.* locales empleadas con fines terapéuticos.

- **Objetivos Específicos**

1. Implementar los protocolos de análisis de muestras a fin de identificar y cuantificar los cannabinoides en inflorescencias, aceites y resinas.
2. Purificación de cannabinoides para ser utilizados en estudios científicos básicos y clínicos.
3. Determinar cualitativa y cuantitativamente el contenido de cannabinoides en semillas, raíces, hojas e inflorescencias de la cepa local denominada Quinto Elemento y aceites derivados de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal empleado.

En el desarrollo de este trabajo hemos empleado material vegetal de *Cannabis sp.* proveniente de diversas fuentes, los cuales fueron utilizados para los diferentes diseños experimentales y estudios abordados.

1.1. Material vegetal cultivado en indoor en el Cultivo de Cannabis Universitario.

Empleamos material vegetal proveniente del primer Cultivo Universitario de Cannabis que fue inaugurado el 30 de agosto de 2018 en el Centro de Investigación del Medioambiente (CIM-UNLP-CONICET) con el fin de crear un Cepario Nacional de Cannabis. El mismo comenzó con el cultivo de 3 variedades regionales de *Cannabis sp.* empleadas con fines terapéuticos por las ONGs Asociación Cultural Jardín del Unicomio (ACJU) y Asociación de Cultivo en Familia La Plata (ACUFALP); en adelante denominadas Cepas Argentinas Terapéuticas (CAT) 1, 2 y 3 (Figura 3).



Figura 3. Ejemplares de las Cepas Argentinas Terapéuticas (CAT) 1, 2 y 3 en período vegetativo.

Estas cepas fueron seleccionadas teniendo en cuenta que son las más utilizadas por dichas ONGs con fines terapéuticos y que, a priori, presentan características distintivas permitiendo obtener preparados con ratios THC/CBD diferentes. Se recibieron inicialmente 2 ejemplares de cada variedad para iniciar el cultivo de estas variedades en el espacio destinado a tal fin en el CIM-CONICET-UNLP.

Una vez desarrollados esos primeros ejemplares, la reproducción de los mismos se llevó a cabo mediante la técnica de esquejado, que consistió básicamente en seleccionar y cortar ramas de una planta madre removiendo luego el tejido superficial de la base del tallo mediante suave raspado (*Figuras 4 A y 4 B*). Sobre las ramas así preparadas se realizó el favorecimiento del enraizado mediante la aplicación de hormona de enraizamiento (Clonex®) y la colocación de las mismas en un aeroclonador (La máquina de hacer esquejes®) que aporta la humidificación necesaria a la zona del tallo tratada (*Figuras 4 C y 4 D*).

Una vez desarrolladas las raíces en el aeroclonador (*Figura 4 E*), los esquejes fueron colocados en el sustrato de desarrollo (Growmix, Terrafertil®) y llevados al ambiente de crecimiento vegetativo: fotoperiodo luz/oscuridad 18/6 hs, luz blanca proporcionada por lámparas de mercurio (intensidad: 530 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{sg}$), temperatura de 22 °C, humedad del 53%, riego cada cuatro días siguiendo un control diario (*Figura 4 F*).

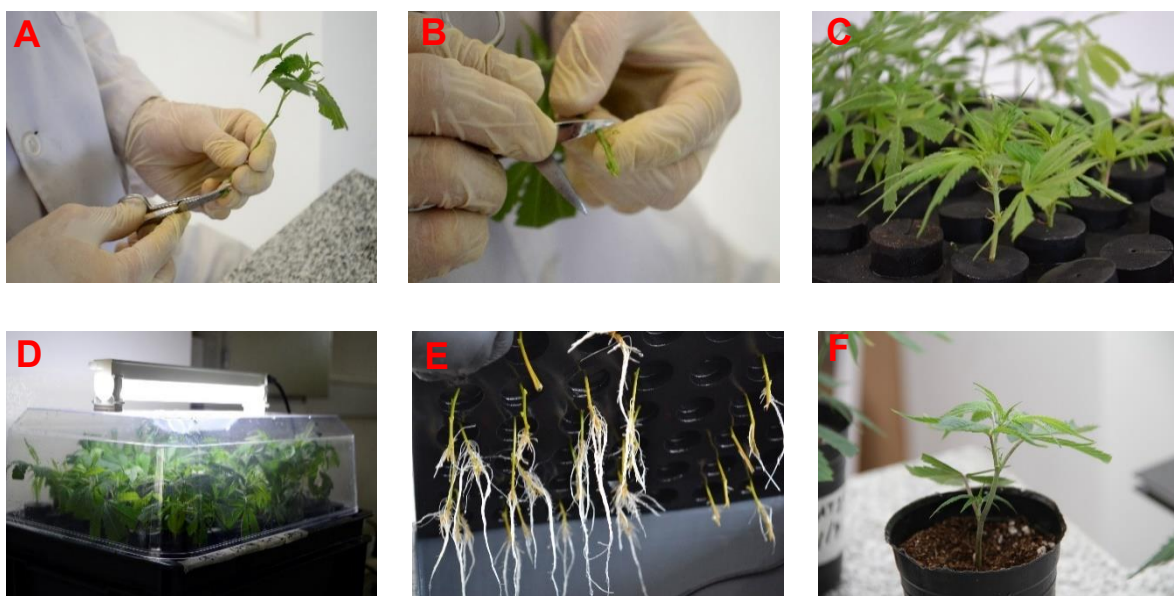


Figura 4. Reproducción de las plantas por esquejado. A) Corte a 45° sobre la base del tallo y corte recto sobre las hojas. B) Eliminación de la epidermis por suave raspado en la base del tallo, dejando al descubierto el cambium. C) Ubicación de las ramas preparadas en los pasos previos en el aeroclonador, previamente se aplicó hormona de enraizamiento (Clonex®) en la zona raspada. D) Exposición de los esquejes a agua pulverizada y ciclo luz/oscuridad 18/6 hs. E) Esquejes, previo a ser trasplantados, luego de 15 días en el aeroclonador. Nótese el desarrollo de raíces alcanzado F) Esqueje en sustrato sólido (Growmix, Terrafertil®) durante la primera semana de desarrollo vegetativo.

Estas plántulas fueron trasplantadas cada 15 días promoviendo un adecuado desarrollo radicular. Cumplidos los 40 días de crecimiento vegetativo las plantas se colocaron en el área destinada a floración bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo luz/oscuridad 12/12 hs, luz cálida de lámparas de Sodio (1007 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{sg}$), temperatura de 25 °C, humedad del 53%, riego cada dos días siguiendo un control diario. Pasado el tiempo

necesario de floración, dependiendo de cada variedad, se procedió a la cosecha de las inflorescencias por corte de las mismas.

Las inflorescencias cosechadas fueron sometidas al proceso de manicurado (eliminación del material vegetal sin tricomas) y posterior secado en ambiente seco, fresco y a resguardo de la luz durante 2 semanas.

Durante todo el proceso de desarrollo vegetativo y floración no se empleó ningún tipo de plaguicida sintético para controlar plagas, ni de fertilizantes para abonar las plantas. Para el riego se utilizó agua corriente, libre de cloro, pH: $7,92 \pm 0,10$, conductividad: $0,860 \pm 0,14$ ms/cm.

1.2. Material vegetal proveniente de otras fuentes.

Para este trabajo contamos también con material vegetal proveniente de otras fuentes distintas al Cultivo de Cannabis Universitario descrito en la sección anterior. En ambos casos fueron materiales vegetales entregados a nuestro grupo de trabajo para ser empleados en investigaciones científicas.

Una de estas fuentes de material vegetal es un ejemplar de *Cannabis sp.* de una variedad denominada coloquialmente “Quinto Elemento” que fue cultivado en condiciones outdoor en la ciudad de La Plata entre octubre de 2017 y abril de 2018 por una cultivadora socia de ACUFALP y que fue entregado por dicha ONG para ser empleado con fines de investigación científica. Se recibieron semillas, raíces, hojas, tallo e inflorescencias. El material vegetal recibido estaba seco y en buenas condiciones, libre de hongos y sin presencia de insectos. Con el resto de las inflorescencias cosechadas la ONG realizó un aceite de manera casera del cual se recibieron 2 ml.

La otra fuente de material vegetal recibido fue un prensado de Cannabis que había sido secuestrado y confiscado. Dicho material fue puesto a nuestra disposición con fines de investigación científica por el Juez Federal interino Dr. Federico Villena, a cargo del Juzgado Federal de Primera Instancia en lo Criminal y Correccional N° 2 de Lomas de Zamora, Secretaría N° 6. La entrega estuvo a cargo del Sr. Jefe de Escuadrón Seguridad Vial de Autopista Sur de Gendarmería Nacional Argentina.

2. Obtención y caracterización de Aceites a base de Cannabis empleando variedades CAT1 y CAT2.

En el marco de un proyecto de colaboración en investigación sobre epilepsia refractaria en caninos dirigido por la Dra. Fabiana Landoni de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, se realizaron y caracterizaron aceites a base de Cannabis empleando inflorescencias de las variedades CAT1 y CAT2 cultivadas en el Cultivo Universitario de Cannabis del CIM-CONICET-UNLP.

De acuerdo con las especificaciones de las investigadoras a cargo del estudio en cuanto a la necesidad de que los aceites a ser administrados contuvieran sólo cannabinoides neutros se implementó un tratamiento térmico que permita la descarboxilación de los cannabinoides ácidos que pudieran estar presentes. Por ello las inflorescencias fueron sometidas a calentamiento a 145°C durante 7 min en horno eléctrico siguiendo lo descrito por Iffland *et al* (2016).

Sobre las inflorescencias tratadas de esta forma se realizó una extracción con solvente utilizando Etanol 96° de uso medicinal (Purocol®) en una proporción de 20 ml por gr de inflorescencias finamente trituradas con tijera. La mezcla fue sometida a agitación magnéticamente durante 10 minutos para favorecer la extracción y luego se realizaron dos filtraciones, primero con gasa estéril y luego con papel de filtro Whatman®, para separar los restos vegetales. El extracto alcohólico se llevó a estufa a 70°C y se evaporó el solvente obteniendo un preparado pegajoso y oscuro conocido comúnmente como resina.

El rendimiento de la extracción se calculó mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \text{gr de resina} / \text{gr del material vegetal} \times 100$$

Una vez obtenidas las resinas a partir de las inflorescencias de CAT1 y CAT2, se realizó la determinación analítica, descrita en el apartado 6 de *Materiales y Métodos*, de los cannabinoides presentes en las mismas por HPLC/UV-DAD. En base al resultado obtenido en las resinas se prepararon aceites diluyendo las mismas en un volumen adecuado de aceite de girasol (Natura®) de acuerdo con las concentraciones finales solicitadas en el marco de la investigación de epilepsia refractaria.

Los aceites preparados de esta manera fueron caracterizados determinando su contenido de cannabinoides por HPLC/UV-DAD.

3. Determinación del perfil de cannabinoides en distintas estructuras de la variedad de *Cannabis sp.* “Quinto Elemento” cultivada en condiciones outdoor.

Se trabajó con el material vegetal entregado por la ONG ACUFALP descrito en la sección 1.2. de *Materiales y Métodos*. Sobre los distintos tejidos vegetales entregados (inflorescencias, raíz, hojas, tallo y semillas) se realizaron inicialmente las extracciones de cannabinoides siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 6.1 de *Materiales y Métodos*. Una vez obtenidos los extractos alcohólicos se realizaron las determinaciones analíticas por HPLC/UV-DAD, detallada en el apartado 6.2 de *Materiales y Métodos*, de los cannabinoides (CBDA, THCA, CBD, CBN y THC) contenidos en las distintas muestras provenientes de un ejemplar de la variedad

denominada coloquialmente “Quinto Elemento” cultivado en condiciones outdoor. Así mismo se caracterizó el contenido de cannabinoides por HPLC/UV-DAD presentes en el aceite que fue preparado por dicha ONG a partir del mismo ejemplar.

4. Estabilización y primer estudio de Cepas Argentinas Terapéuticas CAT 1, 2 y 3 en condiciones de cultivo indoor.

Se realizó un estudio de las características de las variedades que conforman el Cultivo de Cannabis Universitario del CIM-CONICET-UNLP, CAT1, CAT2 y CAT3. Para ello se realizó un seguimiento de las características de crecimiento, observando el desarrollo de varios ejemplares de cada una de estas variedades durante los primeros 5 ciclos de desarrollo. Se registraron empleando metro o calibre, realizando las medidas de forma periódica, la altura de la planta en función del tiempo, la altura máxima alcanzada. También se determinó la cantidad y características de los folíolos, las características de las inflorescencias, el tiempo necesario para la floración y la cantidad de inflorescencias producidas en cada caso. A partir de estas determinaciones se derivaron parámetros como velocidad de crecimiento (cm/día) y la producción de Biomasa de inflorescencias (gr peso seco/planta).

Así mismo se realizó la determinación del contenido de cannabinoides en las inflorescencias mediante la técnica analítica HPLC/UV-DAD que se describe en el apartado 6.3 de *Materiales y Métodos*.

5. Ensayo de caracterización en la Cepa Argentina Terapéutica N° 3 en condiciones indoor.

El ensayo de caracterización de la Cepa Argentina Terapéutica CAT3 fue diseñado utilizando como guía el protocolo de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2012) adaptado a condiciones de laboratorio, con el propósito de determinar la homogeneidad y estabilidad de los caracteres de esta variedad, y poder resolver a que subespecie y quimiotipo de Cannabis pertenece.

Nuestra adaptación del protocolo de UPOV, que contempla crecimiento outdoor, a las condiciones controladas de cultivo indoor en laboratorio consistió en realizar el estudio sobre 20 ejemplares de tamaño adecuado y suficientemente desarrollados, en base a las experiencias previas con estas cepas descritas en el apartado 4. de esta sección, para expresar todos los caracteres de la variedad en el primer ciclo de cultivo. La técnica utilizada para la reproducción y las condiciones de cultivo, fueron las mismas que las detalladas en el apartado 1.1. de *Materiales y Métodos*, obteniendo para este estudio 20 esquejes a partir de una planta madre de CAT3 cultivada en el Cultivo de Cannabis Universitario seleccionada a tal fin. Los ejemplares se desarrollaron libremente sin

realizar ningún tipo de atadura, ni poda de raíces, hojas o ramas con el fin de permitir un crecimiento lo más natural posible.

Los 20 ejemplares estudiados se mantuvieron en crecimiento vegetativo durante 6 semanas donde se les realizaron trasplantes cada 17 días. Se utilizaron contenedores de 1, 5 y 10 L (contenedor final) asegurándonos la expresión total de los caracteres.

Las 20 plantas luego fueron colocadas en floración por un período de 10 semanas. Con una cinta métrica se determinó la velocidad de crecimiento vertical de las plantas, midiendo la altura desde el cuello del tallo al ápice de la planta (altura media) cada 7 días hasta el cese de su crecimiento. Llegado este momento y utilizando un calibre, se determinó la longitud del pecíolo, el número de folíolos y la longitud y anchura del folíolo central de las hojas ubicadas por debajo del tercer nudo contando desde el ápice de la planta, asegurándonos un completo desarrollo de las mismas. Previo a inducir la floración, se midió la conductancia estomática y la cantidad de clorofila en las hojas por debajo del tercer nudo utilizando un porómetro y un medidor de clorofila (Minolta SPAD 502®) respectivamente.

Cumplidas las diez semanas se procedió a la cosecha de las plantas y se determinó el diámetro del cuello del tallo utilizando un calibre. Las inflorescencias cosechadas fueron sometidas al proceso de manicurado y posterior secado en ambiente seco, fresco y a resguardo de la luz durante 2 semanas. Una vez secas, se pesaron las inflorescencias obtenidas de cada ejemplar y con la ayuda de tijeras se procedió a su triturado para obtener un homogeneizado. Se tomaron muestras del homogeneizado de cada individuo para la extracción de cannabinoides y posterior determinación analítica por HPLC/UV-DAD.

6. Procesamiento de muestras y determinación analítica de Cannabinoides por HPLC/UV-DAD.

6.1. Extracción de cannabinoides a partir de diversas muestras.

6.1.1. Material vegetal.

El material vegetal en cada caso fue secado en estufa durante 1 hs a baja temperatura (30 °C) para evitar la descarboxilación, y luego pesado.

Las inflorescencias fueron trituradas utilizando tijera y luego se colocaron en contacto con Etanol 96° (Purocol®), a razón de 20 ml por gramo. El material vegetal en contacto con alcohol fue sonicado durante 10 minutos a 400 Watts de potencia y una frecuencia de 40 Khz (Testlab SRL®/TB10) con el fin de favorecer la extracción de los cannabinoides. Finalmente se separó el extracto alcohólico mediante filtración empleando primero gasa estéril y luego papel de filtro Whatman®.

Las semillas trituradas en seco en mortero y las raíces, tallo y hojas cortadas finamente utilizando una tijera fueron sometidas a extracción con Etanol 96° (Purocol®), con la misma relación que para las inflorescencias (20 ml/gr). En este caso, dado que el contenido de cannabinoides en estos tejidos vegetales es menor que el presente en las inflorescencias, con el fin de favorecer la extracción de los mismos aumentando el tiempo de contacto, se dejó en maceración durante 72 hs en heladera y al abrigo de la luz. Por último, se filtró utilizando primero gasa estéril y luego papel de filtro Whatman® con el fin de remover los restos vegetales.

6.1.2. Aceites y resinas.

La extracción de los cannabinoides de los aceites se realizó utilizando 10 ml de Etanol 96° (Purocol®) sobre 0,5 gr de aceite (relación 20 ml etanol/gr de aceite). Luego se agitó la solución durante 1 minuto con la ayuda de un vortex y finalmente se centrifugó durante 10 minutos a 5.000 rpm (Centrífuga Rolco®) separando el sobrenadante a ser utilizado posteriormente.

Para el caso de las resinas, debido a su alta concentración de cannabinoides, se utilizó un mayor volumen de alcohol por gramo de resina (100 ml/gr). Se pesaron 0,1 gr que fueron diluidos en 10 ml de Etanol 96° (Purocol®). Posteriormente se procedió de la misma forma descrita en el caso del aceite, reservando el sobrenadante para su posterior procesamiento.

6.2. Limpieza de matriz de los extractos alcohólicos obtenidos.

Los extractos alcohólicos obtenidos a partir de resinas, aceites y materiales vegetales, según se describió en las secciones previas, fueron empleados en la determinación de cannabinoides por HPLC/UV-DAD. Para ello se realizó un proceso de limpieza de matriz (Clean Up) de los mismos.

Dicho procedimiento consistió en poner en contacto 1 ml del extracto con un sistema de sales, agitando la solución durante 1 minuto en vortex, para luego sonicarla (Testlab SRL®/TB10) durante 10 minutos (*Figura 5*). Posteriormente se centrifugó 10 min a 5000 rpm (Centrífuga Rolco®) con el fin de separar el sobrenadante de las sales empleadas en el Clean Up. Luego de extraer el sobrenadante se realizó un lavado con 0,5 ml de etanol resuspendiendo las mismas y siguiendo después el mismo procedimiento. Luego de centrifugar nuevamente se juntaron las dos fracciones alcohólicas. El extracto resultante ($V_f=1,5$ ml) fue finalmente filtrado por filtros de nylon (Osmonics, 45 μ m) y

luego analizados por HPLC/UV-DAD siguiendo la técnica analítica descrita a continuación.

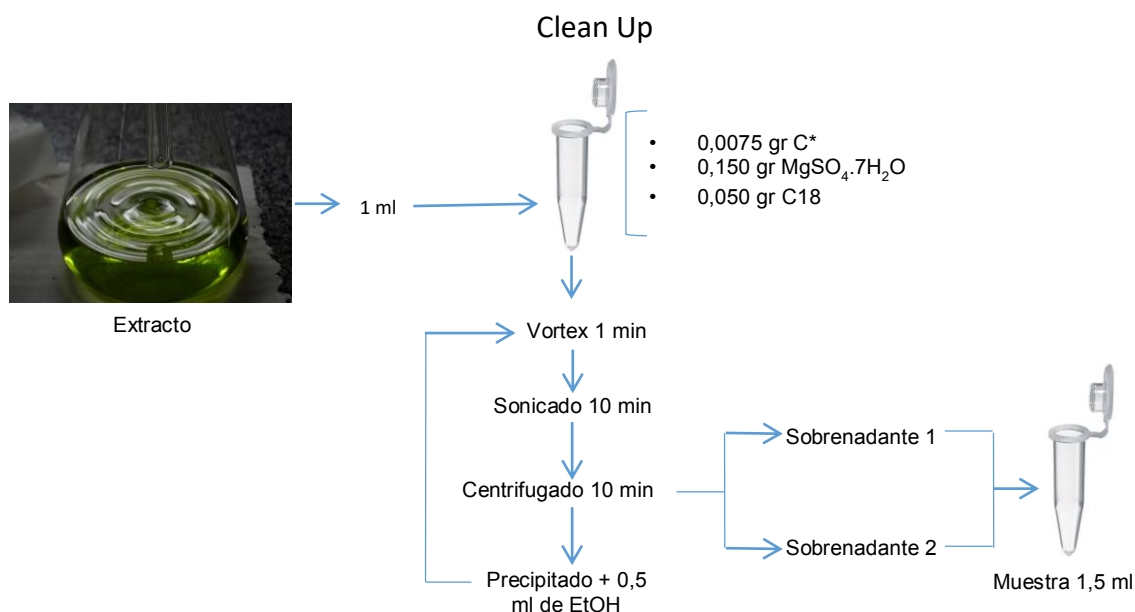


Figura 5. Protocolo de limpieza de matriz de los extractos obtenidos a partir de los materiales vegetales, resinas y aceites.

6.3. Determinación analítica de cannabinoides por HPLC/UV-DAD.

Para la determinación analítica de cannabinoides por HPLC se utilizó un equipo Shimadzu que está compuesto por una unidad de cromatografía líquida LC-20A, una unidad de desgasificación DGU-20A5, una bomba binaria y un detector UV con arreglo de diodos (UV-DAD) que permitió el registro del espectro completo en el rango de 190-500 nm.

Se empleó la técnica descrita por De Backer *et al.* (2009) con pequeñas modificaciones. La columna utilizada fue una columna BDS Hypersil C18 (Macherey-Nagel®, 150x4.6). La fase móvil consistió en metanol y una solución acuosa de acetato de amonio 25 mM, en gradiente. La condición inicial fue de 75 % de metanol (v/v) que se aumentó linealmente hasta 95% durante 15 minutos, condición que se mantuvo durante 2 minutos, y después se volvió a 75 % de metanol en 3 minutos para finalmente equilibrar en condiciones iniciales durante 5 minutos, lo cual resultó un tiempo de corrida total de 25 minutos. La velocidad de flujo se estableció en 1 ml/min, el volumen de inyección fue de 20 µl y la longitud de onda de detección fue de 205 nm. Para la identificación y cuantificación de los mismos se emplearon estándares analíticos de CBD, CBN y THC (Cerilliant Corporation®) y estándares secundarios de THC-A y CBD-A purificados en nuestro laboratorio.

Mediante esta técnica es posible diferenciar entre los cannabinoides ácidos CBDA, THCA y neutros CBD, CBN y THC; ya que no requiere altas temperaturas como en el caso de la cromatografía gaseosa. De esta forma se determinaron las concentraciones de los cannabinoides, empleando curvas de calibración con 9 niveles de concentración (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 80 y 100 µg/ml), en los extractos obtenidos realizando diluciones adecuadas en etanol para cada tipo de muestra (hojas y tallo D 1/2, aceites D 1/10, inflorescencias D 1/20, resinas D 1/100, y semillas y raíces sin diluir).

En base a los resultados de las concentraciones de los cannabinoides obtenidos se establecieron relaciones y variables derivadas según los siguientes cálculos:

$$\text{Cannabinoides Totales} = [\text{CBD A}] + [\text{THC A}] + [\text{CBD}] + [\text{CBN}] + [\text{THC}]$$

$$\text{THC Total} = ([\text{THC A}] * 0,877) + [\text{THC}]$$

$$\text{CBD Total} = ([\text{CBD A}] * 0,877) + [\text{CBD}]$$

$$\text{Relación THC A/THC} = [\text{THC A}] / [\text{THC}]$$

$$\text{Relación CBD A/CBD} = [\text{CBD A}] / [\text{CBD}]$$

$$\text{Relación THC/CBD} = [\text{THC Total}] / [\text{CBD Total}]$$

$$\text{Relación ácidos/neutros} = ([\text{CBD A}] + [\text{THC A}]) / ([\text{CBD}] + [\text{THC}])$$

Debido a la convertibilidad de THCA, la dosis total de THC se calcula como la suma de la cantidad de THCA multiplicada por un factor de corrección 0,877 más la cantidad de THC. Se utiliza el mismo criterio y factor para el CBD según la Farmacopea Herbal Americana (2014). La relación entre el contenido de THC y CBD totales es un parámetro muy utilizado en la fitoterapia con Cannabis y es un importante descriptor de una variedad, medicamento o producto herbario a base de cannabis.

El método analítico fue validado, empleando estándares analíticos de CBD, CBN y THC (Cerilliant Corporation®), siguiendo los criterios descritos a continuación:

Curvas de calibración y linealidad

Se prepararon soluciones a 9 niveles de concentración (100, 80, 50, 25, 10, 5, 2,5, 1 y 0,5 µg/ml) a partir de la solución estándar mixta de 1000 µg/ml de CBD, CBN y THC para construir curvas de calibración. La linealidad se confirmó mediante la determinación del coeficiente de correlación lineal (r^2).

Precisión

La precisión se determinó mediante la evaluación de la repetibilidad intradía e interdía. El ensayo intradía se estimó mediante el análisis por sextuplicado de un nivel de concentración (5 µg/ml) perteneciente a la curva para los 3 cannabinoides en el mismo día, con el mismo analista y el mismo equipo (N=6). Mientras que la validación interdía se estimó mediante el análisis por triplicado del mismo nivel de concentración (5 µg/ml) en tres días diferentes con el mismo analista y el mismo equipo (N=9). Se evaluaron por el coeficiente de variación (CV) (Ecuación. 1).

Ecuación 1: Cálculo del *Coefficiente de Variación (CV)*.

$$CV = \left(\frac{Sx}{\bar{x}} \right) \times 100$$

Dónde: *CV*, *coeficiente de variación*; *Sx*, *desviación estándar*; \bar{x} , *valor promedio*.

Exactitud

Para determinar la exactitud del método se prepararon soluciones por fuera de la curva de calibración a 3 niveles: 4, 40 y 90 µg/ml, conteniendo CBD, CBN y THC, analizándose por triplicado en un mismo día. Este parámetro se evaluó por medio del Cálculo de la recuperación (Ecuación. 2).

Ecuación 2: Cálculo de la *Recuperación (R)*.

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} \times 100$$

Dónde: *R*, *Recuperación*; \bar{x} , *valor promedio*; \hat{x} , *valor verdadero*.

Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Para determinar el LOD y LOQ se prepararon curvas de calibración a bajas concentraciones (0,25, 0,5, 1 y 2,5 µg/ml). Los límites de detección (Ecuación 3) y

cuantificación (Ecuación 4) se calcularon mediante los resultados obtenidos para la linealidad y los resultados de la curva de calibración a bajas concentraciones.

Ecuación 3: Calculo del *Límite de Detección (LOD)*

$$LOD = \frac{|a| + 3S_a}{b \times \sqrt{n}}$$

Ecuación 4: Calculo del *Límite de Cuantificación (LOQ)*.

$$LOQ = \frac{|a| + 10S_a}{b \times \sqrt{n}}$$

Dónde: S_a = desviación estándar del intercepto a bajas concentraciones, a = intercepto a bajas concentraciones y b = pendiente de la curva de calibración a altas concentraciones, n = niveles a los que se construyó la curva de calibración a bajas concentraciones.

7. Purificación de cannabinoides.

Se empleó el material entregado por el Juzgado Federal de Primera Instancia en lo Criminal y Correccional N° 2 de Lomas de Zamora, Secretaría N° 6, descrito en el apartado 1.2 de Materiales y Métodos, en la purificación de cannabinoides. El peso del material de partida fue de 508 gr de presando de *Cannabis sp.*, que fue triturado con tijera y puesto en contacto con 1,5 litros de Etanol 96° (Purocol®). Posteriormente se colocó en heladera durante una semana para favorecer la extracción, obteniendo finalmente 1 litro de extracto luego del filtrado en gasa estéril.

El extracto resultante (E0) se eluyó por una columna plástica con 10 gr de Carbón activo en su interior, con el fin de eliminar impurezas, recolectándose en dos fracciones diferentes (E1 y E2). De ambas eluciones se tomaron muestras para su cuantificación por HPLC/UV-DAD según la metodología descrita en el apartado 6.3 de *Materiales y Métodos*. A partir de esa determinación se seleccionó la fracción más concentrada en cannabinoides, la cual fue empleada para la purificación de los mismos.

Para la purificación se empleó el mismo fundamento y equipo que el descrito anteriormente para la determinación analítica de cannabinoides, pero con escalado a técnica semipreparativa que deriva de un trabajo llevado a cabo por el laboratorio de Toxicología sobre microcistina. (Andrinolo et al., 2008).

La separación cromatográfica se consiguió mediante una columna Hyperprep C18 (Thermo®, 250X4,6). La fase móvil consistió en metanol y una solución de acetato de amonio 25 mM, en gradiente. La condición inicial fue de 75 % metanol (v/v) que se aumentó linealmente hasta 95% durante 30 minutos. Después de mantener esta condición durante 2 minutos, la columna volvió a 75% de metanol en 5 minutos y finalmente se equilibró a condiciones iniciales durante 3 minutos, por lo tanto, el tiempo de corrida total fue de 40 minutos.

La velocidad de flujo se estableció en 3 ml/min y el volumen de inyección fue de 10 µl. Los picos se recolectaron en diferentes fracciones siguiendo la señal a 205 nm y teniendo en cuenta los tiempos de retención y espectros de absorción UV para los cannabinoides a purificar. Estas fracciones recolectadas fueron analizadas según la técnica analítica para confirmar la identidad y cantidad de los cannabinoides purificados. Para definir el grado de pureza obtenido, se analizaron las fracciones por HPLC/MS-MS (sin columna) modelo Alliance 2695 acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolos en tándem Quattro Premier XE (ambos marca Waters®) con Argón como gas de colisión y con fuente de ionización de electrospray en modo negativo y positivo. Las identificaciones de posibles iones precursores se exploraron en modo de trabajo SCAN (tanto positivo como negativo).

8. Análisis estadístico.

Las muestras se analizaron individualmente por triplicado y los resultados se informaron como la media \pm SD. Los datos fueron analizados en base al test ANOVA mediante el programa Origin (Versión 8.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Capítulo 1

**Cepas Argentinas Terapéuticas CAT1, CAT2 y CAT3.
Características generales y aplicaciones.**



Capítulo 1: Cepas Argentinas Terapéuticas CAT1, CAT2 y CAT3. Características generales y aplicaciones.

En este capítulo presentaremos los resultados obtenidos a partir de la evaluación inicial de las Cepas Argentinas Terapéuticas cultivadas en el Cultivo de Cannabis Universitario del CIM-CONICET/UNLP. Así mismo presentaremos una aplicación de las mismas como insumo básico en un proyecto de investigación en epilepsia refractaria en caninos con el cual colaboramos.

1. Validación del Método de Determinación de Cannabinoides por HPLC/UV-DAD.

Como paso inicial de la tesina realizamos la validación de la técnica analítica seleccionada para la determinación de cannabinoides por HPLC/UV-DAD. Para ello empleamos estándares analíticos de CBD, CBN y THC (Cerilliant Corporation®).

En la *Figura 1.1* se muestra un cromatograma representativo de una corrida cromatográfica de los estándares empleados. En el cromatograma correspondiente al mix de cannabinoides de 100 µg/ml podemos observar que los distintos cannabinoides presentan diferentes tiempos de retención, siendo de 12,16 min para CBD, 15,82 min CBN y 17,03 min para THC. Así mismo, observamos que los espectros de absorción de cada uno de ellos presentan características particulares. Estos dos criterios, tiempo de retención y espectro de absorción UV, nos permiten realizar la identificación de cannabinoides presentes en las muestras por comparación con los de los estándares.

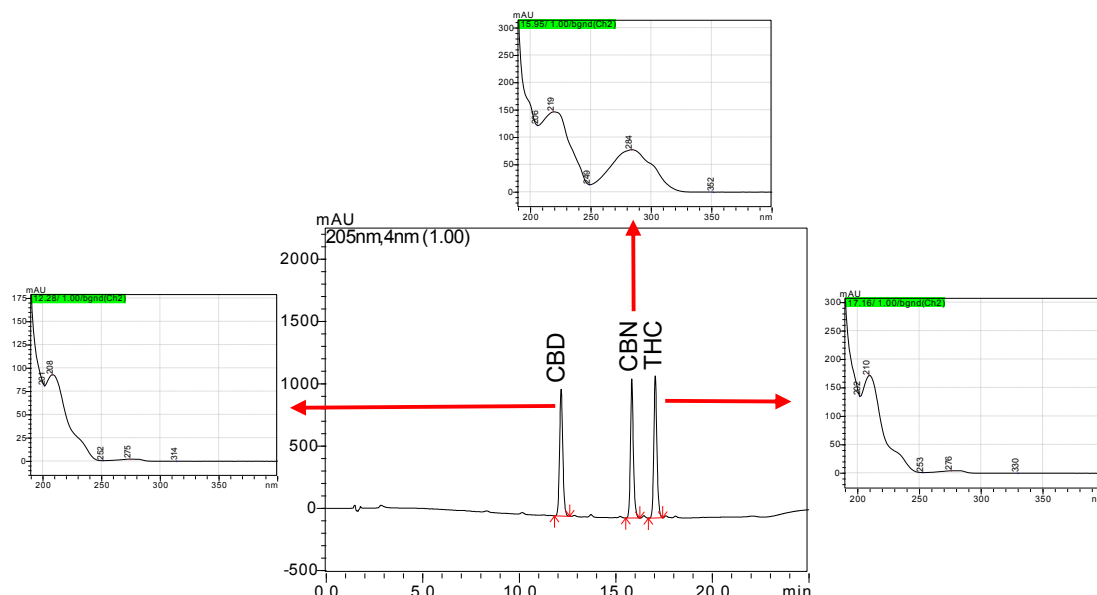


Figura 1.1. Cromatograma correspondiente a un mix de 100 µg/ml de CBD, CBN y THC y sus respectivos espectros de absorción a 205 nm.

El estudio de linealidad presentó coeficientes de correlación lineal (r^2) para todos los cannabinoides mayores a 0,99; siendo 0,9984 en el caso de CBD, 0,9977 para CBN y 0,9989 para THC. En la *Figura 2.1* se muestran las curvas de calibración de CBD, CBN y THC junto a los valores de los parámetros que caracterizan la curva de calibración, obtenidos por el método de regresión lineal: ordenada al origen (a) y pendiente (b).

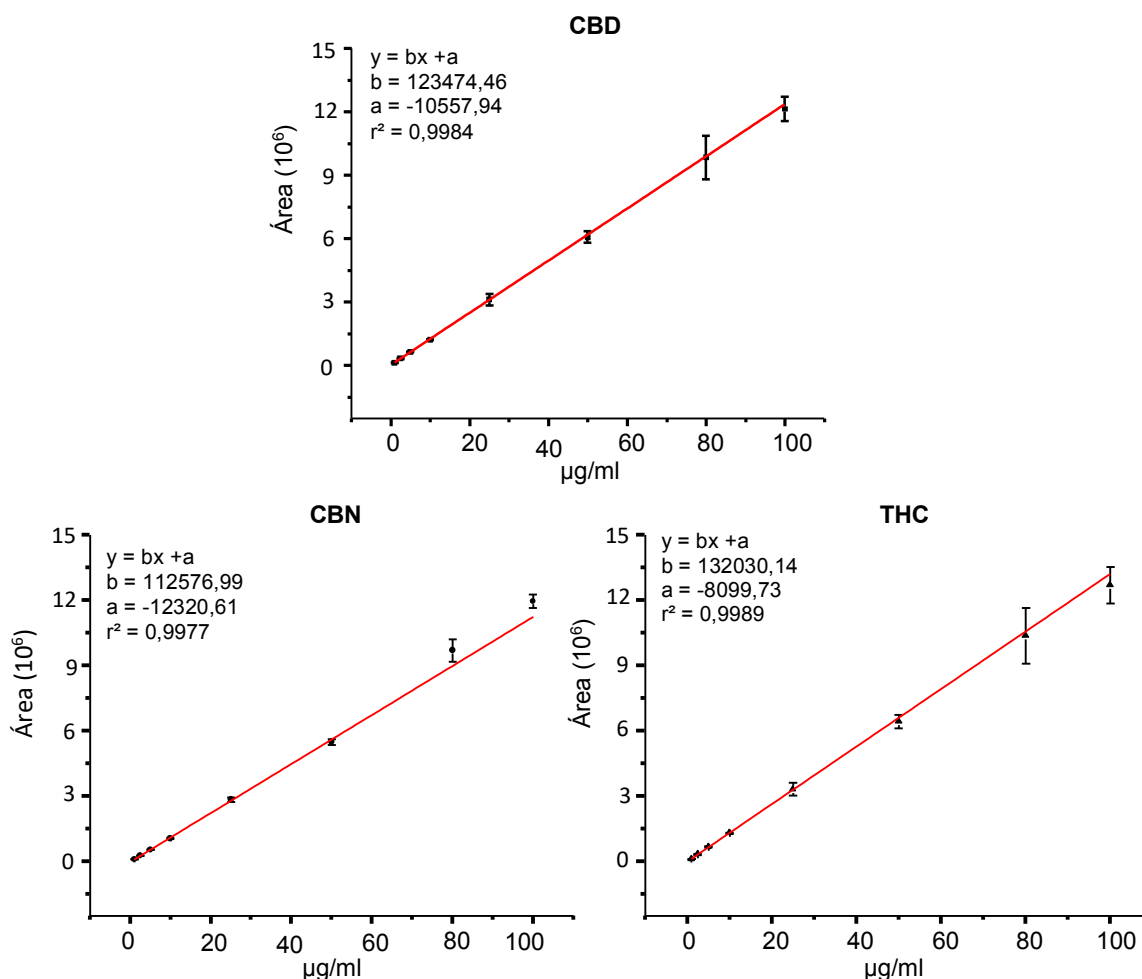


Figura 2.1: Curvas de calibración construidas a 9 niveles (0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 80, 100 µg/ml) para la determinación de CBD, CBN y THC.

Mediante el ensayo de precisión, se determinó que los coeficientes de variación (CV) de los cannabinoides para la validación intradía fueron de: 0,28% CBD, 0,85% CBN y 0,50% para THC. Mientras que los valores para el ensayo interdía fueron de: 1,50%, 1,46% y 1,63%. Nuestros resultados, tanto interdía como intradía, cumplen con el criterio de aceptación del CV siendo $\leq 2\%$. (Hortwitz, 1982).

La exactitud fue evaluada por medio de ensayos de recuperación. En la *Tabla 1.1* se muestran los resultados obtenidos donde se observa el valor promedio y la desviación estándar de CBD, CBN y THC a 3 niveles de concentración (4, 40, 90 µg/ml).

Compuestos	4 µg/ml		40 µg/ml		90 µg/ml	
	\bar{x}	<i>SD</i>	\bar{x}	<i>SD</i>	\bar{x}	<i>SD</i>
CBD	4,01	0,04	39,31	0,88	90,47	0,78
CBN	4,06	0,13	40,76	0,02	89,92	0,60
THC	4,12	0,13	40,05	0,87	89,84	0,37

Tabla 1.1. Exactitud del método por ensayo de recuperación. Concentración de cannabinoides en µg/ml a 3 niveles (4, 40 y 90) expresado como media y su desviación estándar (N=3). En negrita aparece la mayor desviación estándar para cada cannabinoide.

El criterio de aceptación para este parámetro según la ICH (1995), es que el porcentaje de recuperación debe caer dentro del intervalo correspondiente al $100\% \pm 4Sx$, donde *Sx* es la mayor desviación estándar obtenida. En la *Tabla 2.1* se muestran los porcentajes de recuperación de cada cannabinoide y el valor de 4 veces su desvío estándar.

Compuestos	4 µg/ml		40 µg/ml		90 µg/ml	
	% <i>R</i>	4 <i>SD</i>	% <i>R</i>	4 <i>SD</i>	% <i>R</i>	4 <i>SD</i>
CBD	100,1	0,16	98,3	3,52	100,5	3,12
CBN	101,5	0,52	101,9	0,08	99,9	2,4
THC	102,9	0,52	100,1	3,84	99,82	1,48

Tabla 2.1. Exactitud del método por ensayo de recuperación. Porcentaje de recuperación de CBD, CBN y THC a 3 niveles (4, 40, 90 µg/ml) y el valor de 4 veces su desvío estándar. En negrita aparece el valor mayor de 4 veces la desviación estándar para cada cannabinoide.

Como resultado el rango de porcentajes de los cannabinoides fue de: CBD entre 96,5 y 103,5; CBN entre 97,4 y 102,6; THC entre 96,5 y 103,5. Observamos entonces que todos los porcentajes de recuperación entraron en el rango aceptable.

Para determinar los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) hemos realizado curvas de calibración construidas a bajas concentraciones para CBD, CBN y THC. En la *Figura 3.1* se muestran los resultados obtenidos para los coeficientes de correlación lineal (r^2), las ordenadas al origen (*a*), las pendientes (*b*) y los desvíos estándares del intercepto (*Sa*) de las curvas de calibración realizadas para cada uno de los cannabinoides CBD, CBN y THC a bajas concentraciones.

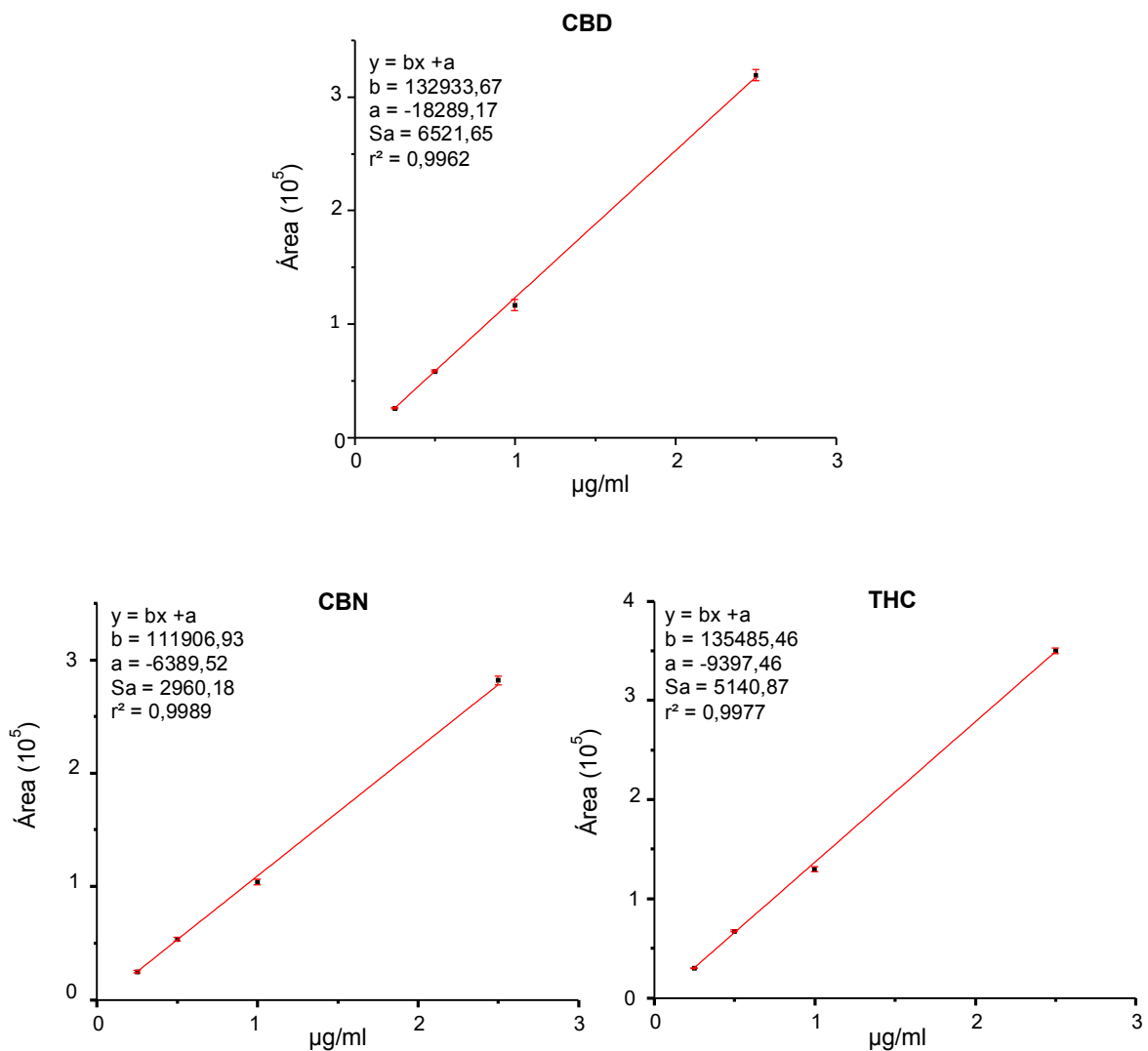


Figura 3.1: Curvas de calibración a bajas concentraciones (0,25, 0,5, 1 y 2,5 µg/ml) de CBD, CBN y THC.

Empleando los parámetros obtenidos experimentalmente y los cálculos descritos en *Materiales y Métodos*, obtuvimos los siguientes límites de detección (LOD): 0,2 µg/ml para el CBD, 0,1 µg/ml CBN y 0,1 µg/ml THC; mientras que los límites de cuantificación (LOQ) fueron de: 0,3 µg/ml para el CBD, 0,2 µg/ml CBN y 0,2 THC µg/ml.

A partir de estos resultados pudimos concluir entonces que la metodología empleada cumple con los criterios de precisión, exactitud y linealidad en el rango de concentraciones empleados en este trabajo (0,5 a 100 µg/ml), con los límites de detección y cuantificación informados para cada cannabinoide.

2. Características generales de las Cepas Argentinas Terapéuticas CAT1, 2 y 3. Determinaciones de parámetros básicos en los primeros ciclos de cultivo indoor.

Las variedades CAT1 y 2 pertenecen al Club de Cultivo y Asociación Cultural Jardín del Unicornio. Estas variedades al momento de recibirlas venían siendo cultivadas en interior durante más de 7 años por lo que estaban adaptadas a estas condiciones, mientras que de la variedad CAT3 se recibieron esquejes de un cultivo de exterior necesitando un tiempo para adaptarse a condiciones indoor.

A continuación, se comentan las observaciones y los resultados obtenidos sobre 10 ejemplares de cada variedad que fueron cultivados en 5 ciclos de cultivo diferentes.

En la *Figura 4.1 A*, se muestra un ejemplar de CAT 1 en crecimiento vegetativo. Podemos ver que se trata de una variedad de tamaño pequeño y de corto espacio internodal. Su velocidad de crecimiento fue de $0,9 \pm 0,3$ cm/día alcanzando una altura promedio de $54,2 \pm 9,6$ cm y sus hojas presentaron entre 3-5 folíolos largos y anchos (*Figura 4.1 J*). Las plantas femeninas de esta variedad producen inflorescencias pequeñas, pero muy densas y compactas, con un alto contenido de tricomas. El tiempo de floración para alcanzar la madurez fue de 8 semanas (*Figuras 4.1 D y G*). Esta variedad fue seleccionada por su alto contenido de CBD en relación a THC.

La variedad CAT 2 se seleccionó por ser alta en THC. Una vez puesta en cultivo pudimos observar que se trata de una variedad de gran tamaño (*Figura 4.1 B*), con una extensa floración de 10 semanas. Presenta gran velocidad de crecimiento ($1,8 \pm 0,5$ cm/día) y abundante ramificación, desarrollando un gran estiramiento en las primeras semanas de su puesta en fotoperiodo de floración, alcanzando una altura promedio de $98,2 \pm 5,4$ cm. Producen inflorescencias de forma cónica, sólidas y voluminosas con gran contenido de tricomas (*Figuras 4.1 E y H*). Como se muestra en la *Figura 4.1 J* sus hojas están formadas por 3-5 folíolos más cortos y anchos que los de la variedad CAT 1.

Al igual que la variedad CAT 2, CAT 3 se trata de una variedad con un alto contenido de THC dando ejemplares de gran porte, tamaño y ramificación con una alta velocidad de crecimiento ($2,1 \pm 0,4$ cm/día) alcanzando una altura promedio de $108 \pm 11,2$ cm (*Figura 4.1 C*). Sus inflorescencias son muy grandes, pero poco compactas. Su maduración se alcanza pasando las 10 semanas bajo el fotoperiodo de floración (*Figuras 4.1 F e I*). Como se ve en la *Figura 4.1 J* sus hojas están compuestas por 5-7 folíolos más finos y largos que los de las variedades CAT 1 y CAT 2.

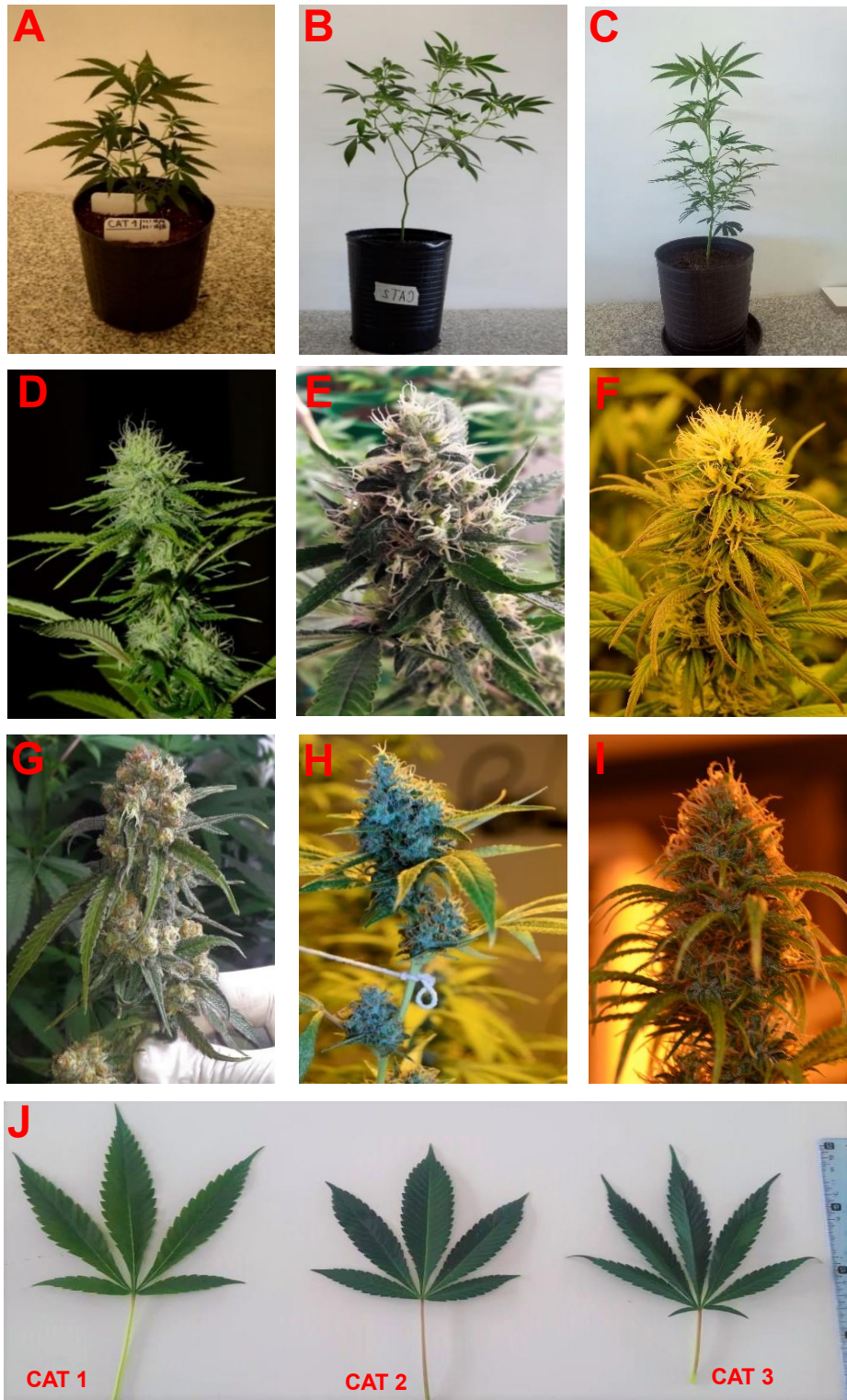


Figura 4.1. Fotos representativas de las características de CAT1, CAT2 y CAT3. Las imágenes A, B y C se corresponden a ejemplares de CAT 1, 2 y 3 en periodo vegetativo, respectivamente. En las imágenes D, E y F se observan inflorescencias inmaduras de las 3 variedades mientras que en las imágenes G, H e I se pueden apreciar las inflorescencias maduras. En la imagen J se pueden observar hojas de las 3 variedades. Nótese las diferencias en el color, longitud, anchura y cantidad de folíolos.

En la *Tabla 3.1* se muestran los parámetros determinados donde se observa que la variedad con más producción de biomasa de inflorescencias (gr peso seco/planta) fue la CAT 2 ($27,46 \pm 5,17$ gr/planta), seguida por la CAT 1 ($21,23 \pm 3,62$ gr/planta) y por último la CAT 3 ($16,03 \pm 2,78$ gr/planta). En cuanto a la velocidad de crecimiento la variedad CAT 3 resultó ser la de mayor velocidad ($2,1 \pm 0,4$ cm/día), seguida por la variedad 2 ($1,8 \pm 0,5$ cm/día) y finalmente la 1 ($0,9 \pm 0,3$).

Parámetros	CAT 1	CAT 2	CAT 3
Biomasa seca por planta (gr)	21,23 ± 3,62	*27,46 ± 5,17	16,03 ± 2,78
Velocidad de crecimiento (cm/día)	0,9 ± 0,3	1,8 ± 0,5	*2,1 ± 0,4
Altura media (cm)	54,2 ± 9,6	98,21 ± 5,4	*108 ± 11,2
Cantidad de folíolos	3-5	3-5	5-7
Tiempo de floración (semanas)	8	10	10

Tabla 3.1. *Parámetros preliminares de las Cepas Argentinas Terapéuticas N° 1, 2 y 3. Los valores de biomasa seca por planta, velocidad de crecimiento y altura media se expresan como la media ± SD (N=10). (*) indica diferencias significativamente mayores a las demás variedades, ANOVA (p<0,05).*

En cuanto al tiempo de floración, éste es un parámetro definido comúnmente por el tipo de efecto que se busque en la terapéutica, basándose en la maduración de los tricomas presentes en las inflorescencias. En nuestro caso se tomó como criterio para la finalización del período de floración el momento en que los tricomas comenzaron a cambiar su coloración de transparentes/blanquecinos a ámbar.

De esta forma las variedades CAT2 y CAT3 presentaron un período de floración más largo, con un tiempo de 10 semanas (70 días) mientras que los ejemplares de CAT 1 fueron cosechados cumplidas las 8 semanas (56 días).

En la *Tabla 4.1* se presentan las concentraciones de CBDA, THCA, CBD y THC en mg/gr obtenidas mediante el análisis sobre inflorescencias secas, donde podemos observar que en las variedades CAT2 y 3 predomina el THCA, mientras que en la CAT1 el predominante es el CBDA.

Según nuestros resultados la variedad que presentó una mayor producción fue la CAT2 con un 20 % de cannabinoides totales por gramo de inflorescencia seguida por la CAT1 con un 11% y por último CAT3 con un 5%. En la *Tabla 4.1* se presentan los valores de CBD total, THC total y la relación THC/CBD de cada variedad.

Compuestos	CAT 1	CAT 2	CAT 3
CBDA	64,78 ± 5,22	4,8 ± 1,96	1,35 ± 0,20
THCA	32,51 ± 2,14	178,32 ± 15,61	38,17 ± 5,62
CBD	5,58 ± 1,98	1,94 ± 0,14	0,78 ± 0,31
THC	9,26 ± 1,54	13,38 ± 6,52	10,55 ± 5,28
Totales	112,13 ± 15,39	198,44 ± 37,09	50,85 ± 16,14
THC total	37,77 ± 4,83	169,77 ± 28,58	44,03 ± 14,44
CBD total	62,39 ± 9,27	6,15 ± 2,63	1,96 ± 0,69
THC/CBD	0,61 ± 0,01 (1:2)	27,61 ± 5,87 (28:1)	22,42 ± 0,52 (22:1)

Tabla 4.1. Concentraciones preliminares de CBDA, THCA, CBD, THC y totales en mg/gr de inflorescencias de las Cepas Argentinas Terapéuticas 1, 2 y 3. (Media ± SD) (N=10). Se expresan también los contenidos totales de THC y CBD, y la relación entre ambos (THC/CBD) (Media ± SD).

Debido a las diferentes proporciones entre CBD y THC que presenta cada variedad sus relaciones THC/CBD resultan diferentes. Así dado que la variedad CAT 1 presenta una mayor cantidad de CBD que de THC, su relación THC/CBD resulta menor que 1. Mientras que en los casos de las variedades CAT 2 y 3, la relación THC/CBD es mayor que 1 debido a la predominancia de THC que presentan.

Es de resaltar que en todas las variedades los cannabinoides producidos se presentan mayormente en sus formas ácidas, característica distintiva de la producción de cannabinoides en las plantas. Esta presencia mayoritaria de cannabinoides en sus formas ácidas tiene implicancias en cuanto a los tipos de aceites o derivados a base de Cannabis que se puedan obtener de las mismas, de acuerdo a si fueron preparados con inflorescencias que no se sometieron a altas temperaturas o si, por el contrario, fueron descarboxiladas previamente. Especialmente en el caso del THC es necesario tener en cuenta esta situación, dado que el THCA no presenta efectos psicoactivos por no atravesar la barrera hematoencefálica.

Sin embargo, para definir la relación THC/CBD de una variedad es necesario analizar una mayor cantidad de plantas cultivadas en un mismo ciclo, por lo tanto, estos valores sientan las bases y se constituyen en puntos de referencia para próximos estudios.

Con el fin de avanzar en nuestros estudios preliminares sobre estas Cepas Argentinas Terapéuticas que mantenemos en cultivo en el Cultivo de Cannabis Universitario del CIM-CONICET/UNLP, evaluamos también la capacidad de producir resinas

caracterizadas en cuanto al contenido de cannabinoides, a partir de las inflorescencias cosechadas.

En este sentido trabajamos con inflorescencias descarboxiladas según lo indicado en *Materiales y Métodos*. Como primer paso realizamos un control de descarboxilación en las condiciones empleadas (145 °C, 7 min), utilizando 9 g de inflorescencias de CAT 1 secadas a baja temperatura, triturados y divididos en dos sub-muestras de 4,5 gr. Una sub-muestra fue sometida al tratamiento térmico, quedando una masa final de 3,7 gr, y la otra sub-muestra fue procesada sin ningún tratamiento adicional.

Nuestros resultados indicaron que el tratamiento seleccionado efectivamente descarboxiló de manera cuantitativa los cannabinoides ácidos (THCA y CBDA). En la *Figura 5.1* se muestran los cromatogramas obtenidos para el análisis de las muestras sometidas al tratamiento térmico y no sometidas al mismo, observándose la detección de picos correspondientes a THCA y CBDA en las muestras que no sufrieron calentamiento (*Figura 5.1 A*) y la ausencia de los mismos en el cromatograma proveniente de las muestras que fueron tratadas térmicamente (*Figura 5.1 B*).

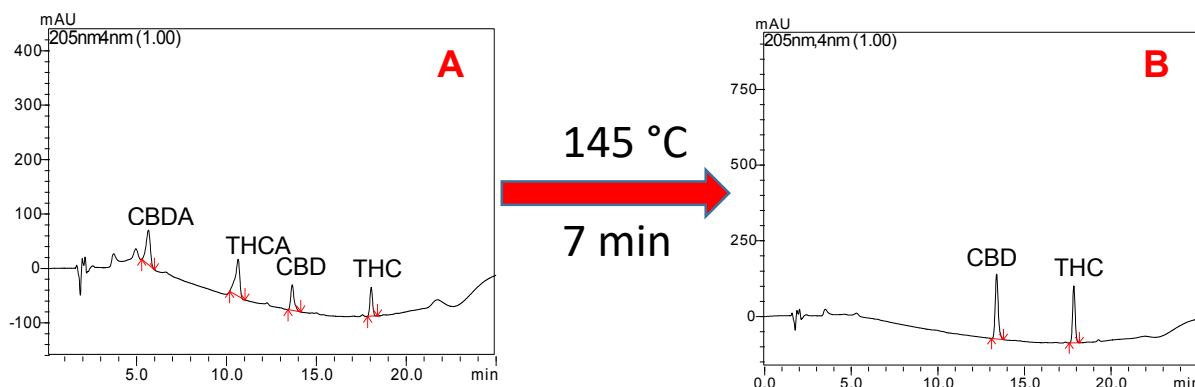


Figura 5.1. Cromatogramas correspondientes a los extractos derivados de las inflorescencias sin calentar (A) y de las inflorescencias calentadas a 145°C durante 7 min (B).

Así mismo, la descarboxilación se realizó de manera cuantitativa ya que los valores de cannabinoides totales no difieren significativamente entre ambas muestras (*Tabla 5.1*) y tampoco se observó en la muestra sometida al tratamiento térmico la presencia de otros cannabinoides, como el CBN que se asocia con alguna forma de degradación de la muestra por excesivo tiempo de almacenamiento o temperaturas, registrándose sólo la presencia de CBD y THC. Por otra parte, esta variedad como vimos en la sección anterior, presenta una relación de cannabinoides totales THC: CBD de 1:2.

Al realizar los cálculos de CBD total y THC total y su relación en ambos tratamientos (*Tabla 5.1*) se puede apreciar que la relación se mantuvo luego del tratamiento a altas temperaturas y que no hubo pérdidas de cannabinoides manteniéndose la relación.

Compuestos	T° ambiente	145°C
CBDA	29,85 ± 3,26	ND
THCA	13,92 ± 0,17	ND
CBD	0,24 ± 0,06	32,65 ± 2,47
THC	1,26 ± 0,08	15,67 ± 0,95
Totales	45,27 ± 5,05	48,32 ± 4,84
THC total	13,47 ± 0,32	15,67 ± 1,34
CBD total	26,42 ± 4,13	32,65 ± 3,49
THC/CBD	0,51 ± 0,07 (1:2)	0,48 ± 0,01 (1:2)

Tabla 5.1. Concentración de cannabinoides en inflorescencias expuestas a 145°C durante 7 minutos y tratadas a T° ambiente. Los resultados se expresan en mg/gr de inflorescencia (Media±SD).

Para la obtención de las resinas se siguió el proceso esquematizado en la *Figura 6.1*. Inicialmente las inflorescencias descarboxiladas presentan tricomas glandulares globosos (*Figura 6.1 A y B*) que al microscopio se observan con un cuello y una cabeza donde se acumulan los cannabinoides que la planta sintetiza. Luego del contacto de las inflorescencias con el etanol empleado como solvente de extracción de los cannabinoides, los tricomas se rompen (*Figura 6.1 C*) liberando los cannabinoides al medio; los cuales de acuerdo a sus características hidrofóbicas quedan solubilizados en el etanol haciendo posible su extracción. Los extractos alcohólicos de las variedades estudiadas (*Figura 6.1 D*) fueron evaporados a baja temperatura para obtener las resinas a caracterizar y luego las mismas fueron diluidas en aceite para su posterior envasado en goteros estériles (*Figura 6.1 E*).

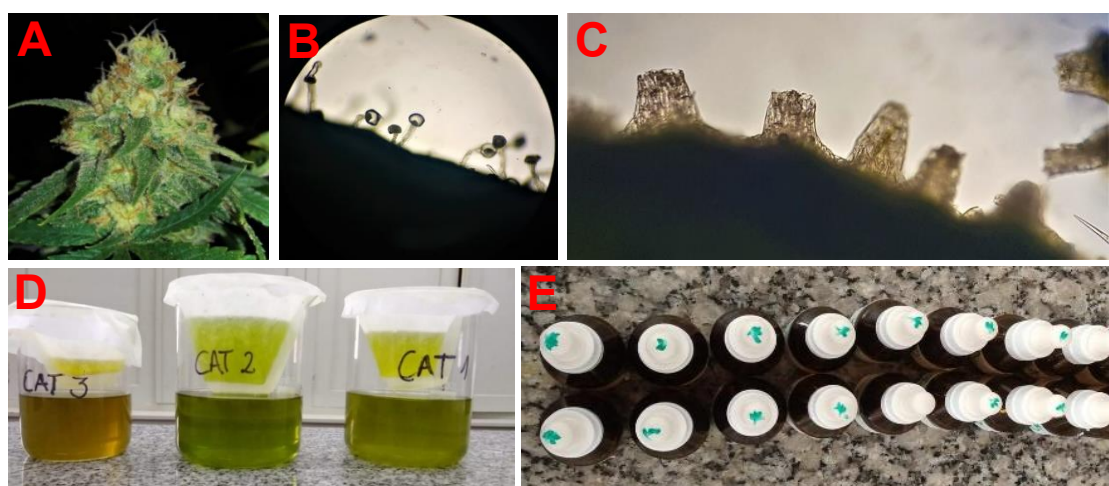


Figura 6.1. Imágenes representativas de: una inflorescencia apical de CAT1 con gran contenido de tricomas (A), de tricomas antes (B) y después de la extracción (C) vistos al MO (40x;100x), de extractos de las 3 variedades (D) y de aceites envasados en goteros (F).

Las resinas resultantes de ese proceso fueron pesadas y seguidamente se procedió al cálculo del porcentaje de rendimiento de cada variedad, obteniendo los siguientes valores: CAT 1: $14,97 \pm 2,17$ %, CAT 2: $22,28 \pm 3,19$ % y CAT 3: $15,32 \pm 1,97$ %. El porcentaje de rendimiento resultó significativamente mayor en la variedad CAT 2 respecto a CAT 3 y CAT 1 ($p < 0,05$).

En la *Figura 7.1* se muestran los cromatogramas y los gráficos de la cuantificación de los perfiles de cannabinoides obtenidos de los análisis por HPLC/UV-DAD de las resinas generadas a partir de las 3 variedades analizadas.

Se observa claramente que el perfil de CAT 1 se corresponde con un perfil alto en CBD, con un contenido del mismo de $527,38 \pm 18,31$ mg/gr que representa un 61,8 % del total de cannabinoides analizados; mientras que el contenido de THC y CBN alcanzan valores de $314,38 \pm 18,54$ mg/gr y $11,66 \pm 1,61$ mg/gr respectivamente, constituyendo un 36,8% para THC y un 1,4 % para CBN respecto del total de cannabinoides en la muestra.

En los casos de las variedades CAT 2 y CAT 3, vemos que los perfiles son similares entre sí donde el THC predomina en ambos con una concentración de $789,08 \pm 21,82$ mg/gr (95,1% respecto del total) en la variedad CAT 2 y de $779,32 \pm 27,32$ mg/gr (94,6 % respecto de cannabinoides totales) para CAT 3. En estas variedades el contenido de CBD fue de $28,15 \pm 2,30$ mg/gr en el caso de CAT 2 y de $31,94 \pm 3,65$ mg/gr para CAT 3, representando un 3,4% y 3,9 % de los cannabinoides totales de cada variedad respectivamente. El contenido de CBN en CAT 2 y CAT 3 fue de $12,16 \pm 3,21$ mg/gr y $12,59 \pm 2,78$ mg/gr respectivamente, lo cual significó un 1,5 % respecto de los cannabinoides totales en ambos casos.

En los tres casos el contenido de cannabinoides totales representa más del 82% (CAT1 85%, CAT2 83% y CAT3 82%), indicando que la mayor proporción de la resina está constituida por los cannabinoides estudiados.

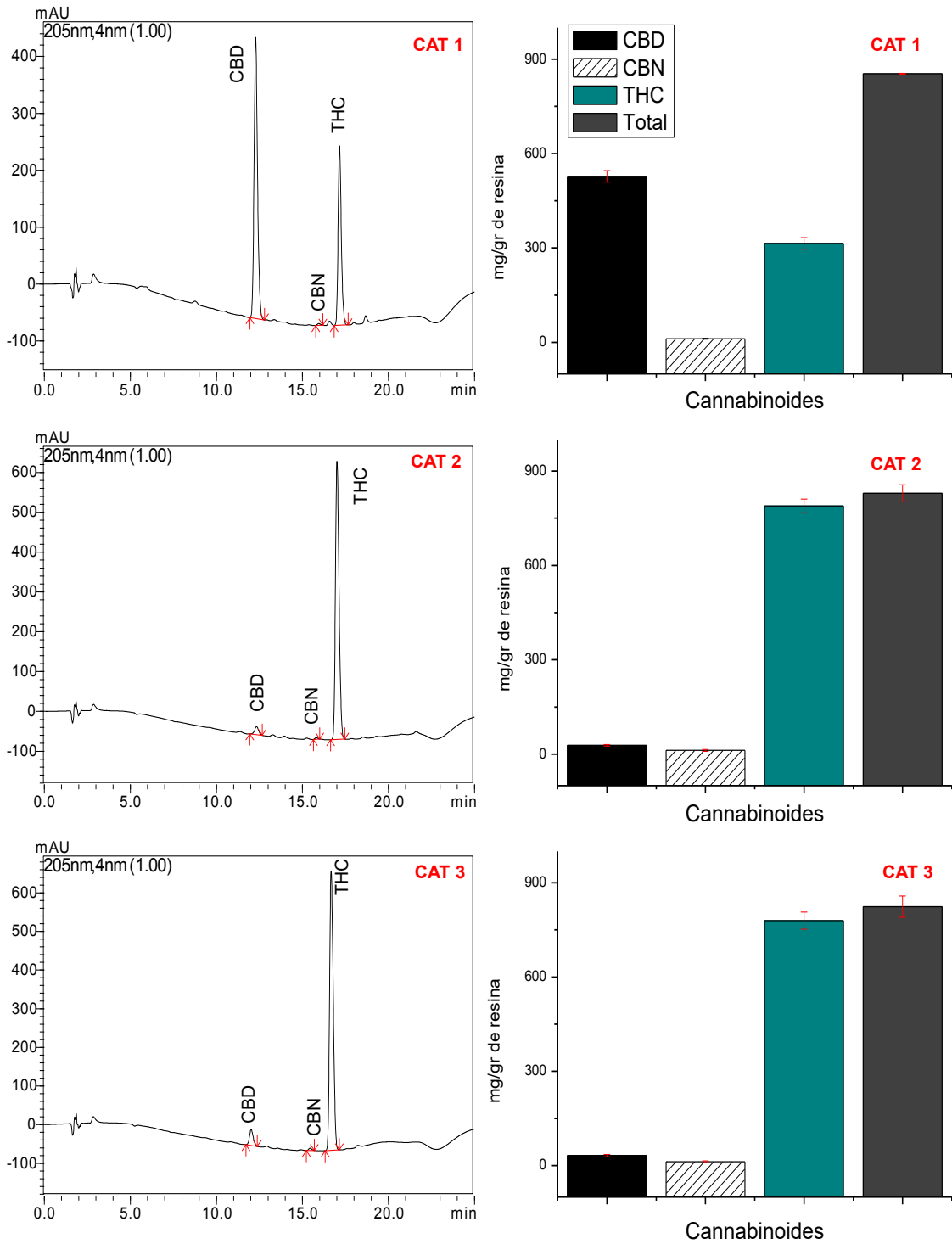


Figura 7.1. Cromatogramas y representación del perfil cannabinoide de las resinas derivadas de inflorescencias descarboxiladas de CAT1, 2 y 3. Los cromatogramas se corresponden a diluciones de 1/100 de los extractos generados a partir de las resinas.

En la *Tabla 6.1.* se muestran los valores calculados para la relación THC/CBD de las resinas, y se los compara con los obtenidos en las inflorescencias. Se observa que no existieron diferencias significativas entre estas relaciones, demostrando que no hay cambios de este parámetro durante el proceso de preparación de las resinas ($p < 0,05$).

Variedades	Inflorescencias	Resinas
CAT 1	0,61 ± 0,01 (1:2)	0,60 ± 0,06 (1:2)
CAT 2	27,61 ± 5,87 (28:1)	28,03 ± 1,52 (28:1)
CAT 3	22,42 ± 2,09 (22:1)	24,40 ± 1,95 (24:1)

Tabla 6.1. Relación THC/CBD en inflorescencias y resinas derivadas de las Cepas Argentinas terapéuticas 1, 2 y 3.

Este primer estudio de las características de las variedades estudiadas indica que las mismas presentan características particulares que las diferencian a nivel macroscópico y también en cuanto a sus características de desarrollo y quimiotipo. Así, por ejemplo, mientras que la variedad CAT3 presenta la mayor velocidad de crecimiento, la variedad CAT2 es la que presenta la mayor producción de cannabinoides por gr de inflorescencia, seguida por la variedad CAT1. Así mismo mientras que CAT2 y CAT3 presentan preponderancia de THC la variedad CAT1 resulta mayoritaria en CBD. Sin embargo, aun cuando los niveles son variables, todas las variedades presentan contenido de THC.

Estas características nos permiten obtener, a su vez, preparados de diferente quimiotipo de acuerdo a que variedad empleemos manteniendo las características y relaciones entre cannabinoides observadas inicialmente en las inflorescencias.

3. Obtención y caracterización de Aceites a base de Cannabis empleando variedades CAT1 y CAT2.

A partir de las experiencias descriptas previamente y en el marco de colaboración en un proyecto de Investigación en Epilepsia Refractaria en Caninos dirigido por la Dra. Fabiana Landoni en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, realizamos la obtención y caracterización de aceites a base de Cannabis empleando inflorescencias de las variedades CAT1 y CAT2. Estas variedades fueron elegidas entre las tres Cepas Argentinas Terapéuticas con las que contamos en el cultivo, ya que eran las que mejor se adaptaban en cuanto al quimiotipo que presentan para generar los aceites con las características y concentraciones requeridas por las investigadoras. Para ello se procedió de la forma descripta previamente utilizando inflorescencias descarboxiladas

de las variedades CAT1 y CAT2. En la *Figura 8.1* se muestra la etapa final utilizada en la preparación de los aceites de cada una de estas variedades, que consistió en diluir y homogeneizar la resina en el aceite, facilitando este proceso empleando una temperatura de 40 °C que permitiera dar fluidez a la resina, pero no generara degradación de los cannabinoides contenidos en la misma.

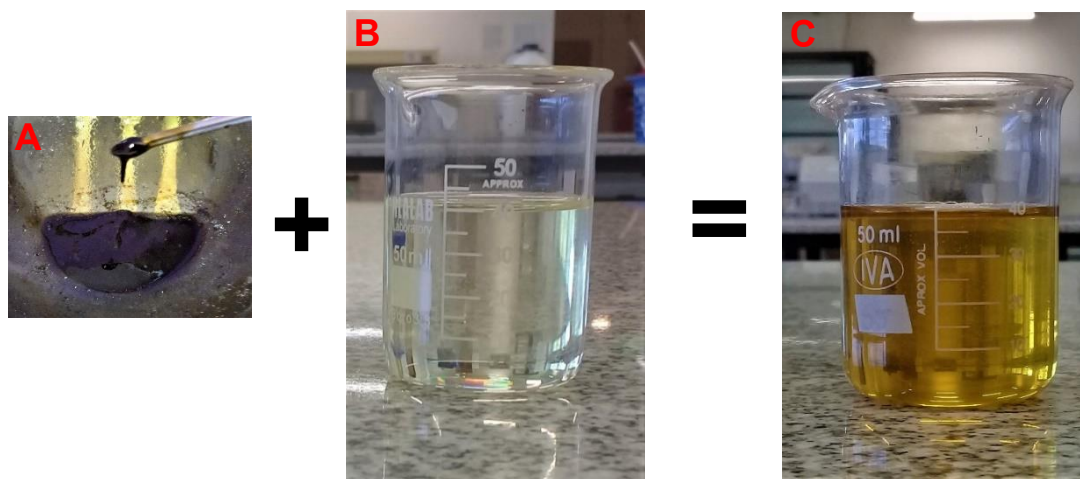


Figura 8.1: Imágenes correspondientes a la preparación del aceite de cannabis. En la figura A se muestra la resina (extracto concentrado), de estructura semisólida y pegajosa, resultando muy engorrosa su manipulación. La imagen B corresponde al aceite utilizado para diluir la resina, en este caso usamos aceite de girasol (NATURA®) y en la figura C observamos la mezcla de resina de cannabis y aceite de girasol. Nótese el cambio en el color del aceite, de amarillo claro en su estado puro a tomar un color pardo cuando se combina con la resina de cannabis.

Para la preparación de los aceites de CAT1 y 2 se partió de la determinación analítica de cannabinoides en las resinas obtenidas y luego fueron diluidas empleando una cantidad adecuada de aceite comestible (Natura®) para alcanzar la concentración requerida por las investigadoras.

En la *Tabla 7.1*. se muestran los resultados de la determinación analítica de los cannabinoides en los aceites generados a partir de cada una de las variedades, indicando la fecha de realización de los mismos. En base a los resultados de concentración de cannabinoides obtenida podemos ver que los aceites producidos presentan homogeneidad en su contenido de cannabinoides, tanto cualitativa como cuantitativamente, aun cuando fueron generados a partir de inflorescencias provenientes de diferentes ciclos de cultivo para su preparación.

Var	CAT 1					CAT 2				
	11/19	12/19	02/20	\bar{x}	SD	11/19	12/19	02/20	\bar{x}	SD
Fecha	11/19	12/19	02/20	\bar{x}	SD	11/19	12/19	02/20	\bar{x}	SD
CBD	6,43	6,66	6,59	6,56	0,12	0,22	0,26	0,26	0,25	0,02
THC	3,63	3,61	3,43	3,56	0,11	7,26	7,30	7,27	7,28	0,02

Tabla 7.1. Concentración de CBD y THC en mg/ml de aceite de CAT 1 y CAT 2 utilizados en un estudio en caninos con Epilepsia Refractaria.

Así en el caso de la variedad CAT1 obtuvimos aceites con concentraciones de CBD y THC de $6,56 \pm 0,12$ mg/ml y $3,56 \pm 0,11$ mg/ml respectivamente, mientras que los provenientes de la variedad CAT 2 presentaron $0,25 \pm 0,02$ mg/ml para CBD y $7,28 \pm 0,02$ mg/ml.

Comparando los valores obtenidos para la relación THC/CBD en las inflorescencias, los aceites y resinas obtenidos para las variedades CAT1 y CAT2 (Tabla 8.1.) vemos que dichos valores no difieren significativamente entre estos tres productos, lo cual indica que durante los procedimientos realizados no han existido pérdidas desproporcionadas de alguno de los cannabinoides presentes, manteniendo la proporción entre THC y CBD en cada variedad.

Varietades	Inflorescencias	Resinas	Aceites
CAT 1	$0,61 \pm 0,01$ (1:2)	$0,60 \pm 0,06$ (1:2)	$0,54 \pm 0,02$ (1:2)
CAT 2	$27,60 \pm 5,87$ (28:1)	$28,03 \pm 1,52$ (28:1)	$29,12 \pm 2,88$ (29:1)

Tabla 8.1. Relación THC/CBD en inflorescencias, resinas y aceites derivados de las Cepas Argentinas Terapéuticas 1 y 2.

Conclusiones particulares:

En conjunto nuestros resultados indican que las variedades estudiadas presentan características distintivas a nivel macroscópico y a nivel de su quimiotipo. Además, que hemos conseguido cultivar las variedades CAT1, CAT2 y CAT3 en condiciones controladas de indoor, que se reflejan en el mantenimiento de sus características generales y en los cannabinoides que éstas producen. Esta capacidad resulta importante desde el punto de vista que uno de los objetivos del Cultivo de Cannabis Universitario es aportar capacidades tecnológicas para la producción de material vegetal con características homogéneas que pueda ser empleado en diversos estudios científicos de ciencia básica y aplicada. Así mismo hemos sido capaces de extraer cannabinoides de las inflorescencias y generar productos concentrados como las resinas que mantienen las características de los cannabinoides presentes en las inflorescencias. Estos productos también son insumos de interés para llevar a cabo

desarrollos científicos básicos y aplicados, donde la calidad de estos productos resulta de suma importancia. Esta calidad se basa en la homogeneidad que pueda conseguirse en el producto final protocolizando no sólo el cultivo, sino también los procesos de extracción y generación de resinas y aceites; así como en la capacidad de caracterizar los mismos mediante determinaciones analíticas.

Capítulo 2

Determinación del perfil de cannabinoides en distintas estructuras de la variedad de *Cannabis sp.* “Quinto Elemento” cultivada en condiciones outdoor.



Capítulo 2: Determinación del perfil de cannabinoides en distintas estructuras de la variedad de *Cannabis sp.* “Quinto Elemento” cultivada en condiciones outdoor.

Con el fin de avanzar en la descripción de las variedades de Cannabis con las que contamos en el Cultivo de Cannabis Universitario en el CIM-CONICET/UNLP, realizamos un estudio de las características en cuanto al perfil de cannabinoides que presenta un ejemplar de la variedad de *Cannabis sp.* denominada coloquialmente “Quinto Elemento”, cultivada en condiciones outdoor. La variedad “Quinto elemento”, que mayormente es cultivada en esas condiciones, dio origen a la variedad CAT3 ya que la misma surge de esquejes de “Quinto elemento” puestos en cultivo en condiciones indoor en nuestro Cepario.

1. Descripción de la planta y muestras estudiadas.

El ejemplar con el cual se trabajó fue desarrollado a partir de una semilla producida y entregada por Daniel Loza. El cultivo de dicha planta se realizó en el exterior en tierra, con lo cual pudo alcanzar su desarrollo máximo en dichas condiciones alcanzando una altura de 3 m (*Figura 1.2*).

Esta variedad es un híbrido de variedades indicas y sativas, que presenta un vigoroso crecimiento vertical que le da gran porte a la planta con ramas largas y laxas de gran distancia internodal. Desarrolla hojas grandes compuestas por 5-7 folíolos estrechos

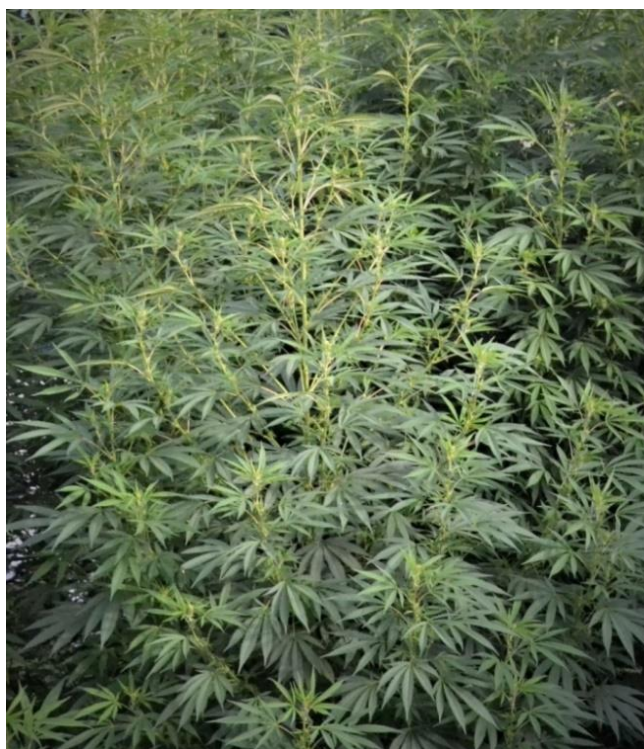


Figura 1.2: Ejemplar femenino de *Quinto Elemento* iniciando la floración en un cultivo de exterior. Cortesía del programa “Quinto elemento”.

con bordes aserrados muy marcados. Así mismo, presenta una larga etapa de floración, que supera las 8 semanas y produce abundante cantidad de inflorescencias ubicadas principalmente en el ápice y en sus ramas principales. Las inflorescencias son de gran tamaño y poco compactas, manifestando hacia el final de la floración tonos rosados por la gran cantidad de estigmas oxidados que presentan.

Al momento de la cosecha y remoción de la planta del lugar donde estaba siendo cultivada, debido al gran tamaño que había alcanzado, se realizó la toma de muestras (Figura 2.2) que fueron empleadas luego en los análisis de cannabinoides.

Se recibieron 2 gr de semillas producidas por autopolinización, este es un mecanismo biológico que ocurre en ejemplares femeninos que, bajo situaciones de estrés como bruscos cambios ambientales, desarrollan algunas flores masculinas con el fin de autopolinizarse y generar descendencia produciendo semillas.



Figura 2.2. Imágenes correspondientes a las hojas (A), corteza del tallo (B), semillas (C), raíces (D) e inflorescencias (E) de la variedad “Quinto elemento” cultivada en condiciones outdoor.

Las hojas recibidas no presentaban indicios de carencia de nutrientes y eran hojas situadas debajo del 3° nudo, que una vez secas constituyeron una masa de 7 gr. También se recibieron muestras de la corteza de la base del tallo en una cantidad de 5 gr peso seco. Una vez quitada la planta de raíz se tomaron muestras de la raíz principal y raíces secundarias que, luego del lavado y secado, pesaron 11 gr. Las inflorescencias

recibidas pertenecían a una de las ramas principales de la planta arrojando un peso seco de 2 gr.

2. Determinación del perfil cannabinoide en semillas, raíces, hojas, tallo e inflorescencias de la variedad “Quinto Elemento” y en aceite derivado de la misma.

Siguiendo los protocolos descriptos en la sección *Materiales y Métodos*, se procesaron las muestras en estudio para obtener los extractos necesarios para la determinación posterior del contenido de cannabinoides por HPLC-UV/DAD en los distintos tejidos de la planta.

Los resultados indicaron que el tejido con mayor contenido de cannabinoides totales fueron las inflorescencias con una concentración de $56,62 \pm 3,76$ mg/gr de flor constituyendo un 5,7% respecto del peso total del tejido estudiado, disminuyendo en el siguiente orden en los restantes tejidos estudiados: hojas ($11,79 \pm 0,36$ mg/gr, 1,2%), tallo ($2,44 \pm 0,05$ mg/gr, 0,2%), raíces ($0,15 \pm 0,04$ mg/gr, 0,02%) y semillas ($0,18 \pm 0,04$ mg/gr, 0,02%) (*Tabla 1.2*).

Compuestos	Semillas	Raíces	Hojas	Tallo	Inflorescencias
CBD-A	ND	ND	$2,16 \pm 0,12$	ND	$1,46 \pm 0,08$
THC-A	$0,12 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,02$	$8,02 \pm 0,12$	$2,33 \pm 0,08$	$36,23 \pm 2,30$
CBD	ND	ND	$0,47 \pm 0,02$	ND	$1,34 \pm 0,32$
CBN	ND	ND	ND	ND	ND
THC	$0,06 \pm 0,03$	$0,1 \pm 0,01$	$1,15 \pm 0,09$	$0,11 \pm 0,01$	$17,61 \pm 1,07$
Totales	$0,18 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,04$	$11,79 \pm 0,36$	$2,44 \pm 0,05$	$56,62 \pm 3,76$

Tabla 1.2. Perfil de cannabinoides en las distintas estructuras en mg/gr de tejido (Media \pm SD) (N=3).

Así mismo se observó que los cannabinoides que estuvieron presentes en todos los tejidos fueron THCA y THC; encontrándose mayoritariamente el THCA en estructuras como semillas ($0,12 \pm 0,01$ mg/gr), hojas ($8,02 \pm 0,12$ mg/gr), tallo ($2,33 \pm 0,08$ mg/gr) e inflorescencias ($36,23 \pm 2,30$ mg/gr); mientras que en raíces ($0,1 \pm 0,01$ mg/gr) predominó su forma neutra, el THC.

Por otro lado, sólo fue posible detectar la presencia de CBDA y CBD en hojas (CBDA: $2,16 \pm 0,12$ mg/gr, CBD: $0,47 \pm 0,02$ mg/gr) e inflorescencias (CBDA: $1,46 \pm 0,63$ mg/gr, CBD: $1,34 \pm 0,32$ mg/gr). En el caso del cannabinoide CBN, su presencia no fue detectada en ninguna de las estructuras de la planta analizada.

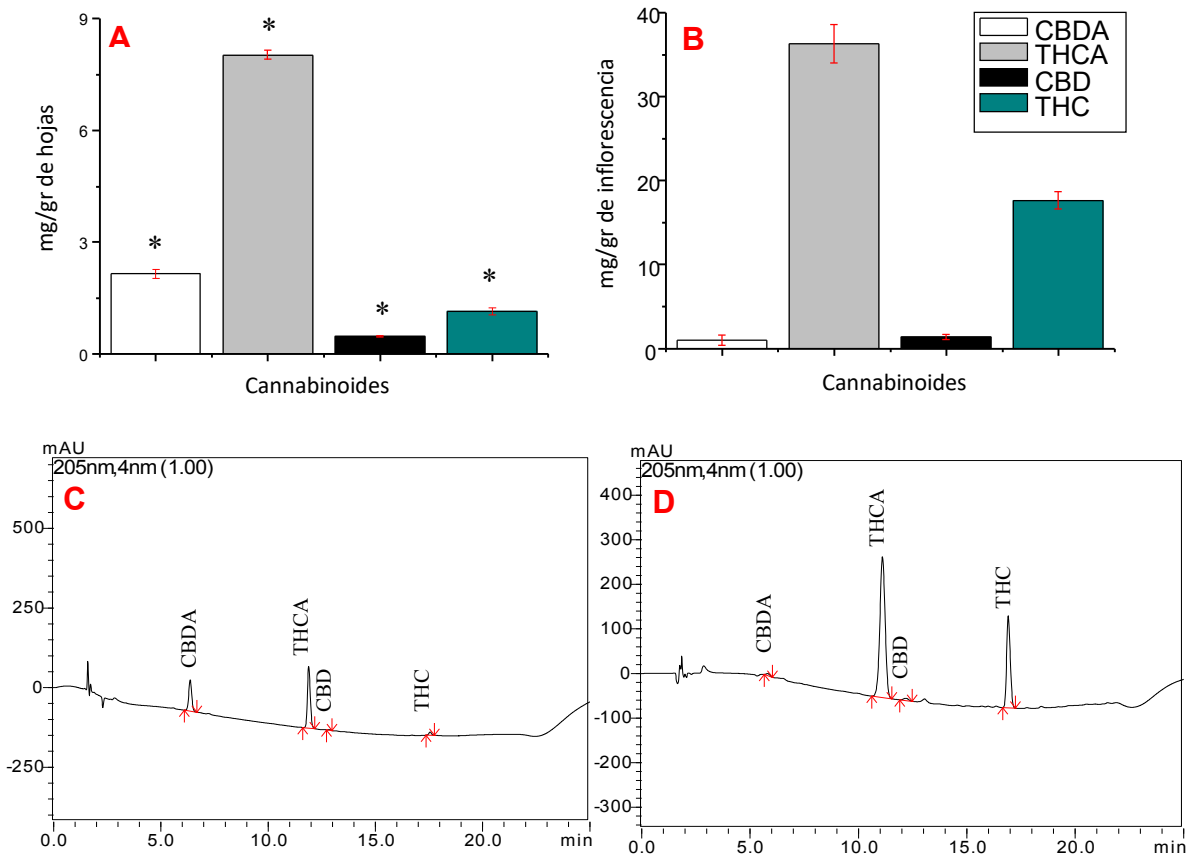


Figura 3.2. En los gráficos A y B se puede observar las cantidades absolutas de CBDA, THCA, CBD y THC en hojas e inflorescencias de Quinto Elemento. Mientras que debajo se observan los cromatogramas representativos de las hojas (C) e inflorescencias (D). (*) Indica que existen diferencias significativas respecto a los valores de las inflorescencias, ANOVA ($p < 0.05$).

Como comentamos anteriormente, las estructuras que presentaron mayor contenido de cannabinoides fueron las inflorescencias seguidas por las hojas. Sin embargo, los perfiles de cannabinoides presentes en cada una de ellas presentaron características distintas (Figura 3.2). Si bien en ambos tejidos se registró la presencia de cannabinoides ácidos (CBDA y THCA) y neutros (CBD y THC) la relación entre ellos fue diferente.

Vinculado a esto podemos ver que, considerando el contenido total de THC, el contenido total de CBD y la relación que puede establecerse entre ellas, estas diferencias entre perfiles de cannabinoides en inflorescencias y hojas de la misma planta se expresan en forma numérica (Tabla 2.2).

Estructuras	THC total	CBD total	THC/CBD
Hojas	$8,17 \pm 0,20$	$2,35 \pm 0,13$	$3,47 \pm 0,27$ (3,5:1)
Inflorescencias	$49,37 \pm 3,08$	$2,61 \pm 0,39$	$18,91 \pm 1,64$ (19:1)

Tabla 2.2. Contenidos totales de THC y CBD en mg/gr de tejido y la relación entre ellos.

Es decir, si bien el cannabinoide mayoritario es el THC total (hojas: $8,17 \pm 0,20$ mg/gr, inflorescencias: $49,38 \pm 3,08$ mg/gr) respecto al CBD total (hojas: $2,35 \pm 0,13$ mg/gr, inflorescencias: $2,17 \pm 0,23$ mg/gr), la relación THC/CBD que resulta es diferente en cada tejido; siendo de $3,47 \pm 0,27$ en hojas (3.5:1) y $18,91 \pm 1,64$ en inflorescencias (19:1). Esta diferencia en las relaciones obtenidas resulta de la gran diferencia que existe en cuanto al contenido de THC total en ambos tejidos, mientras que el contenido de CBD total para ambos se encuentra en el mismo orden. Esta característica resulta relevante ya que indica la posibilidad de obtener, a partir de un mismo ejemplar, productos derivados de Cannabis que presenten relaciones diferentes entre los cannabinoides presentes en los mismos, dependiendo de que tejido de la planta empleemos para ello.

El análisis de los resultados obtenidos indica que lo detectado en las raíces, en la corteza del tallo y en las hojas de esta planta concuerda con las cantidades reportadas por la Farmacopea Herbal Americana (2014), donde los valores registrados para ciertas variedades fueron: $< 0,03\%$ en raíces, de $0,1-0,3\%$ en la corteza del tallo y de $1-2\%$ en las hojas.

En los análisis realizados por Dai Jing y colaboradores (2020) se detectó una menor cantidad de cannabinoides en la corteza del tallo (entre $0,005$ y $0,008$ %) y en las raíces (entre $0,001\%$ y $0,004\%$) en comparación con las obtenidas en nuestro trabajo. Sin embargo, la concentración obtenida en las hojas ($1,10-2,10\%$) fue similar a la determinada en la planta “Quinto elemento” cultivada en condiciones outdoor que hemos estudiado. Estas diferencias pueden deberse fundamentalmente a que las variedades de Cannabis analizadas son diferentes.

Si bien, los autores mencionados anteriormente no informaron la presencia de cannabinoides en semillas, en el trabajo de Citti y colaboradores (2000) se reporta por primera vez la presencia de 32 cannabinoides, aunque no detallan la concentración de los mismos en ese tejido.

Así mismo, los resultados obtenidos en las inflorescencias analizadas en nuestro trabajo indican que el contenido de cannabinoides detectados en la variedad “Quinto Elemento” fueron inferiores (*Tabla 3.2*) a las reportadas para otras variedades de *Cannabis sp.* como “CBD Mango Haze” (Dai Jing et al., 2020), “Bedrocan”, “Bediol” (Calvi et al, 2018), “Green Crack”, “OG Kush” (Elzinga et al., 2015) y otras variedades no especificadas (AHP., 2014; Hazekamp et al., 2016).

Variedad	Contenido de cannabinoides	Referencia
Harlequin	5%	Elzinga <i>et al</i> (2015)
Quinto Elemento	6%	-
No especifica	12-15 %	Hazekamp <i>et al</i> (2016)
Bediol	15 %	Calvi <i>et al</i> (2018)
Green Crack	15%	Elzinga <i>et al</i> (2015)
OG Kush	16%	Elzinga <i>et al</i> (2015)
No especifica	15-20%	AHP (2014)
CBD Mango Haze	21%	Dai Jing <i>et al</i> (2020)
Bedrocan	23%	Calvi <i>et al</i> (2018)

Tabla 3.2. Contenido de cannabinoides en inflorescencias de diferentes variedades de *Cannabis sp.*

En base a dichos resultados podemos establecer 3 subgrupos de variedades de acuerdo al contenido de cannabinoides totales en sus inflorescencias. Un primer subgrupo es aquel donde los cannabinoides superan el 20% como en el caso de lo reportado para las variedades CBD Mango Haze (21%) y “Bedrocan” (23%). Un segundo subgrupo se constituye con las variedades que producen entre un 10% y un 20%, tales como “Green crack” (15%), “OG Kush” (16%) y “Bediol” (15 %) entre otras. Finalmente encontramos el tercer subgrupo con una producción de cannabinoides de menos del 10%, como es el caso de “Harlequin” (5%). Dentro de este último subgrupo podríamos incluir a la variedad “Quinto elemento” cultivada en condiciones outdoor (6%).

Una vez estudiadas las características del perfil cannabinoide en las diferentes estructuras del ejemplar de “Quinto elemento” cultivado outdoor, avanzamos en el estudio del perfil cannabinoide del aceite que la ONG Asociación Cultivo en Familia La Plata (ACUFALP) había preparado a partir de las otras inflorescencias de esta planta que fueron cosechadas en el mismo momento que las inflorescencias entregadas para su estudio (*Tabla 4.2*).

Cannabinoides	Aceite	Inflorescencias
CBDA	0,22 ± 0,01	1,46 ± 0,08
THCA	5,15 ± 0,28	36,23 ± 2,30
CBD	0,33 ± 0,04	1,34 ± 0,32
THC	2,49 ± 0,13	17,61 ± 1,07
Totales	8,19 ± 0,47	56,62 ± 3,76

Tabla 4.2. Concentración de cannabinoides en mg/ml de aceite y en mg/gr de inflorescencia (Media ± SD) (N=3).

El aceite producido por la ONG presentó una concentración de cannabinoides totales de $8,19 \pm 0,47$ mg/ml con un perfil de cannabinoides que incluyeron al THCA ($5,15 \pm 0,28$ mg/ml) como componente mayoritario, THC ($2,49 \pm 0,13$ mg/ml), CBDA ($0,22 \pm 0,01$ mg/ml) y CBD ($0,22 \pm 0,01$ mg/ml).

El análisis de esos resultados en comparación con los valores obtenidos para las inflorescencias (*Tabla 5.2*) indicó que el aceite presentó una concentración de cannabinoides unas 7 veces menor que la presente en las inflorescencias. Así mismo las relaciones THC/CBD (aceite: $16,66 \pm 0,68$; inflorescencias: $18,91 \pm 1,64$), CBDA/CBD (aceite: $0,67 \pm 0,04$; inflorescencias: $1,09 \pm 0,21$), THCA/THC (aceites: $2,07 \pm 0,00$; inflorescencias: $2,06 \pm 0,01$) y Ácidos/Neutros (aceite: $1,91 \pm 0,01$; inflorescencias: $1,99 \pm 0,02$) no presentaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para las inflorescencias y los aceites producidos a partir de las mismas. Lo cual indica que durante los procesos realizados para la preparación del aceite no se produjeron alteraciones significativas en cuanto a las proporciones de los cannabinoides presentes, expresándose sólo el efecto de dilución en la concentración de los cannabinoides producto de emplear una resina (producto concentrado rico en cannabinoides) obtenida a partir de las inflorescencias y luego agregarle un determinado volumen de aceite comestible, generando así el producto final, aceite a base de Cannabis a emplearse en la terapéutica de los usuarios.

Derivaciones	Aceite	Inflorescencias
THC	$7,00 \pm 0,38$	$49,37 \pm 3,08$
CBD	$0,52 \pm 0,05$	$2,61 \pm 0,39$
THC/CBD	$16,66 \pm 0,68$ (17:1)	$18,91 \pm 1,64$ (19:1)
CBDA/CBD	$0,67 \pm 0,04$	$1,09 \pm 0,21$
THCA/THC	$2,07 \pm 0,00$	$2,06 \pm 0,01$
Ácidos/Neutros	$1,91 \pm 0,01$	$1,99 \pm 0,02$

Tabla 5.2. Contenido total de THC y CBD en mg/ml de aceite y en mg/gr de inflorescencias (Media \pm SD). Relaciones entre THC/CBD, CBDA/CBD, THCA/THC y entre ácidos/neutros en aceites e inflorescencias.

Conclusiones particulares:

Los resultados presentados en este capítulo nos permitieron acercarnos a las características, en cuanto a su desarrollo y perfil de cannabinoides, que presenta la variedad “Quinto elemento” al ser cultivada en condiciones outdoor. A menudo las

inflorescencias femeninas se cosechan y todas las demás estructuras de la planta son descartadas por los productores. Según Russo (2011), las concentraciones superiores a 0,05% de cualquier principio activo son interesantes desde el punto de vista terapéutico. Teniendo en cuenta esto, además de las inflorescencias, se podrían aprovechar para la preparación de extractos de Cannabis tanto las hojas como los tallos. No sólo porque presentan una considerable cantidad de cannabinoides sino porque revelan además un ratio diferente de THC:CBD a las observadas en las inflorescencias con lo cual podríamos generar productos con diferentes propiedades a partir de una misma planta.

Así mismo el contenido de cannabinoides en las inflorescencias de esta variedad cultivada outdoor se ubica entre un grupo de variedades cuya producción de cannabinoides es menor al 10%. Esta variedad es ampliamente utilizada por la comunidad para generar productos derivados de Cannabis con fines terapéuticos ya que, de acuerdo con la experiencia de los usuarios, aportan importantes beneficios en el manejo de síntomas en diversas patologías. Esto puede indicar que no sólo resultan relevante el contenido de cannabinoides que se encuentre en algún producto derivado de Cannabis, sino también aquellas sustancias acompañantes como terpenos, flavonoides etc; destacando la importancia del efecto séquito en los efectos producidos por estas preparaciones (Russo et al., 2011).

Finalmente, el estudio del aceite producido por la ONG indica nuevamente la importancia de protocolizar estos procedimientos y la posibilidad de generar productos que mantengan la calidad, al menos en cuanto a cantidad y proporción de cannabinoides de acuerdo a lo estudiado en esta tesina, de manera casera siguiendo protocolos establecidos.

Capítulo 3

Caracterización en la Cepa Argentina Terapéutica N° 3 (CAT3) en condiciones de cultivo indoor.



Capítulo 3: Caracterización en la Cepa Argentina Terapéutica N° 3 (CAT3) en condiciones de cultivo indoor.

Dado el avance en el Cultivo de Cannabis Universitario que desarrollamos en el CIM-CONICET/UNLP, luego de una adaptación inicial a las condiciones indoor, y teniendo en cuenta la relevancia de la variedad “Quinto elemento” (que se constituyó como CAT 3 en el Cultivo Universitario de Cannabis) en nuestra región desde el punto de vista de su uso terapéutico y del aspecto social vinculado a la solidaridad de quien la desarrolló, Daniel Loza; decidimos avanzar en una Caracterización de la variedad CAT3 en condiciones de cultivo indoor. Para ello adaptamos el protocolo de la UPOV, que fundamentalmente tiene en cuenta cultivos outdoor, a las condiciones de desarrollo indoor de modo de obtener parámetros que permitan determinar la estabilidad o no de dicha variedad en las condiciones de cultivo mencionadas.

1. Características y parámetros de desarrollo de CAT 3 en cultivo indoor.

Para este estudio empleamos dos ejemplares de la variedad CAT3 de 2 meses de desarrollo, plantas madres, seleccionadas a tal fin a partir de los ejemplares de esta variedad mantenidos en cultivo en condiciones indoor luego de 8 generaciones. A partir de ellas se obtuvieron 22 esquejes que fueron acondicionados y colocados en el aeroclonador (*Figura 1.3 A*) para su enraizamiento de acuerdo a la técnica descrita en la sección *Materiales y Métodos*.

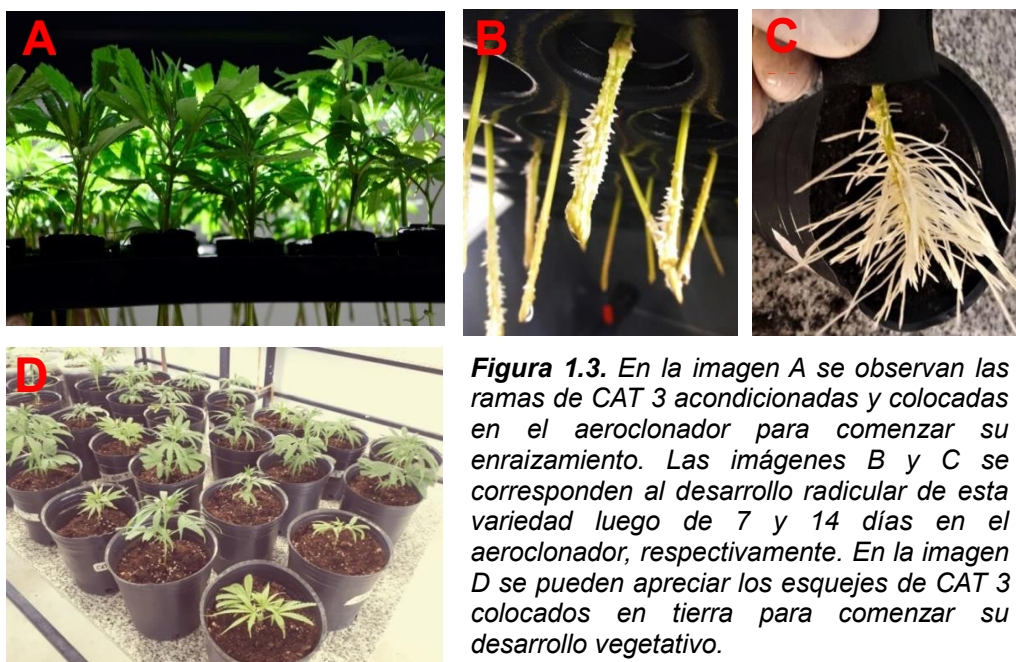


Figura 1.3. En la imagen A se observan las ramas de CAT 3 acondicionadas y colocadas en el aeroclonador para comenzar su enraizamiento. Las imágenes B y C se corresponden al desarrollo radicular de esta variedad luego de 7 y 14 días en el aeroclonador, respectivamente. En la imagen D se pueden apreciar los esquejes de CAT 3 colocados en tierra para comenzar su desarrollo vegetativo.

Luego de 7 días en el aeroclonador los esquejes comenzaron a mostrar las primeras raíces (*Figura 1.3 B*) y luego de 2 semanas presentaban un buen desarrollo radicular

(Figura 1.3 C), por lo que fueron trasplantadas a tierra empleando contenedores de 1 L (Figura 1.3 D) y colocadas en las condiciones de cultivo vegetativo descritas en *Materiales y Métodos*.

De los 22 esquejes puestos en el aeroclonador inicialmente se obtuvieron 22 ejemplares viables, mostrando una eficacia de esquejado del 100 %. Pasada una semana de desarrollo, la altura media de los ejemplares fue de 8 ± 0.9 cm. En este momento se seleccionaron 2 plantines representativos que fueron apartados del estudio para ser utilizados como plantas madres en próximos ciclos de reproducción. Los 20 plantines restantes se emplearon en los estudios de caracterización de la variedad CAT3. En la cuarta semana de crecimiento vegetativo comenzaron a aparecer las primeras flores pistiladas, confirmando el sexo femenino en todos los ejemplares seleccionados.

Cumpliendo la quinta semana, las plantas fueron trasplantadas por última vez a contenedores de 10 L y se mantuvieron durante una semana más bajo este fotoperiodo, para luego ser colocados en la sala de floración (Figura 2.3).

Luego de 14 días de inducida la floración comenzaron a observarse los primeros cúmulos florales en los ápices (Figura 4.3 B) de las plantas y luego se desarrollaron en las puntas de las ramas inferiores comenzando en el ápice de estas hasta su unión con el tallo.



Figura 2.3. En esta imagen se pueden apreciar los 20 ejemplares, en contenedores de 10 L, comenzando la etapa de floración.

Tanto durante la etapa de desarrollo vegetativo como en la etapa de floración se llevaron a cabo periódicamente las determinaciones de los parámetros que nos permitieron caracterizar el crecimiento a nivel macroscópico de esta variedad.



Figura 3.3. Imágenes correspondientes a las diferentes estructuras de CAT 3 en la etapa vegetativa. En la figura A se ven las raíces al momento del primer trasplante (cambio de contenedor de 1 a 5L), nótese el gran desarrollo y el buen estado radicular. Las imágenes B y C corresponden a hojas de esta variedad compuestas por 5 y 7 folíolos. Por lo general, las de 5 folíolos son más pequeñas que las de 7. La fotografía D muestra el tallo principal de uno de los ejemplares donde se observa un surco muy pronunciado. En la imagen E, se muestra un ejemplar de 3 semanas visto desde arriba, en el que se puede apreciar una gran cantidad de hojas. Por último, en la imagen F se muestra un ejemplar en la quinta semana del período vegetativo, previo al último trasplante (de 5 a 10 L), con una altura de 61 cm. Véase el gran desarrollo vertical que posee esta variedad y su abundante ramificación.

Durante el desarrollo de CAT3 en el período vegetativo pudimos observar, en cada trasplante, que las raíces presentaban una coloración blanquecina y un desarrollo que aumentaba en función del tiempo; lo cual indicó un buen estado radicular (*Figura 3.3 A*).

En la *Figura 3.3 F* se muestra la imagen de un ejemplar de CAT3 en la quinta semana de crecimiento vegetativo, donde puede observarse el fenotipo de esta variedad. Podemos decir que la misma en cultivo interior bajo las condiciones detalladas en *Materiales y Métodos*, presenta un importante crecimiento vertical formando tallos robustos y firmes con surcos longitudinales muy marcados como se observa en la *Figura 3.3 D*.

Esta variedad presentó hojas compuestas por 5 y 7 folíolos; siendo por lo general, las de 5 folíolos (*Figura 3.3 B*) más pequeñas que las de 7 folíolos (*Figura 3.3 C*). Los folíolos de estas hojas fueron finos y alargados, de color verde oscuro con bordes aserrados muy marcados.

Además, a medida que avanza el desarrollo esta variedad genera una gran cantidad de hojas (*Figura 3.3 E*). La CAT3 desarrolló ramas largas que se cubrieron de inflorescencias y al igual que las obtenidas de cultivos en exterior (*Capítulo 2*), son muy voluminosas y poco compactas presentando gran cantidad de pistilos y tricomas.

En la *Figura 4.3* se muestra el desarrollo de las inflorescencias a lo largo de la etapa de floración. Las imágenes B, C, D, E y F corresponden a inflorescencias apicales luego de 2, 4, 6, 8 y 10 semanas de iniciado el fotoperiodo de floración, respectivamente.

Durante el período de floración las inflorescencias presentaron características diferentes a medida que se iban desarrollando. En las primeras semanas del desarrollo se vio un gran aumento en el número, grosor y longitud de los pistilos (*Figura 4.3 B y C*) y luego de la cuarta semana se evidenció la producción de tricomas y el engorde de las inflorescencias (*Figura 4.3 D*). Terminando la cuarta semana del período de floración, se detectó el cese del crecimiento vertical de las plantas, alcanzando una altura promedio de $116 \pm 12,3$ cm.

Las inflorescencias apicales (*Figura 4.3 E*) son de mayor porte que las que se observan en las ramificaciones a lo largo de la rama. Al avanzar en el desarrollo y la maduración se observó que en la rama principal las inflorescencias aumentaron más su tamaño, creciendo y unificándose a lo largo del todo el tallo (*Figura 4.3 A*).



Figura 4.3. Imágenes representativas de inflorescencias de CAT 3 en distintos estadios de su desarrollo floral. En las imágenes B y C se observan ejemplares en las primeras semanas marcadas por la gran producción de pistilos. En la imagen D se observa la presencia de tricomas y como ha aumentado el volumen de las inflorescencias. En la figura E vemos el volumen que ha alcanzado la inflorescencia apical de un ejemplar, sobrepasando los 15 cm de longitud y los 5 cm de ancho. La imagen A corresponde a una rama principal, de uno de los ejemplares, al momento de la cosecha. Se observa como las inflorescencias fueron creciendo unificándose a lo largo del todo el tallo. La imagen F representa el estado de las inflorescencias al momento de la cosecha mientras que la fotografía G muestra el proceso de manicurado postcosecha.

En las últimas dos semanas del período de floración se comenzó a evidenciar la senescencia de estigmas y maduración de tricomas con un cambio de coloración de blanquecino a ámbar, criterio seleccionado para establecer la cosecha de las inflorescencias.

El ciclo de cultivo requirió un total de 126 días, incluyendo 14 días de enraizamiento en el aeroclonador, 42 días de crecimiento vegetativo y 70 días de floración. El cultivo se desarrolló de manera continua, sin inconvenientes y libre de insectos y hongos. Los 20 ejemplares no mostraron signos de hermafroditismo por lo que la proporción de plantas macho o hermafroditas fue nula.

En el día 70 del período de floración, cumplida la séptima semana, se procedió a la cosecha las inflorescencias (*Figura 4.3 F*) de todos los ejemplares, y al posterior manicurado (*Figura 4.3 G*) y secado de dichas inflorescencias en ambiente seco, fresco y oscuro para el posterior análisis del contenido de cannabinoides.

Los parámetros determinados en el transcurso del cultivo indicaron que se mantuvo la velocidad de crecimiento durante todo el proceso de desarrollo de la planta, no registrándose diferencias significativas entre el valor obtenido en la fase vegetativa ($2 \pm 0,4$ cm/día) y la fase de floración ($1,8 \pm 0,5$ cm/día). La altura alcanzada por los ejemplares al final del período vegetativo fue de $78,6 \pm 4,6$ cm; mientras que la altura máxima alcanzada por los mismos fue de $116,0 \pm 12,3$ cm (*Tabla 1.3*).

Parámetros	Promedio	SD
Velocidad de crecimiento en vegetativo (cm/día)	2	0,4
Velocidad de crecimiento en floración (cm/día)	1,8	0,5
Altura media al final del vegetativo (cm)	78,6	4,6
Altura media al final de la floración (cm)	116	12,3
Longitud del pecíolo (mm)	88,6	11,9
Longitud del foliolo central (mm)	128,9	10,8
Ancho del foliolo central (mm)	21,2	3,5
Diámetro del cuello (DAC) (mm)	79,8	4,9
Biomasa seca por planta (gr)	15,70	3,32
Conductancia estomática (mmol/ m ² .sg)	31,46	5,33
Contenido de clorofila (Spad)	62,59	2,72

Tabla 1.3. Parámetros analizados sobre los 20 ejemplares de estudio. Se observa la media y el desvío estándar (N=20).

Presentaron hojas de un tamaño considerable, con un pecíolo de $88,6 \pm 11,9$ mm, una longitud de foliolo central de $128,8 \pm 10,8$ mm y un ancho del foliolo central de $21,2 \pm 3,5$ mm.

La producción de inflorescencias que presentó esta variedad en estas condiciones de cultivo fue de $15,70 \pm 3,32$ gr de peso seco/ planta.

Así mismo se determinaron parámetros vinculados al estado fisiológico de las plantas como la conductancia estomática y la cantidad relativa de clorofila, obteniendo valores de $31,46 \pm 5,33$ mmol/ m².sg y $62,59 \pm 2,72$ unidades SPAD respectivamente.

Nuestros resultados indican que todos los ejemplares superaron el metro de altura, con una gran velocidad de crecimiento similar a lo detectado en los ensayos preliminares presentados en el *Capítulo 1* (velocidad de crecimiento: $1,8 \pm 0,9$ cm/día; altura: $108,0 \pm 11,2$ cm). La variable altura se relaciona con su capacidad fotosintética y su superficie de transpiración, mientras que el diámetro a la altura del cuello ($79,8 \pm 4,3$ mm) es un indicador de la capacidad de transporte de agua hacia la parte aérea y de la resistencia mecánica (Cleary y Greaves., 1977). De estos dos parámetros surge el Índice de Esbeltez (IE), que es el cociente o razón entre la altura (cm) y el DAC (mm). Este índice es un parámetro importante de plantas cultivadas en contenedores, donde se pueden desarrollar plantas etioladas (espigadas). Para este ensayo, el IE resultó de $1,45 \pm 0,18$ y si bien no hemos encontrado valores de referencia para Cannabis sobre este índice, el mismo será tomado como referencia por nosotros para próximos ciclos de cultivo de ésta y otras variedades.

Al analizar todos los parámetros determinados en conjunto, vemos que tienen una variabilidad relativamente baja, indicada por los valores de SD, lo cual indica una buena homogeneidad en el desarrollo de las características fenotípicas y en el estado general de los ejemplares de esta variedad en condiciones indoor.

2. Perfil de cannabinoides en las inflorescencias de CAT3.

Se llevó a cabo la determinación del perfil de cannabinoides en muestras representativas de cada una de las 20 plantas cultivadas en este estudio. En la *Figura 5.3 B* se presenta el cromatograma obtenido para las inflorescencias correspondiente a una de las plantas estudiadas, el cual resulta representativo de lo hallado en las 20 muestras estudiadas.

En relación con el estándar empleado para la determinación (*Figura 5.3 A*) pudimos identificar en las muestras de las inflorescencias la presencia de los siguientes cannabinoides: CBDA, THCA, CBD y THC. Así mismo no se detectó en ninguna de las muestras analizadas la presencia de CBN.

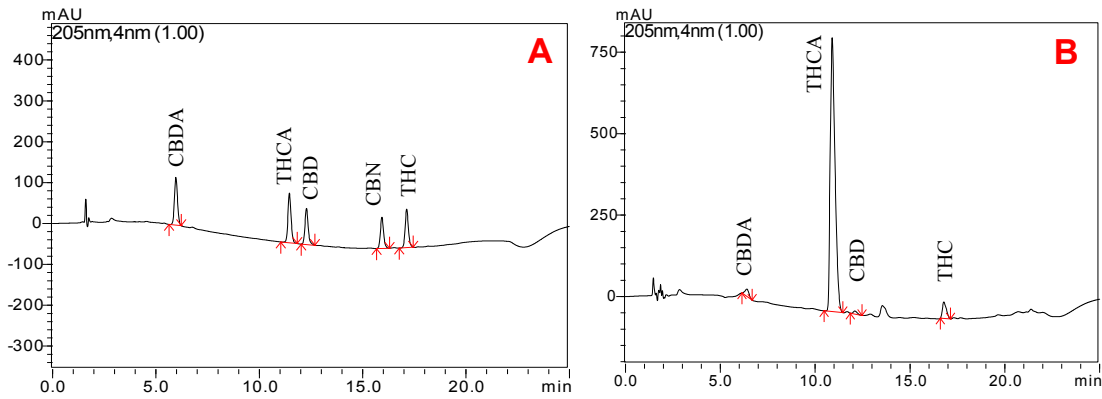


Figura 5.3. Perfil de cannabinoides determinado en inflorescencias por HPLC-UV/DAD. Cromatogramas representativos correspondientes al estándar utilizado, mix conteniendo los 5 cannabinoides en una concentración de 10 µg/m (A) y a las inflorescencias (B).

En la *Figura 6.3* se presentan los resultados de la cuantificación de los cannabinoides detectados para cada uno de los 20 ejemplares estudiados.

Los valores obtenidos indican homogeneidad entre las distintas plantas de la misma variedad en cuanto al contenido de cannabinoides, especialmente en los casos de CBDA, CBD y THC.

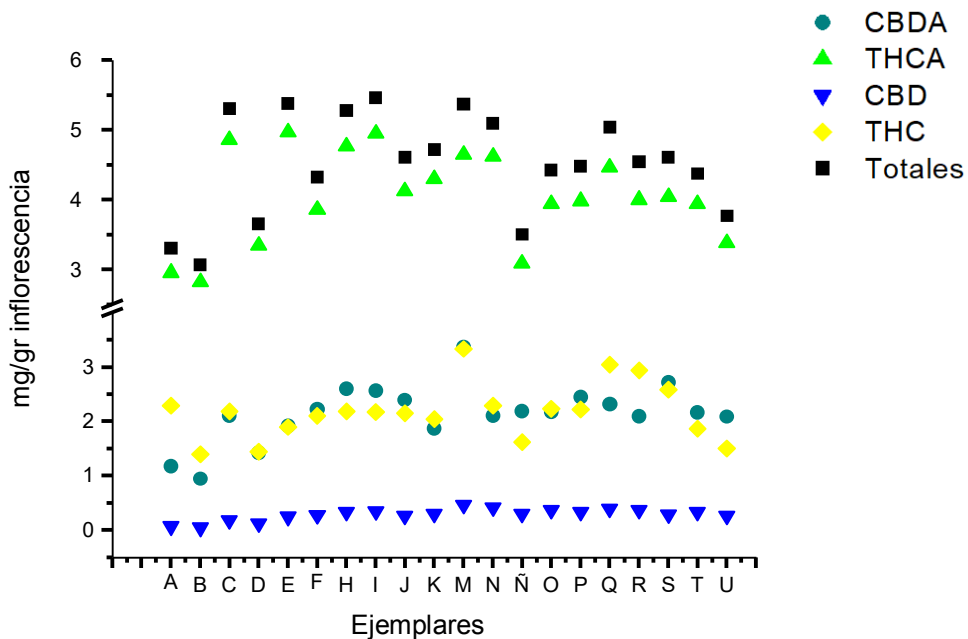


Figura 6.3. Concentración de CBDA, THCA, CBD, THC y concentración total de cannabinoides en mg/ gr de inflorescencia de las 20 plantas estudiadas.

El cannabinoide THCA resultó ser el cannabinoide predominante en todas las plantas con un valor medio de $40,56 \pm 6,64$ mg/gr de inflorescencias (*Figura 7.3*). El contenido de THC en las inflorescencias fue similar al de CBDA, encontrándose valores de $2,18 \pm 0,51$ mg/gr de inflorescencia y $2,15 \pm 0,53$ mg/gr de inflorescencia respectivamente. Por otro lado, el cannabinoide encontrado en menor cantidad fue el CBD, alcanzando niveles de $0,29 \pm 0,11$ mg/gr (*Figura 7.3*). Así mismo, la concentración de cannabinoides totales fue de $45,17 \pm 7,34$ mg/gr de inflorescencias, lo cual representa un 4,5 % del peso de las mismas.

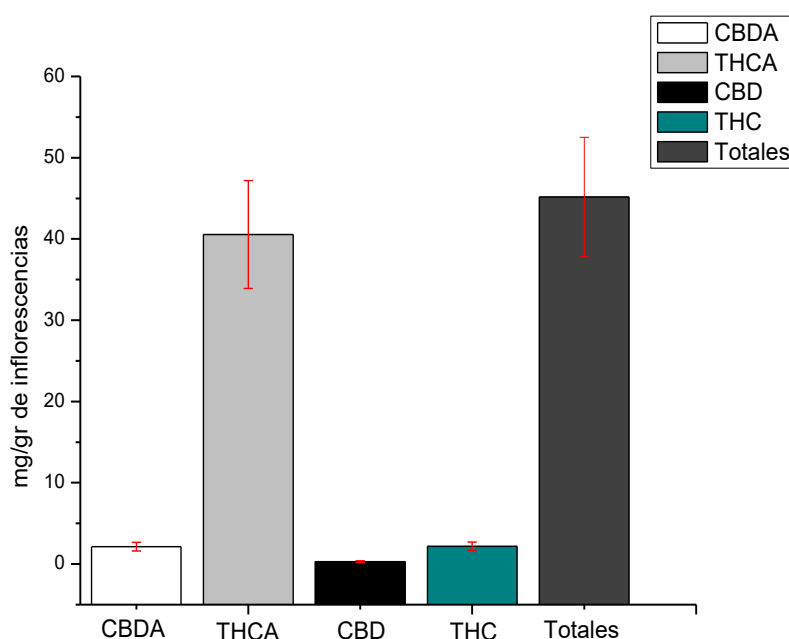


Figura 7.3. Concentración de CBDA, THCA, CBD, THC y cannabinoides totales en mg/gr de inflorescencia (Media \pm SD; N=20).

Si tenemos en cuenta las inflorescencias producidas por planta, el valor de los cannabinoides totales obtenido en promedio fue de $711,22 \pm 186,27$ mg/planta. De ese total, $34,24 \pm 11,78$ mg correspondieron a CBDA, $638,38 \pm 167,41$ mg a THCA, $4,58 \pm 1,93$ mg a CBD y finalmente $34,02 \pm 9,42$ a THC.

Por lo tanto, si consideramos los 20 ejemplares, la producción total de cannabinoides en este ciclo de cultivo fue de $14,22 \pm 5,27$ gr; con $12,77 \pm 4,74$ gr de THCA, $0,68 \pm 0,33$ gr de CBDA, $0,68 \pm 0,27$ gr de THC y $0,09 \pm 0,05$ gr de CBD.

A partir de los valores de THC total ($37,75 \pm 6,09$) y CBD total ($2,17 \pm 0,56$) calculados, encontramos que la relación de THC/CBD presentada en este estudio fue de $17,37 \pm 2,57$ (*Tabla 2.3*).

Comparando los valores obtenidos para los cannabinoides detectados en esta caracterización con los obtenidos en el caso del ejemplar cultivado en el exterior que describimos en el *Capítulo 2*, podemos encontrar similitudes y diferencias. Por un lado, el contenido de cannabinoides totales obtenido en las condiciones de cultivo indoor llevado a cabo en la caracterización de la variedad CAT3 no presentó diferencias significativas con el observado en el cultivo outdoor de la misma variedad (*Figura 8.3*). Tampoco se observaron diferencias significativas en la producción del cannabinoide mayoritario, THCA, entre estas dos condiciones de cultivo ni en las de CBDA. Sin embargo, hemos observado diferencias significativas en los cannabinoides neutros producidos por esta variedad; es decir THC y CBD.

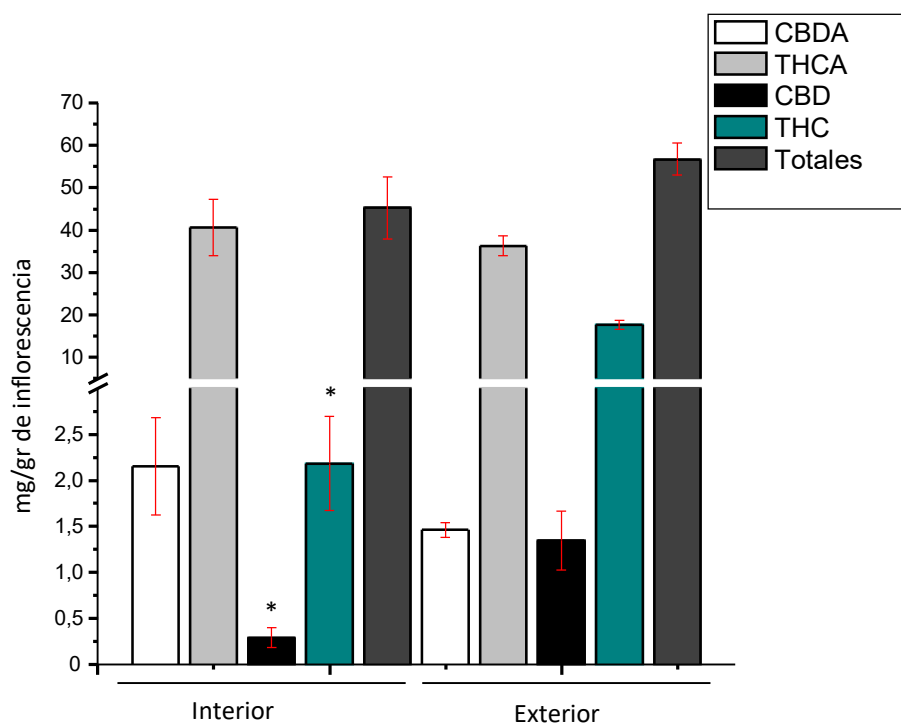


Figura 8.3. Perfil cannabinoide en mg/gr de inflorescencias cultivadas en interior (N=20) y exterior (N=3) (Media \pm SD). (*) Indica diferencias significativas respecto a lo determinado en exterior, ANOVA ($p < 0.05$).

En el caso de las plantas de CAT3 caracterizadas en condiciones de cultivo indoor, observamos una disminución significativa en la producción de THC ($37,75 \pm 6,09$ mg/gr) respecto de la que expresaba la misma variedad en condiciones de cultivo outdoor ($49,74 \pm 3,11$ mg/gr).

Derivaciones	Interior	Exterior
THC total	* 37,75 ± 6,09	49,74 ± 3,11
CBD total	2,17 ± 0,56	2,61 ± 0,39
THC/CBD	17,37 ± 2,57 (17:1)	18,91 ± 1,64 (19:1)
CBDA/CBD	*7,46 ± 1,06	1,09 ± 0,30
THCA/THC	*18,11 ± 1,98	2,06 ± 0,01
Ácidos/Neutros	*17,31 ± 2,19	1,99 ± 0,03

Tabla 2.3. Cantidad total de THC y CBD en mg/gr de inflorescencias y resultados de las relaciones THC/CBD, CBDA/CBD, THCA/THC y Ácidos/Neutros

Cuando comparamos la relación THC/CBD obtenida en esta variedad cultivada indoor respecto lo observado en cultivo outdoor vemos, que a pesar de las diferencias observadas en los cannabinoides individuales, no resulta significativamente diferente en una condición respecto a la otra. Sin embargo, esta generalización esconde diferencias de relación entre cannabinoides que resulta importante tener en cuenta especialmente cuando hablamos de empleo terapéutico de productos derivados de variedades de Cannabis. Así observamos aumentos significativos de las relaciones CBDA/CBD (7,46 ± 1,06 mg/gr), THCA/THC (18,11 ± 1,98 mg/gr) y Cannabinoides Ácidos totales/Cannabinoides neutros totales (17,31 ± 2,19 mg/gr) en la variedad cultivada en condiciones indoor respecto de los mismos valores obtenidos en cultivo outdoor (CBDA/CBD: 1,09 ± 0,30 mg/gr; THCA/THC: 2,06 ± 0,01 mg/gr; Ácidos/Neutros: 1,99 ± 0,03 mg/gr). Estas relaciones que indican la preponderancia de cannabinoides ácidos respecto de los neutros, tanto de cannabinoides particulares como totales, aumentan entre 7 y 8 veces en los cultivos indoor respecto del cultivo outdoor. Por lo tanto, aun cuando la generalización en la relación THC/CBD, habitualmente empleada para caracterizar un extracto o una variedad de Cannabis, no varía en las distintas condiciones de cultivo; se encuentran variaciones en las relaciones que involucran cannabinoides ácidos y neutros, lo cual indica que el perfil de cannabinoides producidos en ambas situaciones de cultivo es diferente aun cuando se trate de una misma variedad; favoreciéndose la producción de cannabinoides ácidos en condiciones indoor.

Conclusiones particulares:

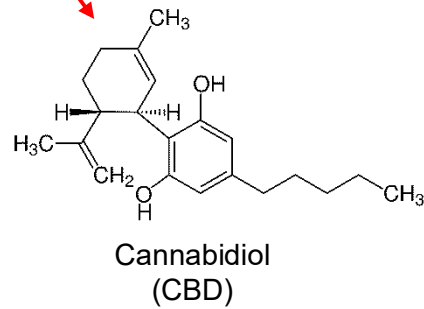
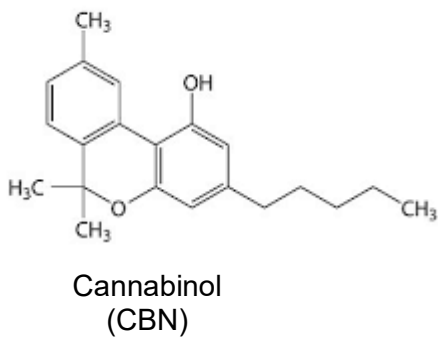
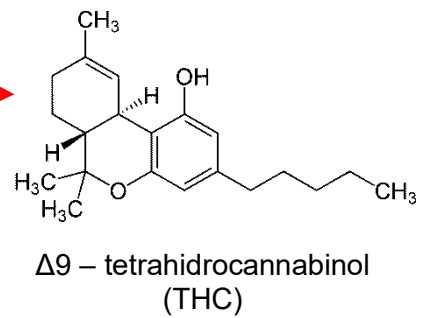
Nuestros resultados sobre la Caracterización de la Cepa Argentina Terapéutica N° 3 (CAT3), indican que las plantas de esta variedad cultivadas en condiciones de laboratorio indoor presentan un desarrollo homogéneo, produciendo individuos que mantienen las mismas características fenotípicas en distintas generaciones y que

además son similares a las desarrolladas por los ejemplares cultivados outdoor; más allá de la altura total alcanzada que resulta influida por el desarrollo en contenedores (cultivo indoor) o en tierra (cultivo outdoor). La homogeneidad entre los ejemplares cultivados indoor se expresó también en cuanto al perfil de cannabinoides, tanto cualitativa como cuantitativamente. Esta homogeneidad permite mantener y generar material vegetal que mantenga las mismas características en el tiempo; y que pueda ser empleado en estudios de ciencia básica y aplicada.

Así mismo, la variedad CAT3 presentó diferencias en la proporción de los cannabinoides ácidos y neutros producidos respecto de los que produce la misma variedad en condiciones outdoor. Esto resulta interesante debido al impacto que tiene esta característica en los productos derivados de esta variedad dependiendo de si fue cultivada indoor u outdoor; y las implicancias que pueda tener en el uso terapéutico de los mismos.

Capítulo 4

Purificación de Cannabinoides a partir de material vegetal.



Capítulo 4: Purificación de Cannabinoides a partir de material vegetal.

Dado que para los estudios científicos sobre Cannabis terapéutico en proyectos de investigación de ciencia básica y aplicada es necesario contar con cannabinoides de forma aislada, comenzamos a trabajar en estrategias de purificación de los mismos a partir de materiales vegetales. Para ello, en este caso, empleamos prensado de Cannabis que fue puesto a nuestra disposición con fines de investigación científica por el Juez Federal interino Dr. Federico Villena, a cargo del Juzgado Federal de Primera Instancia en lo Criminal y Correccional N° 2 de Lomas de Zamora, Secretaría N° 6.

A partir de este material vegetal se realizó una extracción en etanol de acuerdo a lo descrito en la sección de *Materiales y Métodos*; obteniendo un extracto inicial (E0) de color negruzco (*Figura 1.4 A*). Con el fin de generar un extracto más limpio que estuviera libre de pigmentos y otros componentes, pero que aún conservara una cantidad significativa de los cannabinoides presentes en la muestra inicial, se empleó una columna de carbón activado (*Figura 1.4. B*) por la cual se eluyeron 30 ml del extracto alcohólico inicial.

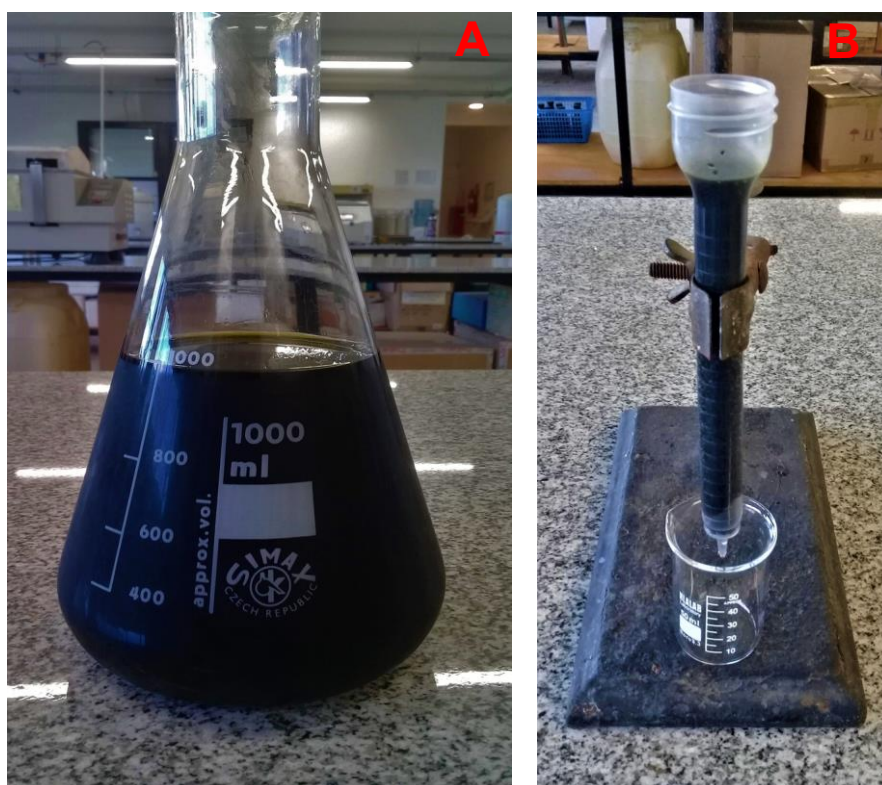


Figura 1.4. Imágenes del extracto de partida (A) y de la columna rellena de Carbón activo que se utilizó para la limpieza del extracto (B).

Primero 15 ml del extracto E0 fueron pasados lentamente por la columna de carbón activado recogiendo el eluido. A partir de este procedimiento se obtuvo una primera fracción E1 de 6 ml. Seguidamente se pasaron por la columna de extracción los 15 ml restantes de E0, recolectando un segundo eluido E2 también de 6 ml.

Como resultado de este procedimiento obtuvimos dos fracciones eluidas con características distintas. La fracción E1 resultó límpida e incolora, mientras que la fracción E2, si bien fue límpida, presentó una coloración ámbar (*Figura 2.4 D*).

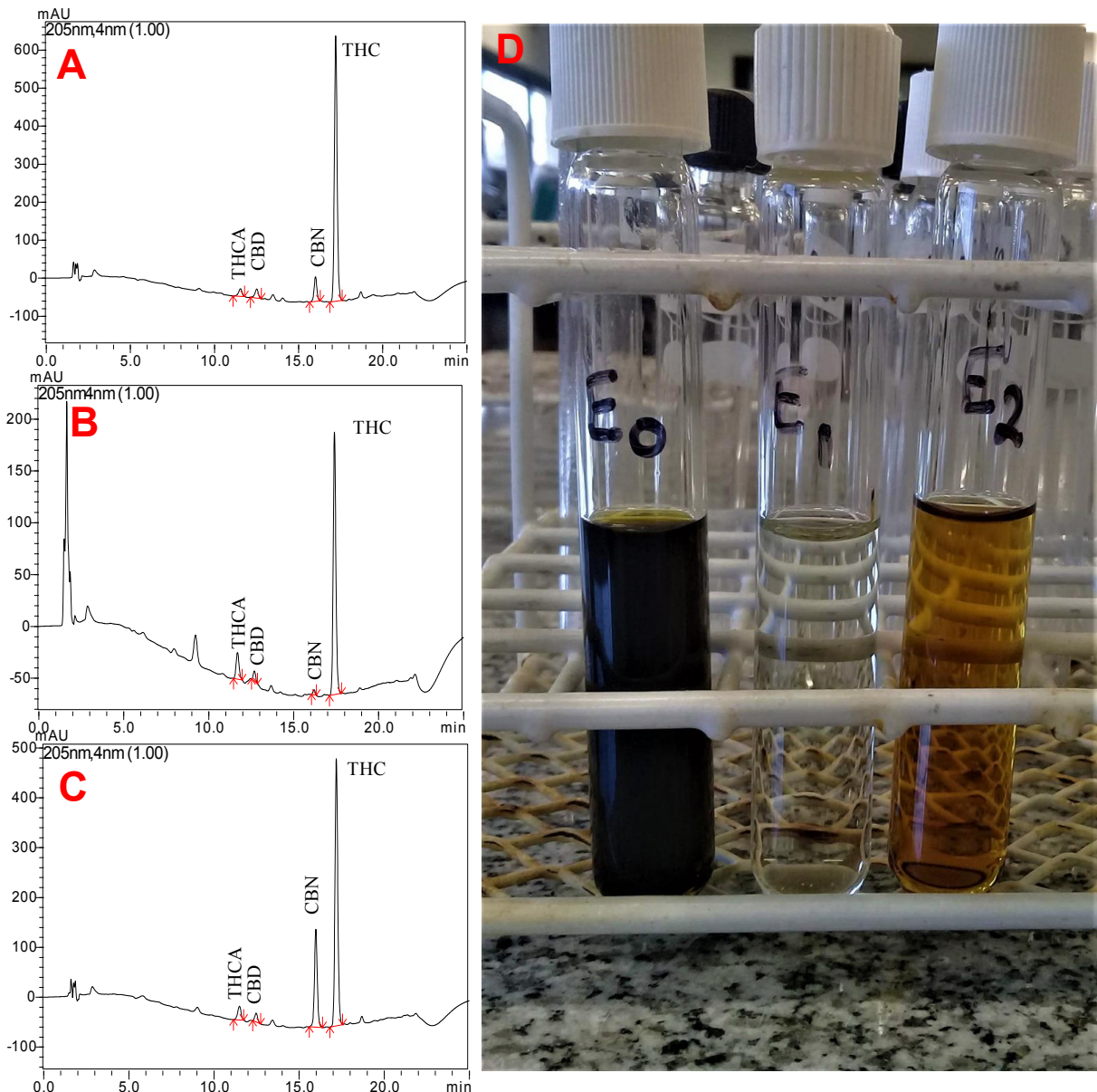


Figura 2.4. A la izquierda pueden observarse los cromatogramas correspondientes para el extracto E0 (A) (D 1/200), extracto E1 (B) (D 1/20) y extracto E2 (C) (D 1/100). En imagen D pueden observarse los extractos E0, E1 y E2.

Seguidamente analizamos el contenido de cannabinoides en diluciones apropiadas del extracto E0 y de las fracciones E1 y E2. De esta forma, determinando que cannabinoides contenían y en que concentraciones, seleccionamos la fracción más conveniente para llevar a cabo el posterior aislamiento de los mismos.

En la *Figura 2.4* se presentan cromatogramas representativos de cada uno de los extractos analizados. En todas las fracciones se observa la presencia de CBDA, THCA, CBN y THC. En todos los casos el cannabinoide mayoritario hallado fue el THC. Así mismo, en el caso de la fracción E2 también se observó una presencia relativamente importante de CBN. Usualmente, cuando estudiamos cannabinoides en materiales vegetales, encontramos una alta proporción de cannabinoides en forma ácida ya que la planta los produce mayoritariamente de esta forma. Sin embargo, en este caso debemos considerar que estamos trabajando con un material vegetal prensado; por lo cual en el proceso sufrido desde el cosechado, secado y prensado del mismo, probablemente haya estado expuesto a altas temperaturas (fundamentalmente durante el secado) o a un almacenamiento incorrecto de este material. Estas características explican la presencia mayoritaria de cannabinoides en forma neutra, particularmente en el caso del THC, y la presencia de CBN en el extracto obtenido a partir de este material.

Cannabinoides	E0	E1	E2
THCA	0,40 ± 0,12	0,04 ± 0,02	0,27 ± 0,07
CBD	0,54 ± 0,09	0,02 ± 0,01	0,16 ± 0,02
CBN	1,45 ± 0,21	0,02 ± 0,01	2,02 ± 0,17
THC	12,38 ± 0,58	0,43 ± 0,08	4,75 ± 0,21
Totales	14,77 ± 0,82	0,50 ± 0,16	7,20 ± 0,66

Tabla 1.4: Perfil de cannabinoides de los extractos E0, E1 y E2. Las concentraciones se expresan en mg/ml de extracto. (Media ± SD).

La cuantificación de los cannabinoides presentes en las fracciones indicó que la fracción E1 presentó una concentración de cannabinoides totales (0,50 ± 0,16 mg/ml) que representa sólo un 3% de la concentración en el extracto inicial E0 (14,77 ± 0,82 mg/ml); mientras que en la fracción E2 (7,20 ± 0,66 mg/ml) se observó un 49% respecto de los cannabinoides totales en E0 (*Tabla 1.4*). Tomando los cannabinoides en conjunto estos resultados nos indican que la fracción E1 si bien era una solución límpida e incolora,

presentaba una cantidad de cannabinoides a purificar baja respecto del material de partida; mientras que la fracción E2, aun cuando presentó una coloración ambar lo cual indica la presencia de otras sustancias acompañantes que le dan esa coloración, exhibió una concentración de cannabinoides 14 veces mayor que E1, lo cual la convierte en un mejor material a partir del cual realizar los aislamientos de los cannabinoides. Además, si observamos los valores de concentración para los cannabinoides por separado en la fracción E2, el THC ($4,75 \pm 0,21$ mg/ml) y el CBN ($2,02 \pm 0,17$ mg/ml) se encuentran en niveles que hacen posible la recuperación de los mismos en cantidades aceptables.

Estas características fueron los criterios de selección empleados en la decisión de realizar la purificación a partir de la fracción E2.

La purificación se llevó a cabo por una técnica semipreparativa en HPLC-UV/DAD descrita en la sección *Materiales y Métodos*. En la corrida cromatográfica de E2 en este sistema (*Figura 3.4 A*) observamos los picos correspondientes a THC y CBN presentes en la fracción con una buena resolución y distancia entre picos adecuada para proceder a la separación de los mismos.

Luego de 8 inyecciones de 10 μ l de la fracción E2, se recolectaron 11 ml de purificado de CBN y 14 ml de purificado de THC. Estas fracciones fueron analizadas según la técnica analítica para confirmar la identidad y cantidad de los cannabinoides. Tanto el cromatograma correspondiente al análisis del purificado de CBN (*Figura 3.4 B*) como el del purificado de THC (*Figura 3.4 C*) presentaron un solo pico cromatográfico; lo cual indica que en cada fracción existe al menos una sustancia. El pico cromatográfico en cada caso pudo identificarse por esta técnica dada la coincidencia en los tiempos de retención de cada pico y el estándar analítico respectivo; y los espectros de absorción en el UV característicos de cada sustancia (*Figuras 3.4 D y E*).

La cuantificación de cada uno de los purificados arrojó una concentración de $10,75 \pm 0,02$ μ g/ml en el caso del purificado de CBN y de $21,64 \pm 0,12$ μ g/ml para el purificado de THC. En este proceso de purificación a partir de 0,162 mg totales de CBN inyectados se recuperaron en el purificado 0,118 mg de CBN; lo cual constituyó una eficiencia de recuperación del 73% (*Tabla 2.4*)

En el caso del THC, los miligramos totales inyectados fueron de 0,380 mg, encontrándose en el purificado de THC 0,303 mg. En este caso el porcentaje de recuperación encontrado fue del 80% (*Tabla 2.4*).

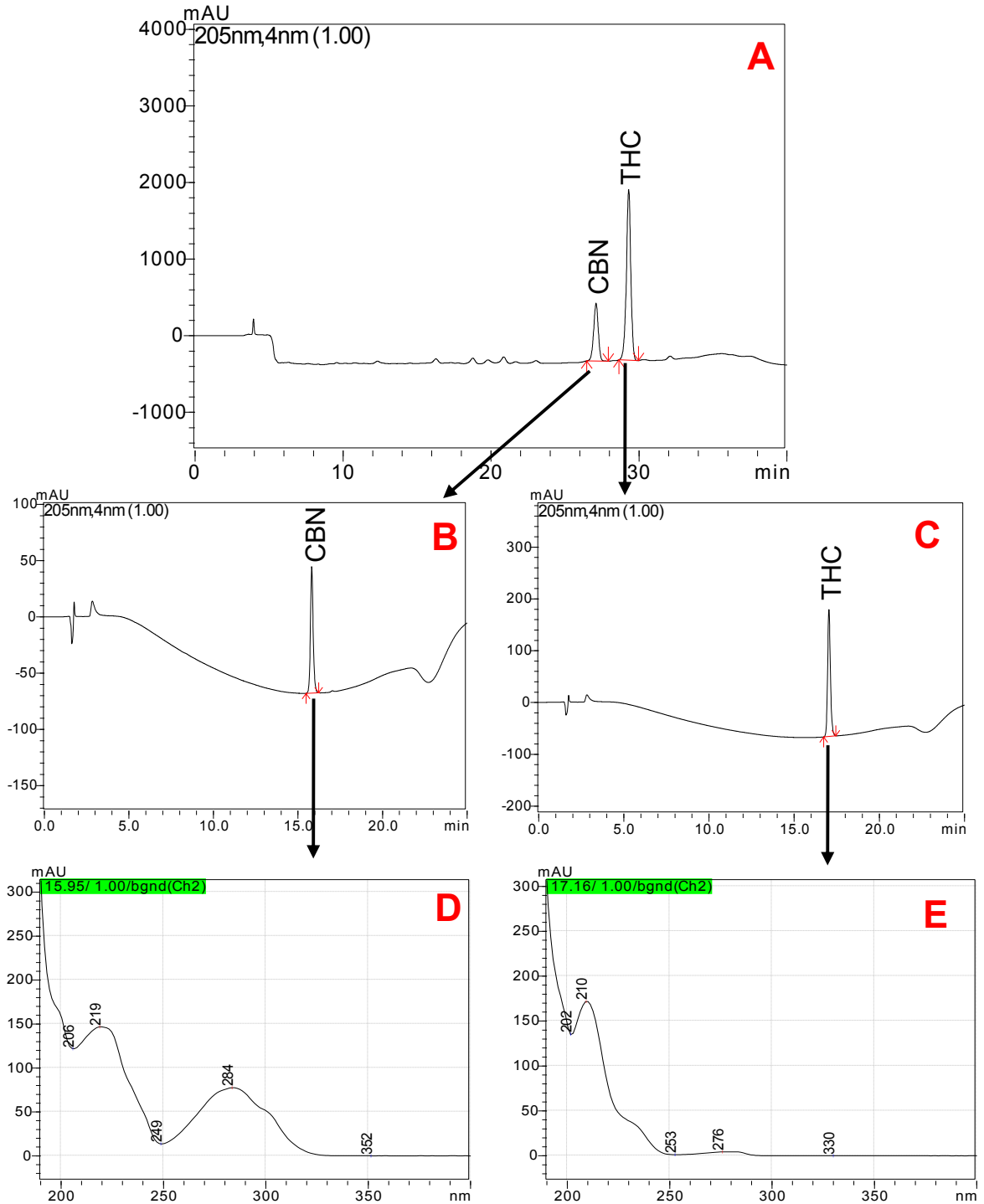


Figura 3.4. Se observan cromatogramas correspondientes a la solución E2 analizada por la columna preparativa (A), a los purificados obtenidos de CBN (B) y THC (C) con un tiempo de retención de 15,92 y 17,01 min respectivamente, analizados según técnica analítica. En las figuras D y E se muestran los espectros de absorción a 205 nm del CBN y THC, respectivamente.

Compuestos	Inyectado	Purificado	Eficiencia de recuperación %
CBN	0,162	0,118	73
THC	0,380	0,303	80

Tabla 2.4. Cantidad de CBN y THC (mg) inyectados en la columna y purificados. También se muestra la eficiencia en la purificación (%).

Con el fin de confirmar la identidad de los analitos purificados en cada fracción se realizó la detección de los cannabinoides presentes empleando un detector más sensible y específico como el MS-MS. Para ello analizamos las fracciones purificadas de CBN y THC por este método. Estas soluciones fueron inyectadas directamente (sin columna) en el detector del equipo HPLC MS/MS Quattro Premier XE (Waters®), realizando un barrido entre 40 y 400 Dalton. En la *Figura 4.4* se aprecia la detección del ion molecular de CBN tanto en modo de ionización positiva (ESI+) (*Figura 4.4 A*) como negativa (ESI-) (*Figura 4.4 B*).

Así mismo, se aprecia el registro de la totalidad de los iones presentes en el purificado también en ionización positiva y negativa, que en conjunto confirman la presencia de CBN en un alto grado de pureza ya que no se aprecia la presencia significativa de otros compuestos.

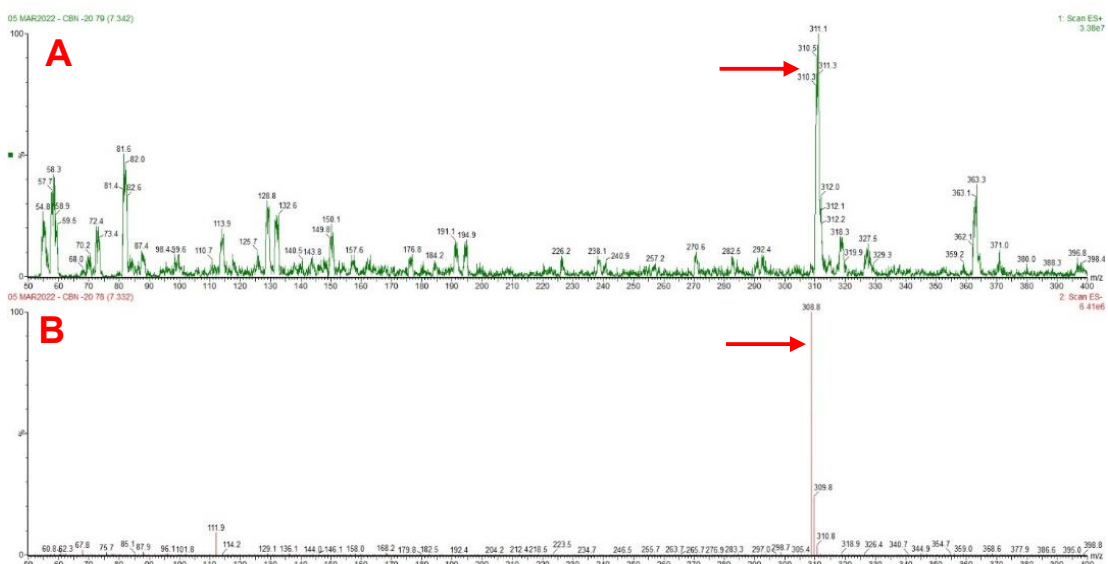


Figura 4.4. Registro de masas correspondiente al purificado de CBN. Se muestra el registro total de los iones entre 40 y 400 Daltons (A), con la presencia del ion molecular $M-H$ de 309 Daltons (B).

En las condiciones de trabajo el modo de ESI- es más sensible a la presencia de CBN que ESI+. El PM de CBN es de 310 gr. En modo positivo ESI+ se ve un ion de 311, a la inversa en modo negativo ESI- se aprecia un ion de 309 Daltons.

En la *Figura 5.4* se ve el registro del ion molecular de THC (PM 314 gr) tanto en ionización positiva (ESI+) (*Figura 5.4 A*) como negativa (ESI-) (*Figura 5.4 B*). Así mismo se aprecia registro de la totalidad de los iones presentes en el purificado también en ionización positiva (*Figura 5.4 A*) y negativa (*Figura 5.4 B*) que en conjunto confirman la presencia de THC en un alto grado de pureza ya que no se aprecia la presencia significativa de otros compuestos.

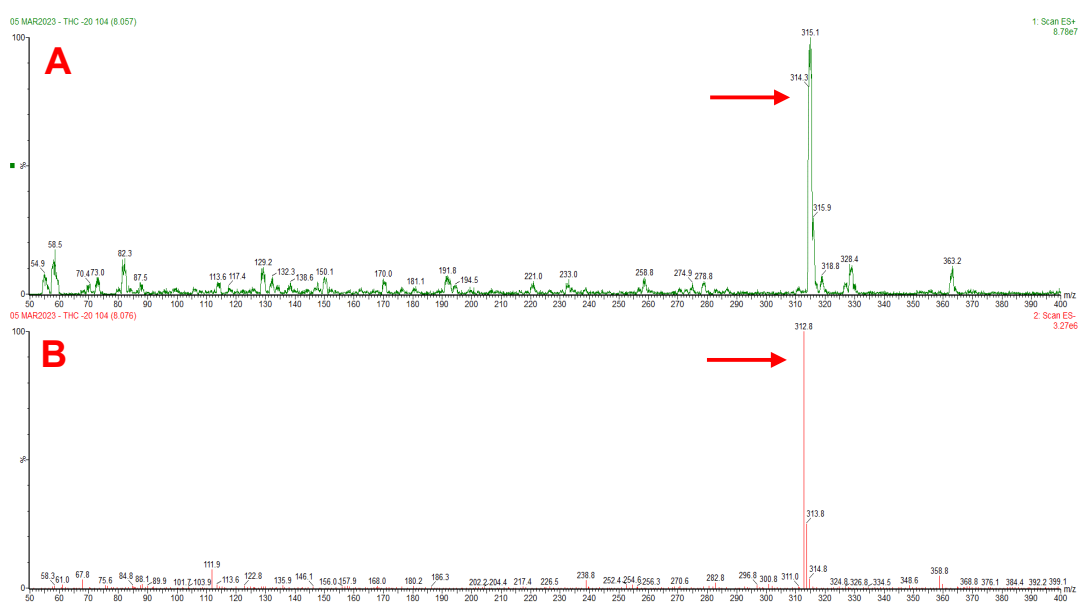


Figura 5.4. Registro de Masas correspondiente al purificado de THC. Se muestra el registro total de los iones entre 40 y 400 daltons (A), con la presencia del ion molecular M-H de 312 Daltons.

Por lo tanto, el proceso empleado generó cannabinoides (CBN y THC) purificados con un rendimiento aceptable y en una condición de pureza determinada por dos métodos de detección diferentes e independientes, lo cual indica que estos materiales generados podrían ser empleados como insumos en estudios de ciencia básica y aplicada.

Conclusiones particulares:

Nuestros resultados indican que el protocolo de purificación propuesto fue efectivo en cuanto a la remoción de sustancias acompañantes en el extracto obtenido a partir del material vegetal prensado. Como primer paso empleamos sustancias como el carbón activado, que remueven esas sustancias acompañantes a partir de procesos inespecíficos como la adsorción superficial. Esto genera que, si bien quedan retenidas

en la columna esas sustancias interferentes, también quedan retenidas una proporción de los cannabinoides que queremos purificar; lo cual implica una pérdida de analitos de interés. Aun cuando es necesario desarrollar mejores sistemas iniciales de limpieza de matriz, hemos podido obtener fracciones de características adecuadas en cuanto al contenido de cannabinoides para proceder a la separación y purificación a partir de la matriz inicial. Este proceso resultó en dos cannabinoides (THC y CBN) purificados con rendimientos y calidad aceptables. Es necesario desarrollar metodologías que permitan purificar y aislar también los cannabinoides que se encuentran en baja proporción a fin de poder contar con otros cannabinoides para la investigación básica y clínica.

Esta capacidad resulta importante desde el punto de vista tecnológico ya que, dada la situación legal actual del Cannabis en Argentina, muchas veces resulta costoso y complicado adquirir productos a base de cannabinoides, como estándares analíticos, necesarios para llevar a cabo proyectos de investigación básica y aplicada en la temática de Cannabis Terapéutico; con lo cual sienta las bases de la purificación y generación de estos materiales.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

La presente es la primera tesina con el tema de Cannabis Terapéutico que se realiza en la Universidad Nacional de La Plata.

El uso terapéutico del Cannabis ha tomado resonancia desde hace unos años, constituyéndose en una alternativa a la cual la población recurre cada vez más. Debido al prohibicionismo reinante durante muchos años en muchos países, en el mercado farmacéutico no existen alternativas de fácil acceso y económicas para la población. Por lo cual el autocultivo y el procesamiento casero de fitopreparados a base de Cannabis es la vía más común en la que los pacientes y sus familias hoy en día se acercan a la terapéutica con Cannabis, muchas veces acompañados de los médicos tratantes. Esta situación hace que adquiera relevancia la necesidad de realizar estudios sobre las variedades que los pacientes utilizan y sobre los procesos que ellos emplean para realizar los preparados.

Esta tesina comienza además un trabajo de recopilación de conocimientos extra universitarios que, a su vez, los profundiza y enmarca dentro de un contexto científico académico. Y este nuevo conocimiento recrea herramientas que se devuelven y devolverán a los usuarios para mejorar las prácticas en el uso de Cannabis Terapéutico. Así por ejemplo debemos reconocer el valioso aporte de cultivadores tanto en la entrega del material a cultivar, así como en el traspaso del conocimiento y la práctica del cultivo y sus pormenores.

En el trabajo desarrollado hemos cumplido los objetivos planteados, generando desarrollos y datos que aportan al avance en el tema del Cannabis Terapéutico. Las tareas y determinaciones realizadas me permitieron adquirir experiencia en cuanto a las actividades de laboratorio, técnicas analíticas, diseño experimental, escritura de trabajos científicos y trabajo en grupo.

En este trabajo hemos avanzado en determinar las características generales y puesta en cultivo en condiciones controladas de laboratorio de tres variedades de *Cannabis sp.* empleadas usualmente con fines terapéuticos por organizaciones sociales de nuestra región. Así mismo, hemos desarrollado las capacidades analíticas necesarias para la extracción de cannabinoides presentes en las mismas y la determinación de los mismos. Estos aportes resultan interesantes desde el punto de vista de generar la posibilidad de caracterizar distintos productos a base de Cannabis y obtener material vegetal o sub-productos caracterizados que mantengan sus características en el tiempo y puedan ser empleados en estudios de investigación básica y aplicada.

Por otro lado, los resultados derivados de esta tesina, ponen de relevancia las similitudes y diferencias que presenta una variedad como CAT 3 al ser cultivada en

distintas condiciones (indoor y outdoor). Estos resultados aportan conocimiento que es necesario tener en cuenta, ya que esta variedad generada por el cultivador Daniel Loza y entregada solidariamente a pacientes y familias y a nuestro grupo de trabajo con fines científicos, es una variedad ampliamente utilizada en nuestra región para la preparación casera de fitopreparados. En esta situación los pacientes y familias que la utilizan la cultivan en diversas condiciones, algunos con cultivos indoor y otros con cultivos outdoor. Por ello es necesario avanzar en estudios sobre distintas condiciones de cultivo de las variedades de Cannabis ya que, por ejemplo, la proporción entre cannabinoides ácidos y neutros resulta diferente en ambas condiciones; generando a su vez productos que, aunque derivados de la misma variedad tienen diferentes características terapéuticas. Además, debemos tener en cuenta que las hojas de estas plantas no deben ser descartadas como posible fuente de cannabinoides para la obtención de fitopreparados, no sólo por el contenido que presentan de los mismos sino porque al presentar diferente relación THC/CBD que las inflorescencias (tradicionalmente empleadas por su mayor contenido de cannabinoides en la producción de tinturas, resinas y aceites) podrían generar alternativas de producción con una relación diferente de THC/CBD para una misma variedad de *Cannabis sp.*

Por último, hemos avanzado en la purificación efectiva de cannabinoides a partir de materiales vegetales de Cannabis; lo cual adquiere relevancia teniendo en cuenta por un lado la dificultad, dada la situación legal del Cannabis, de conseguir materiales a base de cannabis en nuestro país como estándares analíticos y por otro la posibilidad de generar extractos o aceites con diferentes proporciones de cannabinoides, insumos fundamentales para investigaciones científicas y tecnológicas.

En el marco de esta tesina se presentaron los siguientes trabajos en reuniones científicas:

Primera Expo Cannabis Argentina. CABA. Argentina. 4 al 6 de octubre de 2019:

Zunico L., Marchesinni A., Lizzi S., Arzoz C., Uranga M., Salas Adotti D., Vaccarini C., Malaissi L., Bugvila C., Colmeiro M., Cabrera J., Cima J., Brunetti A., García V., Ibañez A., Williman M., Nagore J., Epul L., Monzón J., Sedan D., Andrinolo D. Primer Cultivo Universitario de Cannabis sp. Caracterización de la Cepa Argentina Terapéutica 3 (CAT3); una variedad terapéutica ampliamente utilizada en la región de La Plata.

Cabrera J., Malaissi L., Cima J., Colmeiro M., Nagore J., Bugvila C., Brunetti A., Monzón J., Williman M., Salas Adotti D., Marchesini A., Vaccarini C., García V., Zunico L., Arzoz C., Uranga M., Lizzi S., Ibañez A., Epul L., Andrinolo D., Sedan D.

Cannabis y Extensión Universitaria. Cultivando Saberes con Organizaciones Sociales y Derribando Fronteras del Prohibicionismo.

Vaccarini C., Salas Adotti D., Malaissi L., Colmeiro Moreno M., Cabrera J., Andrinolo D., Sedan D. Análisis del perfil cannabinoide en los tejidos de Cannabis sp., frente a diversos procesos y etapas de la obtención de fitopreparados usualmente empleados en terapéuticas con Cannabis.

Sedan D., García Habegger E., Vaccarini C., Zappia R., Peré J., Andrinolo D. Cannabis en Clínica Médica: Primera Evaluación de Pacientes que reciben tratamiento complementario con aceite de Cannabis en Argentina.

Andrinolo D., Sauri A., Vaccarini C. A., Montiel R., Elychiri M., Iwan M., Loza M., Rinkewich C., Soto B., Sedan D. Experiencia de uso de cannabis en pacientes del Servicio de Cuidados Paliativos del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo.

Cannabinoid Conference 2019. Berlín, Alemania. 31 de octubre al 3 de noviembre 2019:

Andrinolo D., Sauri A., Vaccarini C., Sedan D. Experience in the use of Cannabis on patients from the Department of Palliative Care of the Angel Roffo Hospital for Oncologic Care.

Andrinolo D., García Habegger E., Vaccarini C., Zappia R., Pere J., and Sedan D. Cannabis in Medical Service: First Evaluation of Patients Receiving adjuvant treatment with Cannabis Oil in Argentina.

Sauri A., Montiel R., Andrinolo D., Vaccarini C., and Sedan D. CASE REPORT: Medical Cannabis for Pain Control in Palliative Care Unit from “Angel H. Roffo” Oncological Institute, an observational protocol.

Andrinolo D., Vaccarini C., Salas Adotti D., Malaissi L., Colmeiro Moreno M. A., Cabrera J., Garroni A., Zunico L., Cima J., Marchesini A. and Sedan D. Cannabinoid Profile Analysis in Cannabis sp. tissues. Evaluation of several procedures and production stages of phytomedicinal productos usually employed in treatment with cannabis.

Otros congresos:

Vaccarini C., Sedan D., Salas D., Garroni A., Aranda O., Andrinolo D. Caracterización de cannabinoides mediante HPLC/UV-DAD en semilla, raíz, hoja y flores de una especie de Cannabis empleada con fines medicinales. Argentina. Buenos Aires. 2018. Libro. XIV TIAFT Latin-American Regional Meeting I International meeting on NPS & Drug design. TIAFT. UADE, Buenos Aires, Argentina. 26 al 28 de noviembre de 2018.

Vaccarini C., Salas Adotti D., Malaissi L., Colmeiro Moreno M., Cabrera J., Andrinolo D., Sedan D. Análisis del perfil cannabinoide en los tejidos de Cannabis sp., frente a diversos procesos y etapas de la obtención de fitopreparados usualmente empleados en terapéuticas con Cannabis. XXI Congreso Argentino de Toxicología. Asociación Toxicológica Argentina (ATA). Polo Científico Tecnológico. CABA. 18 al 20 de septiembre de 2019.

Vaccarini C., Malaissi L., Salas D., Sedan D. Cannabis terapéutico: estudio del perfil cannabinoide por HPLC/UV-DAD en diferentes estructuras de la planta, frente a diferentes procesos y etapas de la generación de fitopreparados. XXVII Jornadas de Jóvenes Investigadores. Universidad Federal de Sao Carlos (UFSCar), Sao Carlos, Brasil. 23 – 25 octubre de 2019.

Salas Dante, Cabrera Julieta, Colmeiro Maria, Bugvila Cristina, Marchesini Ana, Vaccarini Cristian, Cima Julián, Malaissi Luciano, Williman Macarena, Brunetti Antual, García Violeta y Andrinolo Darío. “Cannabis y extensión: Derribando fronteras del prohibicionismo y acercando conocimientos de organizaciones sociales a la universidad” aprobado y presentado en la XXVII Jornada de Jóvenes Investigadores de AUGM que se desarrolló en la Universidad Federal de São Carlos (UFSCar), Brasil, el 23, 24 y 25 de octubre de 2019.

Para completar el estudio presentado en esta tesina es necesario continuar avanzando en el abordaje de los distintos procesos de extracción y preparación de resinas y aceites que la población utiliza, los cuales son muy variados, con el fin de evaluar eficiencia de obtención, procesamiento y posibles degradaciones y contaminaciones con el objetivo de reducir daños. Así como avanzar en el estudio de otros metabolitos secundarios como terpenos, flavonoides, esteroides, que estén presentes en el material vegetal y los

derivados del mismos con el fin de aportar al entendimiento de la interacción de todos compuestos de forma sinérgica o sumatoria, conocido como efecto séquito (Russo et al., 2011).

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, S. A., Ross, S. A., Slade D., Radwan, M. M., Khan, I. A., ElSohly, M. A. (2015). *Phytochemistry*, 117, 194-199.
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria N. and Usobiaga A. (2007). *Bentham Science Publishers Ltd.* 8, 237-243237
- Andrinolo, D., Sedán, D., Telese, L., Aura, C.; Masera, S., Giannuzzi, L., Marra, C. A. and Alaniz, M. (2008). Hepatic recovery after damage produced by sub-chronic intoxication with the cyanotoxin microcystin-LR. *Toxicon* 51 (3), 457-467.
- Ben Amar, M. (2006). Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 1–25.
- Citti, C., Ciccarella, G., Braghiroli, D., Parenti, C., Vandelli, M. A., and Cannazza, G. (2016). Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 128, 201–209
- Cleary, B., Greaves, R. (1977). Determining planting stock needs. En: *Proc. Tree Planting in the Inland Northwest*. Baumgartner D. M., Boyd R., eds. Washington State University Cooperative Extension Service.
- De Backer B, Debrus B, Lebrun P, Theunis L, Dubois N, Decock L, Verstraete A, Hubert P, Charlier C. (2009). Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of Chromatography B*, 877, 4115–4124.
- De Petrocellis L., Di Marzo V. (2009) An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. PhD
- Di Marzo, V. and Piscitelli, F. (2015). The endocannabinoid system and its modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics* 12.
- ElSohly, M., Grotenhermen, F., Russo, E., (2002). Chemical constituents of cannabis. Cannabis and cannabinoids. Pharmacology, toxicology, and therapeutic potential. Binghamton/New York: Haworth Press. p. 27-36.
- ElSohly, M., Gul, W. (2014) In *Handbook of Cannabis*; Pertwee, R., Ed; Oxford University Press: Oxford; pp3-22.
- ElSohly, M. (2002) *Marijuana and the Cannabinoids* Edited by Mahmoud A., PhD.
- ElSohly, M., Slade, D. (2005). *Life Sci.* 78, 539-548.
- Elzinga, S., Fishedick, J., Podkolinski R., and Raber, J. (2015). Cannabinoids and Terpenes as Chemotaxonomic Markers in Cannabis. *Natural Products Chemistry & Research*. 3:4.
- Farmacopea Argentina (2003). Séptima edición.
- Greydanus, D. E., Hawver, E. K., Greydanus, M. M. and Merrick, J. (2013). Marijuana: current concepts. *Frontiers in Public Health*. 1-17.

Hazekamp, A., Tejkalová, K., and Papadimitriou, S. (2016). Cannabis and Cannabinoid Research 1, 202-215.

Hortwitz, W. (1982). Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. Anal Chem. 54(1):67A.

Iffland, K., Carus, M. and Grotenhermen, F. (2016). Decarboxylation of Tetrahydrocannabinolic acid (THCA) to active THC. European Industrial Hemp Association (EIHA).

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (1995). Q2(R1): Validation of analytical procedures: Text and methodology.

Jin, D., Dai, K., Xie, Z., and Chen, J. (2020) Secondary Metabolites Profled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes. Scientific Reports, 10 (1).

Mechoulam, R. and Parker, L. (2013). The endocannabinoid system and the brain. Annual review of psychology, 62: 21-47.

National Academy of Sciences (NAS). (2017). The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The Current State of Evidence and Recommendations for Research

Pacifico, D., Miselli, F., Carboni, A., Moschella, A., Mandolino, G. (2007). Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of Cannabis sativa L. Euphytica. 10.1007/s10681-007-9543-y

Pertwee, R.G. (2014). Handbook of Cannabis, Oxford: Oxford University Press.

Russo, E. (2007). History of Cannabis and Its Preparations in Saga, Science, and Sobriquet. Biodiversity, 4, 1614-1648.

Russo, E. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. Br. J. Pharmacol. 163, 1344–1364.

Sirikantarmas, S., Taura, F., Morimoto, S. and Shoyama, Y. (2007). Recent Advances in Cannabis sativa Research: Biosynthetic Studies and Its Potential in Biotechnology Current Pharmaceutical Biotechnology. 8, 237-243

Small E. and Cronquist A. (1976). A practical and natural taxonomy for cannabis. Taxon 15 (4): 405-435.

Spinella, M. (2001). The Psychopharmacology of Herbal Medicine. Plant Drugs That Alter Mind, Brain, and Behavior.

Thompson, B. (1985) Seedling morphology: what you can tell by looking. En: Evaluating Seedling Quality: Principles, Procedures, and Predictive Abilities of Major Tests. Duryea M. L., ed. Corvallis, Oregon, FRL, pp. 59-71

Turner, C., ElSohly, M., Boeren, E. (1980). Constituyentes del Cannabis sativa L. Una revisión de los componentes naturales. J. Nat. Pinchar. 43: 169-234.

Unión internacional para la protección de las obtenciones vegetales (UPOV). (2012). Cannabis sativa L. Código UPOV: CANNB_SAT. TG/276/1

Upton, R. et al. (2014) Cannabis inflorescence: cannabis spp.; standards of identity, analysis, and quality control. American Herbal Pharmacopoeia.

Veress, T., Szanto, J. I., Leisztner, L. (1990). Determination of cannabinoid acids by high-performance liquid chromatography of their neutral derivatives formed by thermal decarboxylation. Journal of Chromatography, 520: 339-347.

Zwenger S. (2014)..The Biotechnology of Cannabis sativa. PhD