

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Trabajo Final – Licenciatura en Química

Desarrollo de métodos de análisis de terpenos y compuestos terpenoides por cromatografía. Comparación crítica de resultados obtenidos mediante CG y HPLC.

Giovannoni Sol

La Plata - 2021

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA) para obtener el grado académico de la Licenciatura en Química bajo la dirección de la Dra. Cecilia Castells y la co-dirección de la Dra. Carlina Lancioni.

Contenido

Introducción.....	1
Objetivos.....	8
Materiales y métodos.....	9
Muestras: Cepa Argentina Terapéutica 1, 2 y 3.....	9
Cromatografía	11
Cromatografía Gas-Líquido	11
Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento - HPLC	12
Índices de Retención de Kováts	12
Métodos de pretratamiento	14
Extracción sólido-líquido (SLE)	15
Extracción asistida por microondas (MASE).....	15
Extracción con fluidos supercríticos.....	16
Extracción en espacio cabeza (HSE)	16
Microextracción en fase sólida (SPME).....	16
Antecedentes.....	18
Pretratamientos	18
Cromatografía de gases.....	19
Cromatografía de Líquidos	23
Trabajo experimental en Cromatografía de Gases.....	26
Condiciones experimentales.....	26
Identificación por patrones.....	26
Identificación mediante Índices de Retención de Kováts.....	27
Pretratamiento de muestras.....	29
Extracción con solventes.....	29
Head Space	33
Discusión	40
Perspectivas futuras	42
Bibliografía.....	43
Anexo I	46

Introducción

El Cannabis (*Cannabis sativa* L.) es una planta que se cree originaria de Asia, y ha sido domesticada a lo largo de unos 5000 años. Se trata de un género con tres subespecies: *Cannabis sativa sativa*, *Cannabis sativa indica* y *Cannabis sativa ruderalis*. Las variedades originales, con diferentes características, fueron utilizadas, combinadas y mejoradas a lo largo de la historia para diferentes propósitos. Actualmente no es común encontrar variedades puras, sino híbridos. Su principal interés radica en el contenido de cannabinoides y, en menor medida, de terpenos. Las variedades de Cannabis que presentan una baja concentración de compuestos psicoactivos se utilizan para la producción de fibras y aceites. Sin embargo, las variedades, ricas en terpenos y cannabinoides son las más valiosas por sus propiedades psicoactivas y medicinales. La resina que contiene estos compuestos se produce y acumula en los tricomas de las inflorescencias producidas por la planta hembra sin fertilizar (figura 1) [1]. Los terpenos representan un 10% del contenido de los tricomas de las plantas, y su contenido, al igual que en el caso de cannabinoides, aumenta con la exposición a la luz y disminuye con la fertilidad del suelo [2]. Dichas flores se consumen con fines recreativos para aprovechar estos efectos psicoactivos producidos por los diferentes cannabinoides, aunque las legislaciones de muchos países no lo permitan.

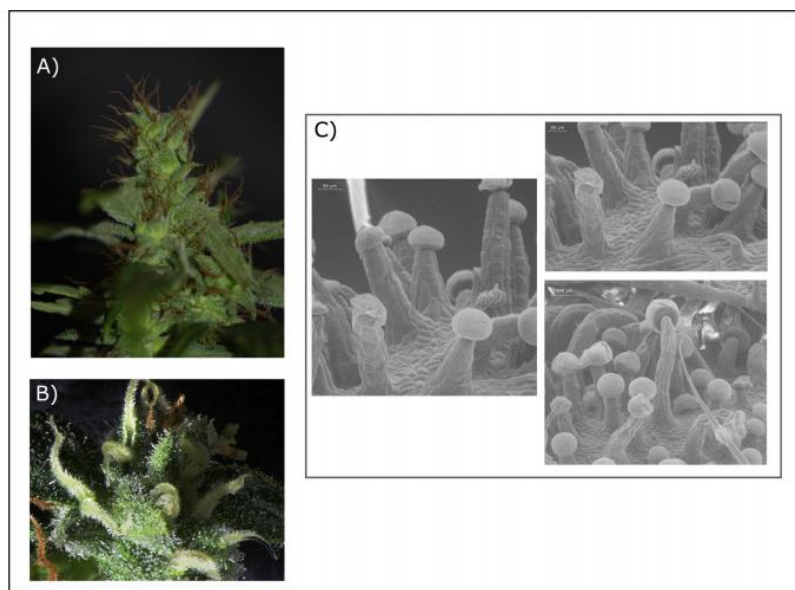


Figura 1 - Inflorescencias en la planta hembra de Cannabis. A) Inflorescencia apical en una cepa de "Purple Kush" luego de 8 semanas de floración; B) Racimo de flores de la cepa "Lemon Skunk" luego de 5 semanas de floración. C) Tricomas glandulares en la superficie de flores de la cepa "Finola"

Los terpenos son compuestos orgánicos volátiles producidos principalmente por plantas que presentan un olor fuerte y característico. Químicamente consisten en una estructura que consta de unidades repetitivas de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) (figura 2), la cual puede encontrarse modificada, por presencia de un oxígeno debido a la oxidación, o bien por reorganización del esqueleto hidrocarbonado, formando lo que se conoce como isoterpenoide o terpenoide. A pesar de esta diferencia, es habitual utilizar la denominación de terpenos para referirse tanto a terpenos como a terpenoides. En forma aislada del material vegetal se utilizan en perfumería, industria farmacéutica y alimenticia, y en prácticas como aromaterapia debido a las propiedades distintivas que aportan cada uno de ellos.

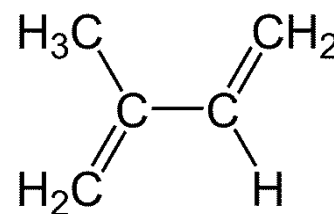


Figura 2 - Estructura del isopreno

Los terpenos se pueden clasificar según la cantidad de unidades de isoprenos que los constituyen: monoterpenos, conformados por dos unidades de isopreno como el limoneno, geraniol o terpineol; sesquiterpenos que consisten de tres unidades de isopreno como el humuleno; y así varía su nomenclatura a medida que aumentan el número de unidades conformacionales (figura 3).

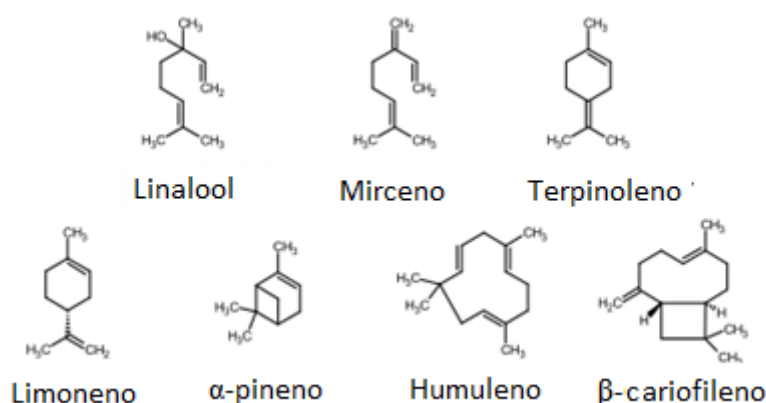


Figura 3 - Estructura de algunos de los terpenos más comunes

Las distintas variedades fenotípicas de plantas de Cannabis y sus productos se clasifican generalmente según a las fragancias que presentan, conferidas principalmente por el contenido en terpenos. La composición fenotípica de los terpenos varía con las distintas plantas, entre ellos encontramos hidrocarburos que se

producen de manera directa por las enzimas terpeno-sintasa (TPS), y también algunos más complejos, modificados por enzimas como la citocromo p450. Otros derivados terpénicos hallados en Cannabis son no enzimáticos y producidos debido a la oxidación o por la acción de la luz UV, entre estos últimos encontramos el óxido de cariofileno, β -elemeno y derivados del mirceno. Además, los terpenos aportan a la planta de Cannabis otras características ya que mostraron ser buenos agentes antimicóticos o antifúngicos, antimicrobianos y antioxidantes, como también buenos insecticidas, sin embargo, su mecanismo de acción no se encuentra del todo definido [3].

Actualmente se reconoce que varios de estos terpenos producen en el consumidor lo que se conoce como “entourage effect” (o efecto sequito, según su traducción literal) que hace referencia a la sinergia entre compuestos cannabinoides y terpenoides. Este efecto condujo al uso de estas plantas y sus aceites para tratamientos contra la depresión, ansiedad, adicción, epilepsia, cáncer e infecciones [4]. Los resultados obtenidos del tratamiento con aceites esenciales para pacientes con depresión demuestran que existe la posibilidad de que haya un efecto positivo a partir de la combinación entre estos compuestos. Por ejemplo, el cannabidiol puro se ha utilizado en estudios de pacientes con ansiedad social y se cree que la adición de compuestos ansiolíticos como el limoneno o el linalool puede contribuir a la eficacia de este cannabinoide [2].

El interés e incremento de reportes en relación al análisis y estudio de la composición de terpenos en Cannabis, aumentó debido al crecimiento del uso con fines medicinales. Como consecuencia de esto, han podido ser identificados al menos 120 tipos de terpenos en estas plantas. Los efectos medicinales del Cannabis se asocian a entre 80 y 100 terpenos que son únicos de estas plantas, cuya combinación con los cannabinoides son objeto de investigación. Algunos efectos conocidos asociados a terpenos individuales son los siguientes.

El α -pineno es un monoterpeno bicíclico y es el más comunmente encontrado en la naturaleza. Se ha demostrado que provee propiedades antiinflamatorias y broncodilatadoras.

El δ -limoneno, es un aceite esencial común del limón y otros cítricos, y el segundo monoterpenoide más abundante en la naturaleza. Es un agente ansiolítico muy poderoso y además, genera la apoptosis de células de cáncer de mama. También demostró ser efectivo contra dermatofitos (hongos queratínicos).


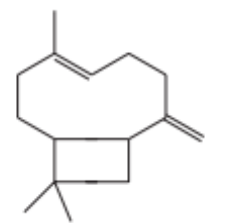

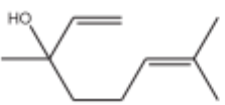
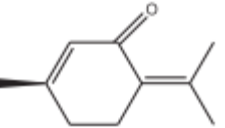
El β -mirceno es otro monoterpenoide muy común en Cannabis, que ha demostrado ser sedativo, de manera que se utiliza en preparaciones para ayudar a conciliar el sueño; relajante muscular y antiinflamatorio. Otros terpenos con poderosa actividad sedativa son el δ -linalool, el nerolidol y el óxido de cariofileno [2].

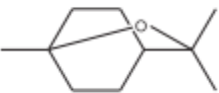
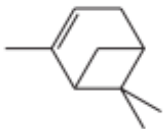
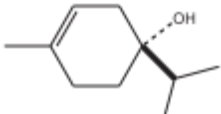
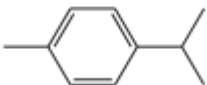
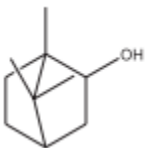
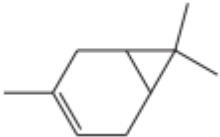
Un terpeno con actividad interesante es la pulegona, también conocido como isopulegona que, si bien es un compuesto minoritario del Cannabis, se encontró que podría aliviar el efecto adverso causado por el tetrahidrocannabinol (THC) relacionado con la pérdida de memoria a corto plazo. La tacrina (Cognex[®]), es una droga utilizada en pacientes con Alzheimer, cuya función es aumentar la actividad acetilcolina mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE). La pulegona muestra la misma actividad que esta droga produciendo la inhibición de la AChE. Otros terpenoides en Cannabis generan este mismo efecto como ser el limoneno, óxido de limoneno, α -terpineno, γ -terpineno, terpinen-4-ol, carvacrol, l- y d-carvona, 1,8-cineol, p-cimeno, fenchona, y 1,2-epoxipulegona [5].

También otros presentan efectos bactericidas como el cimeno o el p-cimeno, éste es un monoterpenoide, activo frente a varias bacterias como la *Candida albicans* y *Clostridium perfringens* [6].

A modo de síntesis en la Tabla 1 se muestran las estructuras de los terpenos más comunes en Cannabis, su punto de ebullición y propiedades que se les atribuyen.

Tabla 1 - Terpenos más comunes en Cannabis, su estructura y propiedades.

Terpeno	Estructura	Punto de ebullición (°C)	Comúnmente encontrado en	Propiedades
β -mirceno		167	Lúpulo	Analgésico, antiinflamatorio, antibiótico, antimutagénico
β -cariofileno		119	Pimienta	Antiinflamatorio, protector gástrico
δ -limoneno		177	Limón	Potenciador del sistema inmunológico, antidepresivo, antimutagénico
Linalool		198	Lavanda	Sedativo, antidepresivo, ansiolítico, potenciador del sistema inmune
Pulegona		224	Menta	Inhibidor AChE, sedativo, antipirético (antifebril)

1,8-cineol (eucaliptol)		176	Eucalipto	Inhibidor de AChE, aumenta el flujo sanguíneo cerebral, estimulante, antibiótico, antiviral, antiinflamatorio
α -pineno		156	Pino	Antiinflamatorio, broncodilatador, estimulante, antibiótico, inhibidor de AChE
Terpinen-4-ol		209	Árbol de Té	Antibiótico, AChE inhibidor
p-cimeno		177	Comino	Antibiótico, AChE inhibidor, anticandidal
Borneol		210	Menta	Antibiótico
δ -3-careno		168	Romero	Antiinflamatorio

El perfil metabólico (metabolic fingerprinting) es un estudio analítico orientado a cuantificar un compuesto o grupo de compuestos en un organismo o grupo de organismos [1]. La realización de un perfil metabólico por cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) acoplados a detector de masas, o ^1H RMN es útil para estudiar la bioquímica, taxonomía, ecología y farmacognosia de las plantas, y también para realizar un control de calidad sobre plantas medicinales [7]. En un trabajo publicado en 2010 por Fishedick [1] se validó una técnica empleando CG-FID (Detector de Ionización en Llama acoplado a Cromatografía de Gases) para realizar el perfil metabólico de terpenos y cannabinoides en Cannabis, y demostraron que éstos estudios permiten distinguir entre diferentes genotipos de la misma cepa.

Esto se ha realizado ya en varias cepas de Cannabis, lo que permite asociar el perfil obtenido, mediante una medida cromatográfica de GC o HPLC, a una determinada cepa (figura 4). Para nombrar algunas encontramos que el Bisabolol se encuentra en altos niveles en “Headband” y “Kush”; el α -Humuleno, en variedades como “Durban Poison”, “Girl Scout Cookies”, “White Widow”, “Grand Daddy Purple” y “Kush”; el Nerolidol en “Jack Herer”, “OG group”, “Gorilla Glue” y “San Fernando Valley”.

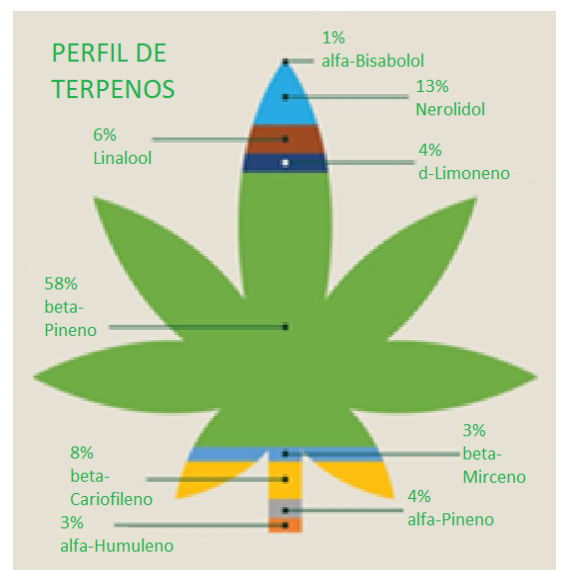


Figura 4 - Perfil metabólico de la cepa “Cold Kreek Kush”

Objetivos

- Realizar una revisión de bibliografía y ensayos preliminares sobre el análisis de terpenos en flores secas de *Cannabis sativa*.
- Comparar críticamente diferentes columnas, técnicas de extracción, fibras de microextracción, condiciones de extracción, a fin de evaluar el contenido cuali-cuantitativo de terpenos y terpenoides extraídos de diferentes plantas y variedades de Cannabis.
- Estudiar la influencia de distintas variables experimentales sobre la resolución y detectabilidad de la señal analítica tanto en GC como en HPLC.
- Fomentar el criterio analítico para el análisis de los datos experimentales adquiridos.
- Validar el método de análisis de terpenos mayoritarios.

Materiales y métodos

Muestras: Cepa Argentina Terapéutica 1, 2 y 3

Las muestras de mayor interés en este trabajo son las Cepas Argentinas Terapéuticas (CAT) desarrolladas por un equipo de científicos del Centro de Investigaciones del Medioambiente (CIM-CONICET/UNLP) a partir de esquejes facilitados por organizaciones de cultivadores como el Club de cultivo Jardín del Unicornio (CAT 1 y 2) y Asociación Cultivo en Familia La Plata (CAT 3). El equipo de investigadores del CIM tiene por objetivo obtener cultivos seguros para tratar diferentes afecciones como Párkinson, esclerosis, cáncer y autismo, entre otros. Investigadores de diversas partes del país han comenzado a participar en su caracterización, aunque aún no hay disponible una caracterización en términos de terpenos.

Al entregarnos las muestras nos comentaron que según el perfil de cannabinoides encontrado en cada una, la CAT 1 y 2 se podrían relacionar con las siguientes cepas:

La muestra CAT 1 es muy similar a la descrita como “Critical Mass CBD” en el banco Dinafem. Se trata de una variedad que produce un efecto relajante, por lo que se consume idealmente para combatir el insomnio y los dolores musculares, y se caracteriza por el olor a frutas, limón y pino, lo que nos da idea de que en ella podemos encontrar grandes cantidades de δ -limoneno y pineno. También se describe como una cepa con relación CBD:THC 1:1 por lo que su efecto psicoactivo no es muy potente. Se trata de una mezcla 80% indica y 20% sativa y se caracteriza por plantas tupidas y robustas con un rendimiento de 700-1200 g de flores (cosecha)/planta [8].

Con respecto a la CAT 2, sería similar a la “AK-47” en el banco Nirvana, también se trata de un híbrido 60% indica y 40% sativa, por lo que se define como “genial para actividades sociales o creativas, debido a que pone al usuario en un estado mental extremadamente alerta” también “genial para obtener inspiración para realizar actividades”. Se caracteriza por el aroma dulce a mango, lo que indica la presencia de mircenolol en ella [9].

La CAT 3 es una cepa desarrollada y cultivada por el profesor Daniel Loza y fue precisamente él quien bautizó a la cepa como ‘Quinto elemento’. Presenta un alto

contenido en THC y se encuentra en proceso de estandarización y caracterización por investigadores, becarios y alumnos del CIM. Si bien no hay mucha información formalizada sobre aplicaciones clínicas de la CAT 3, en una entrevista se describió que posee efectos relajantes y eficaces en el tratamiento de una joven con autismo [10], y además el mismo profesor Loza la utilizó durante mucho tiempo para paliar una enfermedad hepática por la que le dieron 8 años de vida, pero a la que sobrevivió casi 20.

Estas muestras han sido analizadas por Vaccarini [11] en su trabajo final de grado en el laboratorio del CIM. El estudio incluyó la determinación cualitativa y cuantitativa del contenido de cannabinoides en semillas, raíces, hojas e inflorescencias de la cepa CAT 3 mediante el uso de HPLC/UV-DAD a 215 nm. Utilizó una columna BDS Hypersil C18 y una fase móvil de metanol y acetato de amonio 25 mM con las que realizó una corrida en gradiente.

En su trabajo, Vaccarini estudió cada una de las cepas en detalle e informó que la CAT 1 presentaba una velocidad de crecimiento 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, y sus inflorescencias eran pequeñas, pero muy densas y compactas, con un alto contenido de tricomas; e informó que presenta un alto contenido de CBD en relación al THC. Con respecto a la CAT 2, informa que presenta un alto contenido de THC, una velocidad de crecimiento de $(1,8 \pm 0,5)$ cm/día y abundantes ramificaciones, con respecto a sus inflorescencias mostraron ser de forma cónica, sólidas y voluminosas con gran contenido de tricomas. Por último, la CAT 3 es una variedad con alto contenido de THC, presenta una velocidad de crecimiento alta $((2,1 \pm 0,4)$ cm/día) e inflorescencias grandes y poco compactas.

El perfil de cannabinoides se presenta en la tabla 2, en la que se puede observar que las cepas 2 y 3 presentan un alto contenido de THC, mientras que la 1 mostró ser más rica en CBD.

Tabla 2 - Concentraciones de CBDA, THCA, CBD, THC y totales en mg/gr en Cepas Argentinas Terapéuticas 1, 2 y 3

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)

Por lo que podemos observar sobre el trabajo final presentado por Vaccarini, se realizó una caracterización exhaustiva de las cepas mencionadas en relación a su contenido de cannabinoides, pero el contenido cuali/cuantitativo de terpenos y terpenoides quedó sin explorar.

Cromatografía

La cromatografía agrupa un conjunto diverso de métodos que permite separar componentes estrechamente relacionados de mezclas complejas. Se define clásicamente como un proceso de separación que se logra mediante la distribución de sustancias al ser separadas utilizando dos fases, una fase estacionaria y una fase móvil. Algunos solutos se distribuyen preferencialmente en la fase móvil y se mueven rápidamente a lo largo del sistema, y otros que se distribuyen preferentemente en la fase estacionaria; por lo tanto los solutos van a eluir en orden de su coeficiente de distribución con respecto a la fase estacionaria.

Cromatografía Gas-Líquido

En cromatografía de gases, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. En este caso la fase móvil es un gas inerte, generalmente helio, nitrógeno o hidrógeno, que no interacciona con las moléculas del analito, solo lo transporta a lo largo de la columna. En la cromatografía gas-líquido el analito se reparte entre la fase móvil gaseosa y un líquido inmovilizado sobre un soporte sólido inerte (columna rellena) o sobre la pared de un capilar (columna de tubo abierto).

Las virtudes de dicha técnica incluyen las elevadas eficiencias que se logran en la resolución de mezclas complejas, los tiempos cortos de análisis, la gran sensibilidad (detecta fácilmente concentraciones en el orden de las partes por millón), el requerimiento de pequeñas cantidades de muestras y el bajo costo.

Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento - HPLC

La HPLC es una técnica avanzada de la cromatografía líquido-líquido. Consiste en una fase móvil (líquido o mezcla de líquidos) que atraviesa a altas presiones una columna rellena con esferas recubiertas de fase estacionaria. Los detectores más comunes para este tipo de cromatografía incluyen el de absorbancia, electroquímicos y fluorescencia.

Este tipo de cromatografía es ampliamente utilizada por su gran sensibilidad, fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas y aplicabilidad a muchas áreas. Si bien utiliza pequeñas cantidades de muestra, entre 0,5 y 5 μL , requiere el uso de altos volúmenes de solvente. Esto último sumado con el equipamiento necesario la vuelve una técnica relativamente más costosa.

Índices de Retención de Kováts

En cromatografía de gases informar los datos obtenidos como t_R (tiempos de retención) utilizando una determinada fase estacionaria deberían ser suficientes para la identificación de los componentes de una mezcla por comparación con datos de otros autores en las mismas condiciones, sin embargo, éste varía con una amplia cantidad de parámetros como son la temperatura del horno, la longitud de la columna y su relación de fases o la velocidad del gas portador. Por lo que una de las maneras de superar la dificultad de la identificación y comparación de analitos cuando no es posible acceder a los estándares, es la utilización de los índices de Kováts.

Este índice fue desarrollado por Kováts en 1958 [12] y expresa el número de átomos de carbono multiplicado por 100, de un alcano hipotético de cadena normal que tendría un tiempo de retención ajustado idéntico al del pico de interés cuando es analizado por CG en condiciones idénticas. Este índice normaliza las variables instrumentales y operativas de los cromatógrafos de gases y geometrías de las columnas construidas y permite la comparación de parámetros entre distintos laboratorios.

La definición incluye la utilización de alcanos con n átomos de carbono por lo que el índice de retención (I), se calcula según:

$$I = 100N + 100 \frac{\log V_{N(A)} - \log V_{N(n)}}{\log V_{N(n+1)} - \log V_{N(n)}} \quad (ec. 1)$$

Donde V_N es el volumen de retención neto, n es el n -alcano con N átomos de carbono, $n + 1$ es el n -alcano con $N + 1$ átomos de carbono.

Alternativamente, considerando que el volumen de retención neto es el producto entre el tiempo de retención ajustado multiplicado por el caudal promedio, el índice de retención de un analito en una columna en condiciones isotérmicas puede calcularse en función a los tiempos de retención ajustados, t'_R , como:

$$I = 100N + 100 \left[\frac{\log t'_{R(A)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \right] \quad (ec. 2)$$

Donde n y $n + 1$ son los alcanos más chico y más grande, respectivamente, que se encuentran antes y después del analito A .

En los índices de Kováts, el valor de I de un alcano se obtiene de multiplicar por 100 el número de carbonos que posee, por ejemplo para n -octano, n -decano, n -dodecano serán 800, 1000 y 1200, respectivamente. Estos valores son independientes de la columna y de las condiciones cromatográficas incluida la temperatura, información

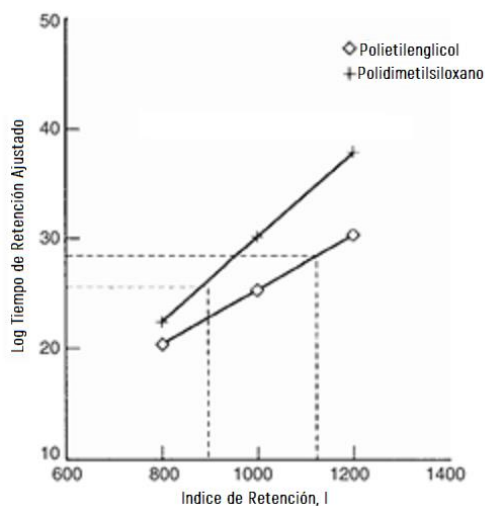


Figura 5 – Logaritmo de tiempo de retención ajustado vs índice de retención: extrapolación para acetato isoamílico a 120°C en dos columnas conteniendo polidimetilsiloxano y de polietilenglicol

que debe proveerse para cualquier otro compuesto cuyo índice se informe.

Para obtener el valor de I de un analito se inyecta una mezcla de n -alcanos bajo las mismas condiciones cromatográficas y se grafica el logaritmo del tiempo de retención ajustado (t'_R) en función al I de cada alcano, como se explicó anteriormente. El uso de la escala logarítmica permite observar el incremento lineal (figura 5) de dichos parámetros. Con el tiempo de retención de un analito de interés se puede estimar entre qué

alcanos se encuentra. Es decir, si una sustancia arroja un I de 530, quiere decir que saldrá de la columna poco luego del n-pentano y antes que el n-hexano.

El índice de retención de Kováts es dependiente de la temperatura y la fase estacionaria, por lo que es común encontrar datos con la siguiente nomenclatura I_T^X donde X es la fase estacionaria y T la temperatura de corrida isotérmica utilizada. Por ejemplo, si se realiza la determinación a 120 °C y utilizando escualano como fase estacionaria informaríamos los datos como $I_{120}^{\text{escualano}}$.

Cuando en cromatografía de gases se hace uso de un gradiente de temperatura los índices de retención Kováts se conocen como Índices de retención lineales [13] y su cálculo se realiza según la siguiente ecuación:

$$I = 100n + 100 \left[\frac{T_A - T_n}{T_n - T_{n+1}} \right] \quad (\text{ec. 3})$$

Como se puede observar, comparado con la ecuación 2, se utiliza la temperatura de elución, en Kelvin, de los alcanos y el analito de interés en reemplazo de los volúmenes netos. Dicha temperatura puede obtenerse fácilmente a partir de una relación matemática con los datos del programa de temperatura utilizados en la corrida. Asumiendo un programa de temperatura lineal:

$$T_e = T_o + r t_R \quad (\text{ec. 4})$$

Donde T_e es la temperatura de elución del compuesto con determinado t_R , T_o la temperatura inicial del gradiente de temperatura, y $r \left(\frac{^\circ\text{C}}{\text{min}} \right)$ la velocidad de calentamiento del horno.

Métodos de pretratamiento

Las técnicas de pretratamiento de muestra consisten en el aislamiento (total o parcial) y/o la preconcentración (en línea o no) de algunos componentes de interés desde la matriz para que se encuentren de una manera más apropiada para su separación, detección y análisis. Se hace con los objetivos de lograr reproducibilidad y robustez, evitar daños en la columna, eliminar interferencias, compatibilizar métodos y preconcentrar el analito [14].

Estos métodos incluyen desde la extracción líquido-líquido utilizando solventes orgánicos, hasta técnicas más complejas como la utilización de fluidos supercríticos, extracción en fase sólida, también pueden involucrar el uso de ondas de microondas, ultrasonido o equipos de Soxhlet.

Extracción sólido-líquido (SLE)

Entre las técnicas utilizadas en este trabajo se encuentran la extracción con solventes del tipo sólido-líquido, que puede tomar diversas formas. Una consiste en poner en contacto la muestra con un volumen de solvente orgánico y agitarlo. Luego del reparto, es decir, luego de que migren los analitos afines a dicho solvente, obtendremos los analitos de interés y con una simple filtración se separa a la matriz que puede interferir en la medida. Esta extracción puede ser favorecida mediante la termostatación del solvente, lo que favorece el reparto, también se puede utilizar ultrasonido, lo que favorece la ruptura de la estructura celular e interacciones de los analitos con la materia orgánica por lo que el reparto también se ve favorecido. La extracción sólido-líquido utilizando el equipo de Soxhlet permite utilizar menor cantidad de solvente orgánico y obtener una extracción exhaustiva luego de aproximadamente 6-7 ciclos de evaporación-condensación del solvente. Su empleo, sin embargo, no está recomendado para sustancias muy volátiles.

Extracción asistida por microondas (MASE)

Con respecto al uso de microondas o MASE (Microwave Accelerated Solvent Extraction) la muestra y el solvente de extracción son calentados directamente. El solvente elegido puede absorber las microondas (alta constante dieléctrica), o no absorberlas (baja constante dieléctrica). En el primer caso, la muestra y el solvente se ubican en un vial cerrado de PTFE, cuarzo o un material que no absorba las microondas. La radiación calienta el solvente a temperaturas por encima de su punto de ebullición lo que permite una rápida extracción de los analitos bajo una presión moderada. Para el segundo caso, la muestra y el solvente se colocan en un vial, que se puede encontrar abierto o cerrado, este método es más suave ya que se lleva a cabo en presiones atmosféricas o bajas, y se puede realizar en el caso de muestras con analitos termolábiles. El solvente no se calienta por la radiación, pero si la muestra (ya

que suele contener agua o algún componente con alta constante dieléctrica), por lo que en el proceso libera los analitos al solvente.

Extracción con fluidos supercríticos

Este tipo de extracción es altamente versátil ya que permite obtener el extracto concentrado sin el solvente de extracción. Consiste en la inyección de un gas a una cámara con la muestra, que en determinadas condiciones de temperatura y presión, por encima de su punto crítico, presenta un cambio de fase a un fluido supercrítico con propiedades de densidad similares a las de un líquido con el que se realiza la extracción. Y luego, al volver a las condiciones normales de temperatura y presión, el fluido se evapora dejando el extracto concentrado. Uno de los gases más utilizados para este tipo de extracciones es el dióxido de carbono ya que es barato, fácil de conseguir, inerte, y ambientalmente aceptable.

Extracción en espacio cabeza (HSE)

La extracción de espacio cabeza o HSE (Head Space Extraction) se utiliza para analitos volátiles o con un punto de ebullición bajo de manera de poder favorecer su paso a la fase gaseosa mediante el calentamiento del vial. Consiste en colocar la muestra, sea sólida o líquida, en un vial cerrado y termostatzado. Al alcanzarse el equilibrio (sólido-gas o líquido-gas) se realiza un muestreo del espacio cabeza y luego se inyecta en un cromatógrafo de gases.

Microextracción en fase sólida (SPME)

La microextracción en fase sólida o SPME (Solid Phase Micro Extraction), es una variación de la técnica de extracción en fase sólida (SPE). Consiste en el empleo de una fibra cuya fase extractante o sorbente, como puede ser polidimetilsiloxano, se encuentra depositada sobre un capilar de sílice y montada en un dispositivo que permite su exposición controlada a la solución o muestra a analizar.

La fibra se puede sumergir en la solución (DI-SPME – Deep Inmersion SPME) donde los analitos son absorbidos sobre la misma según su afinidad. Luego de un tiempo optimizado de exposición de la fibra con la muestra en un vial cerrado, la fibra se retrae (Figura 6B) y posteriormente se desorbe en el inyector del HPLC mediante una

interfaz (Figura 6D) en la que los analitos son barridos con un solvente más fuerte o en el inyector del GC, donde se extraen aumentando la temperatura. Sin embargo, sumergir la fibra la muestra, limita su vida útil por lo que no es recomendable. Otra opción es exponerla en el espacio cabeza de un vial que contenga el sólido o la solución a analizar (HS-SPME – Head Space SPME). En esta variación, al igual que en HSE, los analitos deben ser volátiles o tener un punto de ebullición bajo. Igual que en el caso anterior, luego de un tiempo de exposición optimizado, la fibra se retrae (Figura 6A) y posteriormente se expone en el inyector de un cromatógrafo de gases para permitir la desorción térmica de los compuestos mediante calentamiento (figura 6C).

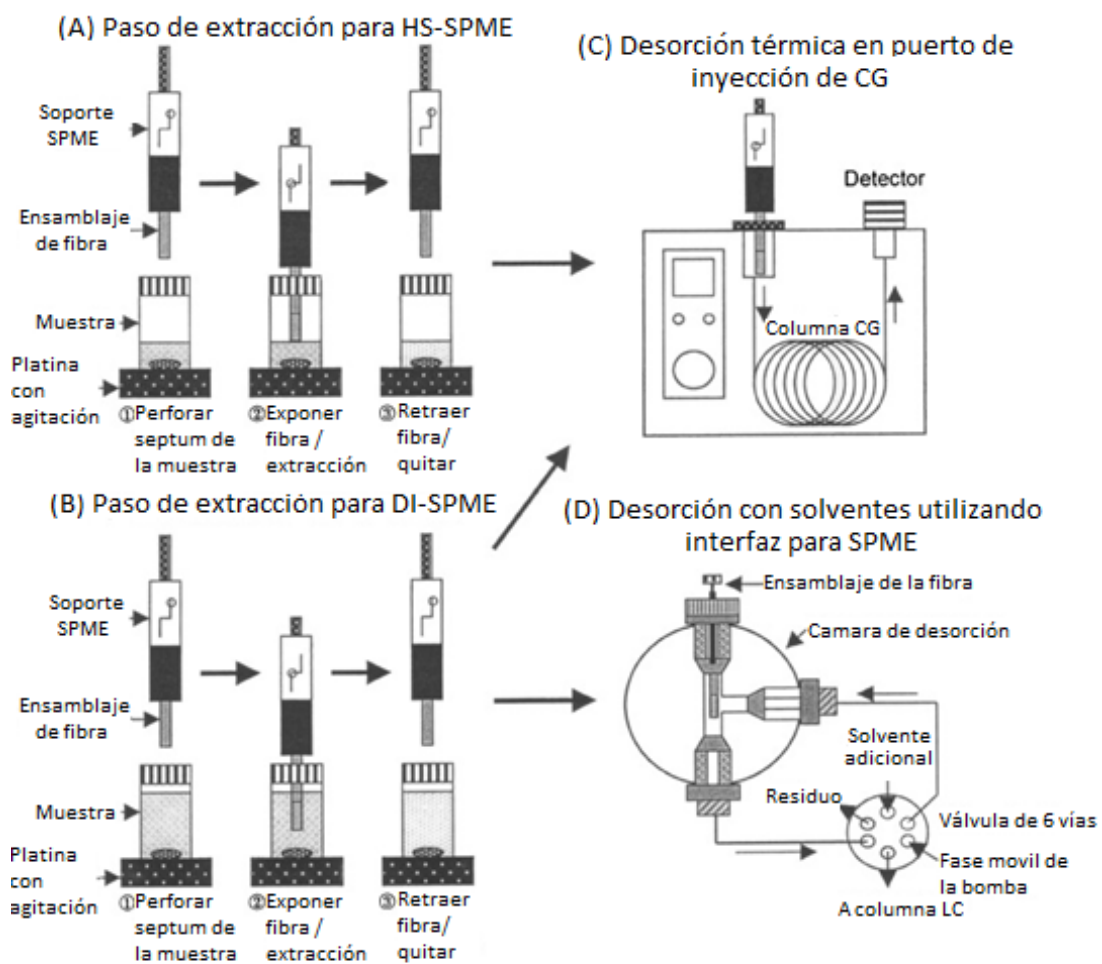


Figura 6 - Pasos de extracción para A) HS-SPME y B) DI-SPME y su desorción en C) cromatografía de gases y D) HPLC.

Antecedentes

A continuación se mencionarán trabajos publicados por distintos autores quienes han estudiado el perfil metabólico de terpenos en plantas de Cannabis a lo largo de los años y quienes informan haber realizado distintas técnicas cromatográficas y pretratamientos de muestras.

Pretratamientos

Entre los pretratamientos de la muestra encontramos diversas técnicas, como las mencionadas anteriormente, que permiten la extracción de los analitos de interés desde la matriz para que se encuentren de una manera más apropiada para su análisis.

Material vegetal

Uno de los trabajos en los que se utiliza el material vegetal (flores) sin pretratar es el de Ascrizzi (2018) [15] quienes propusieron el uso de una fibra de polidimetilsiloxano de 100 μm de espesor expuesta a la muestra por 30 minutos temperatura ambiente.

La extracción con fluidos supercríticos es muy recomendada, principalmente por la versatilidad que posee. En 2018 se reportó una extracción utilizando dióxido de carbono como fluido supercrítico en plantas de Cannabis, lo que permitió alcanzar límites de cuantificación de hasta $1\mu\text{g mL}^{-1}$ [16]. Otro trabajo en el que se propuso el uso de fluidos supercríticos para el estudio de terpenos en Cannabis es aquel publicado en 2013 por Omar *et. al.* [17] donde se propuso el uso de CO_2 a 100 bar y 35°C a un caudal de 1 mL min^{-1} durante 5 minutos; en este trabajo se publicaron límites de cuantificación de $0.006\mu\text{g g}^{-1}$.

Soluciones

Por su lado, trabajos como el de Hapenny & Stenerson[18] utilizan también HS-SPME y proponen colocar la muestra en un vial con agua mili-Q®, donde la misma fibra se expone al espacio cabeza del vial mientras se agita a 250 rpm a 40°C durante 10 minutos.

Por otra parte, la extracción sólido-líquido también es muy utilizada para extraer los terpenos en un solvente orgánico que luego se inyecta en la columna para realizar el análisis. Este método se utilizó en trabajos como el de Giese (2015) [19], quienes

desarrollaron una técnica que involucraba moler las flores y luego extraer los terpenos utilizando etanol y realizando distintos ciclos de centrifugación. De forma similar, en otro trabajo [20], establecen, para el análisis de terpenos, una extracción con metanol y agitación, y también el trabajo publicado por Fishedick en 2010 donde se propone nuevamente la extracción de la muestra de flores molidas con etanol y centrifugación.

Cromatografía de gases

La CG-FID es la técnica por defecto para el estudio de los terpenos y compuestos terpenoides presentes en Cannabis, debido a que estos son altamente volátiles y termoestables. Además, el detector FID presenta un amplio rango lineal lo que permite cubrir una gran cantidad de terpenos en una sola inyección[19]. Sobre la aplicación de esta técnica a este tipo de muestras se encuentra en una gran cantidad de trabajos y se informan valores de límites de detección de entre 0,1 - 0,2 ppm y de cuantificación de 0,4 - 0,8 ppm [21].

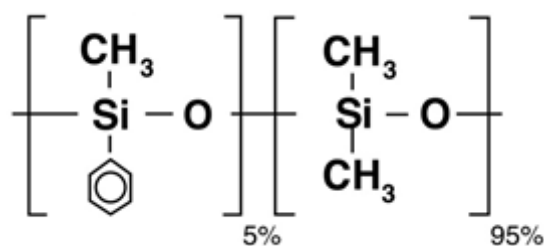


Figura 7 - Estructura 5% fenil - polidimetilsiloxano

Fases estacionarias

Si hacemos referencia a las columnas utilizadas, la más empleada en ensayos de terpenos por CG es una columna de tubo abierto consistente en un capilar de sílice fundida con la pared del mismo recubierta por la fase estacionaria 5% fenilpolidimetilsiloxano, cuya estructura se visualiza en la figura 7, y más comúnmente con dimensiones de 30 metros; 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de film. Esta fase estacionaria se utiliza por su baja polaridad, amplio rango de temperaturas (hasta 350°C), y bajo sangrado, lo que la hace perfecta para su uso en cromatografía de gases acoplada a un detector de masas y para análisis de trazas.

Sin embargo, con relación a las columnas, aquellas que contienen líquidos iónicos (LI) a temperatura ambiente como fase estacionaria, demostraron ser muy eficaces a la hora de separar compuestos de aceites esenciales, estas columnas muestran alta capacidad de separar compuestos polares y no-polares ya que presentan la posibilidad de interactuar con los analitos de diversas maneras, que incluyen fuerzas electrostáticas, interacción dipolo-dipolo, puente de hidrógeno, y cohesión y

dispersión [22]. Si bien no existen demasiados ensayos que hagan uso de este tipo de columnas, en 2011, Ragonese *et al.*[23] caracterizaron una columna SLB-IL59 [1,12-di(tripropilfosfonio)dodecano bis(trifluoro- metansulfonil)amida] y la aplicaron a una muestra de aceite esencial de limón. Compararon su eficiencia con los resultados obtenidos con una columna apolar (5% difenil-95% dimetilsiloxano) y una de polaridad intermedia (100% poli(etilenglicol)). Como conclusión pudieron afirmar que la columna de líquidos iónicos se comportaba similar a la de polaridad intermedia y lograron la identificación de 41 compuestos y la obtención de picos bien resueltos.

DetECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Con respecto a la detección de estos compuestos, encontramos estudios en los que se emplea el análisis de ionización en llama (FID), el que resultaría más adecuado por arrojar menores límites de detección en la cuantificación mientras que el empleo de un espectrómetro de masas (MS), es de gran utilidad para la identificación. En el caso de usar detectores FID, se pueden utilizar estándares y/o índices de retención de Kováts para realizar la identificación y cuantificación de los terpenos presentes sin necesidad de recurrir a un equipo de masas en el caso de no tener estándares que nos permitan realizar una identificación más confiable. Además, autores como Ragonese [23] explican que los componentes de aceites esenciales, como los terpenos, producen espectros de fragmentación similares lo que dificulta en algunos casos su identificación mediante el detector de Masas, por lo que los índices de Kováts resultan de mucha utilidad.

Por último, las corridas isotérmicas no son recomendadas debido a la gran cantidad y variedad de compuestos presentes por lo que los programas de temperatura son elegidos. Pueden incluir una simple rampa en el gradiente, como la publicada en 2018 por Ascrizzi [15] que comenzaba en 60°C y aumentaba a 3°C/min hasta 240°C; o puede ser más compleja como la utilizada en el trabajo de Omar *et al.* en 2013 [17], quienes aplicaron un programa de temperatura no lineal por lo que en su caso la identificación se realizó por comparación con biblioteca del detector de masas.

A modo de resumen, la tabla 3, muestra los trabajos nombrados anteriormente para realizar una comparación entre ellos.

Tabla 3 - Tabla comparativa de resultados obtenidos por diferentes autores mediante el uso de Cromatografía de gases y diferentes técnicas de pretratamiento de muestras.

Trabajo	Extracción	Muestra	Columna	Detector	LOQ (ppm)	Determina
VOCs as fingerprint for chemical profiling of hashish samples analyzed by HS-SPME/CG-MS [15]	HS-SPME	Hachís (resina/polen)	DB-5 (30x0.25x0.25)	MS	n.i.	p-cimen-8-ol, α -terpineol, β -cariofileno, alloaromadendreno, óxido de cariofileno
Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by SPE and FUSE, and retention time locking CG/MS [17]	SFE (CO ₂)	Planta molida	HP5-MS (30x0.25x0.25)	MS	0.006-6.2	α - y β -pineno y limoneno
Customer insight into identification and quantification of cannabinoids and terpenoids [20]	SLE con MeOH	Planta	EL-5 (30x0.25x0.25)	FID	2.53 - 15.5	Mirceno, δ -3-careno, geraniol, β -cariofileno, α -humuleno

Quantitative determination of terpenes using HS-SPME and CG/MS [18]	HS-SPME	Planta molida	Equity-1 PDMS (60x0.25x0.25)	MS	n.i.	α -pineno, R-(+)-limoneno y linalool
Development and validation of a reliable and robust method for the analysis of cannabinoids and terpenes in Cannabis [19]	SLE EtOH	Flores molidas	Elite-5MS	FID	5-8	27 terpenos
Metabolic fingerprinting of <i>Cannabis sativa L.</i> , cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes [1]	SLE EtOH	Brotos Cannabis medicinal	DB5 (30x0.25x0.25)	FID y MS	400-500	36 terpenos
Development of Gas-Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Cannabinoids and Terpenes in Hemp [21]	SLE Acetona	Flores molidas	Rtx-50 (30x0.25x0.25)	FID	0.4-0.8	6 terpenos y cannabinoides

n.i.: no informa

Cromatografía de Líquidos

HPLC ha sido determinada como la técnica más adecuada para el estudio de cannabinoides ya que son inestables térmicamente y el grupo ácido de los cannabinoides carboxílicos son descarboxilados a la temperatura del inyector de un CG. Sin embargo, en 2020 se ha demostrado que es posible realizar su determinación total, sin discriminar entre compuestos ácidos y descarboxilados, utilizando cromatografía de gases asegurando la descarboxilación cuantitativa de los cannabinoides mediante el uso de altas temperaturas en el inyector y bajos volúmenes de inyección[21].

La técnica también es utilizada para la separación de terpenos en distintas matrices pero no en Cannabis debido a la superposición de señales de los cannabinoides y terpenos, ya que la relación de señales es muy alta en el UV-VIS y los terpenos no son fácilmente separables (figura 8) [24].

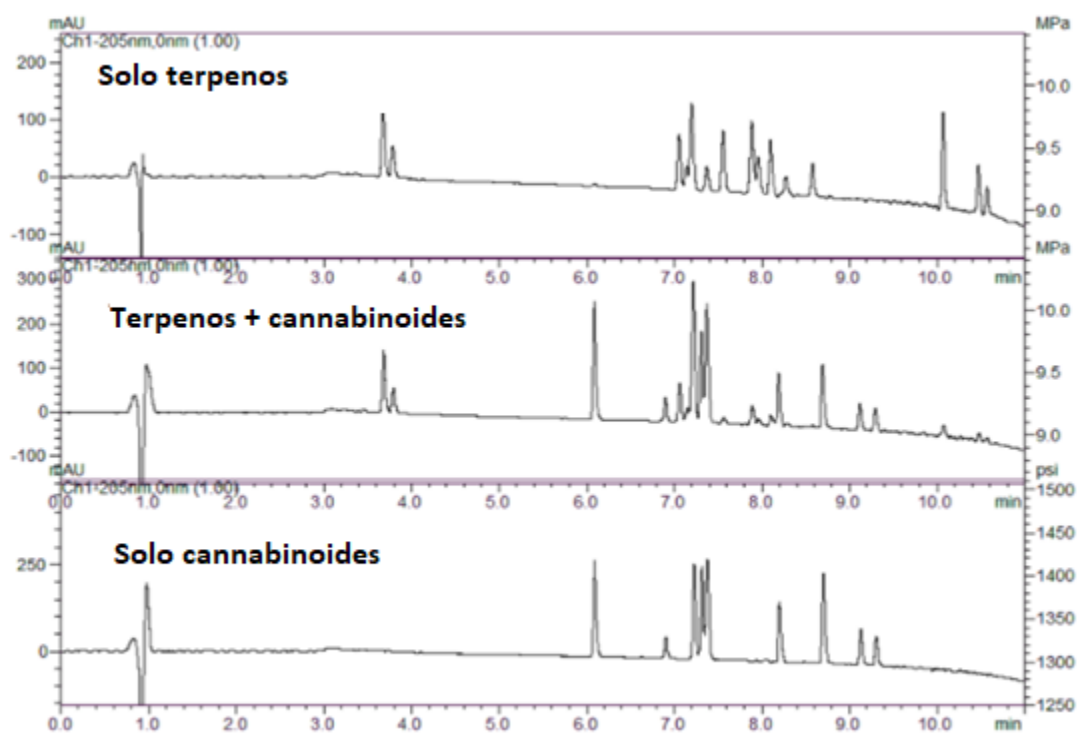


Figura 8 – Cromatogramas obtenidos para terpenos y terpenos y Cannabinoides mediante HPLC-UV con una columna C18. Detección a 205nm.

Entre los trabajos publicados para la determinación de terpenos mediante HPLC, encontramos el de Musenga *et. al.* en 2006[25], quien planteaba una corrida isocrática con una fase móvil compuesta por un buffer de ácido fosfórico-trimetilamina y

acetonitrilo (30:70) en una columna rellena de octilsílice (C8). Estos investigadores lograron resolver en dichas condiciones eugenol, acetato de eugenol, β -cariofileno, α -humuleno y óxido de cariofileno en 7 minutos, y luego lo aplicaron a clavos de olor obteniendo resultados muy satisfactorios.

Otro trabajo interesante fue publicado por Laugel en 1998 [26], quienes propusieron el uso de columnas de octadecilsílice (C18) y una fase móvil metanol:acetonitrilo:agua (60:5:35) y lograron la determinación de seis terpenos empleando para la detección una longitud de onda de 206 nm que determinaron de máxima absorbancia para los compuestos de estudio en una cepa de Centella Asiática.

El trabajo de Giese [19] ya mencionado por su estudio en cromatografía de gases, también informa haber determinado una serie de terpenos mediante HPLC-DAD a 214 nm utilizando una columna C18 y gradiente de 0,1% ácido fórmico en agua y 0,1% ácido fórmico en acetonitrilo, pero solo se aplicó a los terpenos puros con el fin de realizar una curva de calibración.

Quienes sí informan haber separado terpenos presentes en muestras de Cannabis utilizan un equipo de HPLC acopado a MS/MS por lo que se trata de un equipo mucho más costoso [27]. Este grupo estudió la separación de los terpenos más comunes en este tipo de plantas y, además, pusieron a prueba su método para diferentes variedades incluyendo aceites, concentrados, refinados, entre otros. Utilizan una columna bifenilo con "endcapping" de tetrametilsilano y realizan una corrida en gradiente, partiendo de 50:50 2 mM acetato de amonio + 0.1% ácido fórmico como fase acuosa y 2 mM acetato de amonio + 0.1% ácido fórmico en metanol como fase orgánica, aumentando a 5:95 para los 6 minutos de la corrida; y volviendo a la proporción de 50:50 para el final de la corrida a los 12 minutos. La figura 9 muestra un cromatograma presentado en este trabajo y, si bien las señales correspondientes a terpinoleno y limoneno se encuentran levemente superpuestas, la separación fue buena, logrando obtener límites de cuantificación menores a 1 ppb.

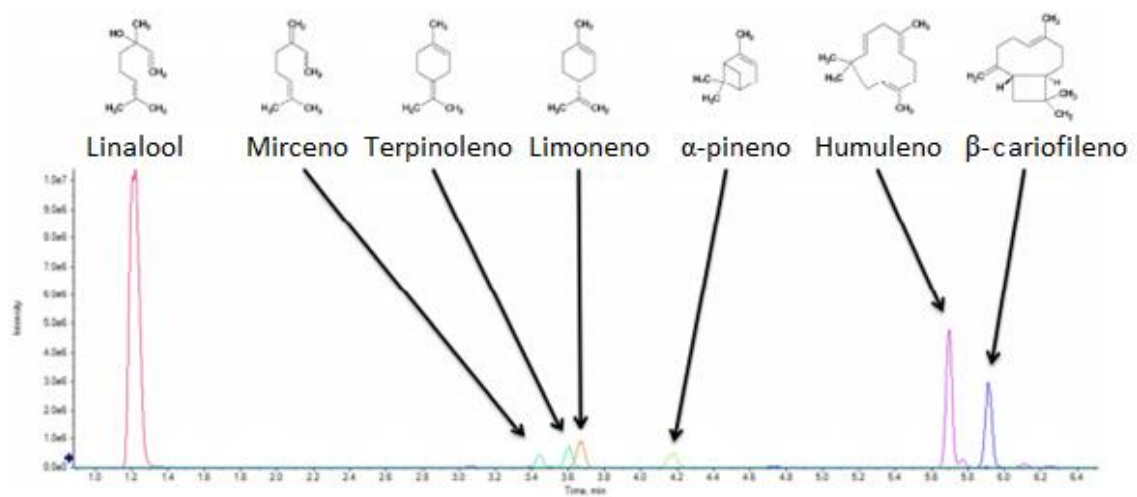


Figura 9 – Cromatograma obtenido a partir de una muestra de terpenos en Cannabis mediante HPLC MS/MS.

Todos estos trabajos demuestran que, si bien es posible la determinación de terpenos mediante HPLC, no fueron aplicados a muestras de Cannabis, por lo que uno de nuestros objetivos originales fue probar diferentes condiciones de análisis de manera de llegar a resultados de separación y determinación satisfactorios.

Trabajo experimental en Cromatografía de Gases

Condiciones experimentales

Luego de la lectura y comparación de los trabajos comentados anteriormente se inició el trabajo experimental. Para esto se utilizó una columna capilar de 5% fenil-polimetilsiloxano con una longitud de 26 metros, 250 μm de diámetro interno y 0.2 μm de espesor de film, fabricada previamente en el laboratorio [28]. Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 6890 equipado con un detector de ionización en llama (FID). Las condiciones cromatográficas de análisis iniciales fueron: la temperatura del inyector 300°C, caudal constante 1 mL min^{-1} y modo Split 0.1; temperatura del detector 350°C y relación de hidrógeno:aire utilizada fue de 30:300. Por último, en base a las condiciones reportadas en bibliografía, se utilizó una programa de temperatura de 60°C a 240°C a 3°C/min y 5 min finales, lo que significaba un tiempo de análisis de 65 minutos.

Identificación por patrones

Para las primeras identificaciones de terpenos se utilizó un programa de temperatura consistente en mantener la temperatura en 35°C por 5 minutos seguido de luego un aumento hasta 200°C con una velocidad de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. En dichas condiciones se analizaron patrones individuales de R y S pineno, limoneno, linalool, 2-careno, guaiol y geraniol, se realizaron inyecciones separadas y se registraron sus tiempos de retención ajustados (empleando metano como marcador de tiempo muerto).

Posteriormente se hizo uso de dos estándares con mezclas de patrones de terpenos de Cannabis de la marca Restek, conteniendo los siguientes compuestos:

- Standard #1: α -pineno, canfeno, β -pineno, β -mirceno, δ -3-careno, α -terpineno, p-cimeno, δ -limoneno, ocimeno (α y β), γ -terpinoleno, linalool, isopulegol, geraniol, β -cariofileno, α -humuleno, nerolidol (cis y trans), guaiol y α -bisabolol.
- Standard #2: 1,8-cineol y óxido de cariofileno.

Las inyecciones de los mismos se realizaron en iguales condiciones que los estándares puros, lo que permitió la identificación de los picos por superposición de cromatogramas.

Identificación mediante Índices de Retención de Kováts

Como se mencionó anteriormente, al tener una muestra tan compleja y pocos patrones para comparar, recurrimos al uso de los índices de retención de Kováts y basándonos en el trabajo publicado en 2011 por Babushok [29] logramos identificar una amplia cantidad de los terpenos presentes en la muestra.

Realizamos la inyección de una solución conteniendo alcanos que abarcaban los carbonos 9 a 19, y a partir del cálculo de sus temperaturas de elución en el gradiente y sus I obtuvimos una recta (figura 10) en la que se interpolaron los datos de temperaturas de elución de cada compuesto para obtener sus I. Finalmente ese método nos arrojó resultados lejanos a los que encontrábamos en trabajos publicados por lo que recurrimos a la ecuación propia de la recta (ecuación 3) lo que nos permitió la correcta identificación.

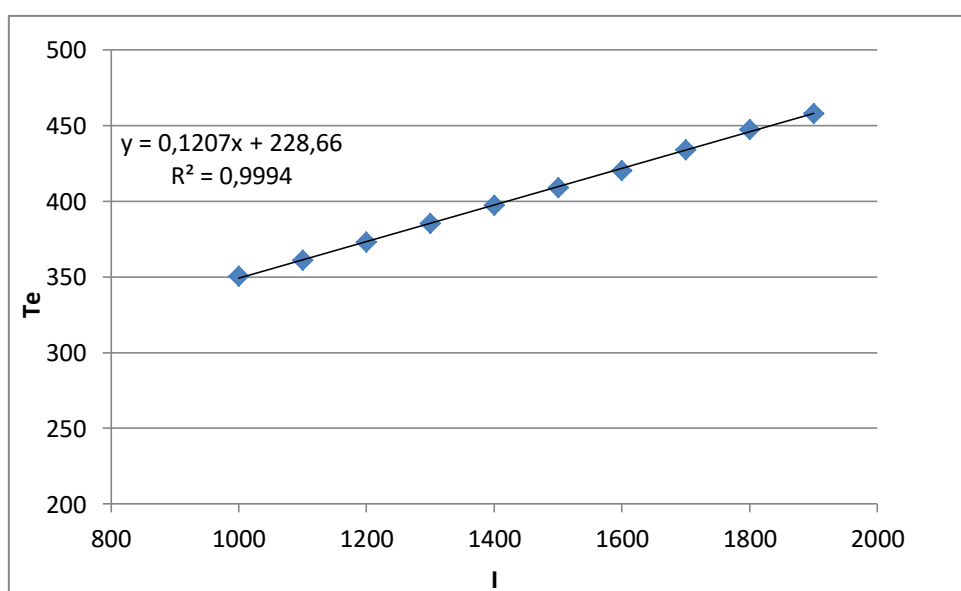


Figura 10 – Gráfico de I Kováts de n-alcanos y sus temperaturas de elución (K).

Se hizo uso de los Índices de los alcanos inyectados para determinar aquellos correspondientes a las mezclas de patrones utilizados en el apartado anterior, dichos

datos y su comparación con aquellos publicados en el trabajo de Babushok se pueden observar en la tabla 4.

Tabla 4 – Tiempo de retención, temperatura de elución, I Kováts calculado y de bibliografía de patrones de terpenos.

Analito	t _R	Te (K)	I Calculado	I Babushok	ΔI
n-nonano	4,778	347,3	900		
α-pineno	5,624	349,9	932,3	936	3,7
Canfeno	6,005	351,0	946,9	950	3,1
β-pineno	6,749	353,2	975,3	978	2,7
β-mirceno	7,099	354,3	988,7	989	0,3
n-decano	7,394	355,2	1000		
δ-3-careno	7,712	356,1	1009,2	1011	1,8
α-terpineno	7,908	356,7	1014,9	1017	2,1
p-cimeno	8,162	357,5	1022,2	1024	1,8
δ-limoneno	8,295	357,9	1026,1	1030	3,9
1,8-Cineol	8,393	358,2	1028,9	1032	3,1
(Z)-ocimeno	8,565	358,7	1034	1038	4,1
(E)-ocimeno	8,927	359,8	1044	1048	3,7
γ-terpineno	9,308	360,9	1055,4	1060	4,6
Terpinoleno	10,363	364,1	1085,9	1087	1,1
Linalool	10,783	365,3	1098,0	1099	1,0
n-undecano	10,851	365,6	1100		
Isopulegol(-)	12,531	370,6	1142,0	1145	3,0
n-dodecano	14,855	377,6	1200		
Geraniol	16,941	383,8	1250,5	1255	4,5
n-tridecano	18,986	390,0	1300		
n-tetradecano	23,041	402,12	1400		
β-cariofileno	23,534	403,6	1413,0	1420	7,0
α-humuleno	24,865	407,6	1448,3	1453	4,7
n-pentadecano	26,821	413,5	1500		
(Z)-nerolidol	28,020	417,1	1531,9	1543	11
(E)-nerolidol	29,159	420,5	1562,2	1560	-2
Óxido de cariofileno	29,768	422,3	1578,4	1581	2,6
Guaiol	30,472	424,4	1597,1	1597	-0,1
n-hexadecano	30,58	424,7	1600		
α-bisabolol	33,483	433,4	1662,9	1683	20,1
n-heptadecano	35,192	438,58	1700		

Si bien el valor de I Babushok informado es el valor medio de datos publicados por otros autores, en el trabajo también informan intervalos alrededor del mismo con un

50% y un 90% de confianza, los cuales se utilizaron en este caso, y en la asignación empleada más adelante para realizar la identificación.

Pretratamiento de muestras

Extracción con solventes

Para la evaluación de un método de extracción sólido-líquido se utilizaron muestras de flores secas de Cannabis no tipificado y se evaluaron tres estrategias haciendo uso de varios solventes:

1) Se rellenó con aproximadamente 0,5 g de muestra, una pequeña columna de acero y se hizo fluir desde el extremo superior el solvente extractante (gas propano) que se licuó dentro de la columna por la elevada presión, extrayendo distintos compuestos de la muestra. El extracto se colectó por la parte inferior en un vaso de precipitados. Posteriormente se dejó evaporar el propano dejando la resina extraída que se disolvió en 10,00ml de hexano. La extracción se repitió sin unir los extractos. Esto se ensayó para dos muestras diferentes. Se obtuvieron las soluciones que se observan en la Figura 11.



Figura 11 – Extractos de Cannabis no tipificado obtenidos a partir de la extracción con gas propano.

Los datos correspondientes a las extracciones realizadas se observan en la tabla 5:

Tabla 5 - Datos obtenidos a partir del primer y segundo extracto de dos muestras de Cannabis no tipificado.

Extracto	Masa pesada (g)	Masa de resina obtenida (g)
1 a	0,5495	0,0696
1 b		0,0094

2 a	0,5482	0,0706
2 b		0,0101

Posteriormente se realizaron las inyecciones del primer y segundo extracto de la primera muestra y se obtuvieron los cromatogramas de la figura 12. Si bien esperamos que la altura de los picos disminuya en el segundo extracto y esto no se observa en todos los casos, podría deberse a que las extracciones no fueron reproducibles.

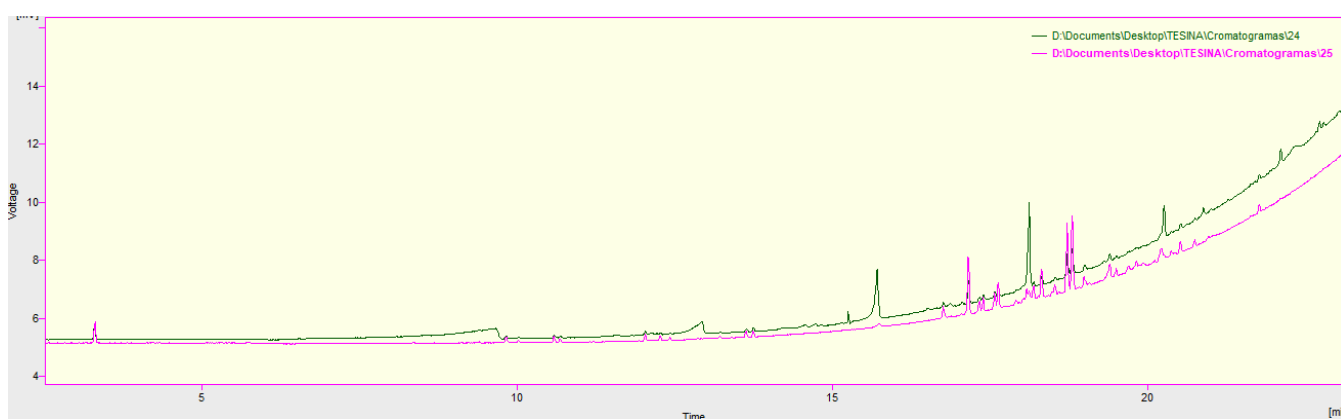


Figura 12 - Cromatogramas obtenidos del primer (verde) y segundo (rosa) extractos de la primer muestra de Cannabis no tipificado.

2) Para esta estrategia se armó un dispositivo que contaba con una bureta enrasada con solvente de extracción que goteaba directo sobre una columna de acero rellena con 0,5346 g de muestra, ubicada sobre un matraz en el que se colectaba el extracto hasta llegar a enrasarlo. En la Figura 13 puede observar un momento de la extracción y los extractos obtenidos.



Figura 13 - Extracción de Cannabis con solvente mediante columna de extracción. A la izquierda: dispositivo; a la derecha: extractos obtenidos.

Para el primer extracto se dispensaron 10,00 mL de solvente desde bureta, y una vez que se detuvo el goteo de extracto se llevó a un volumen final de 10,00 mL. Luego se dispensó solvente desde bureta, y los siguientes extractos (2, 3 y 4) se colectaron en matraces de 1,00 mL realizando el enrase directamente con el goteo de la columna de extracción.

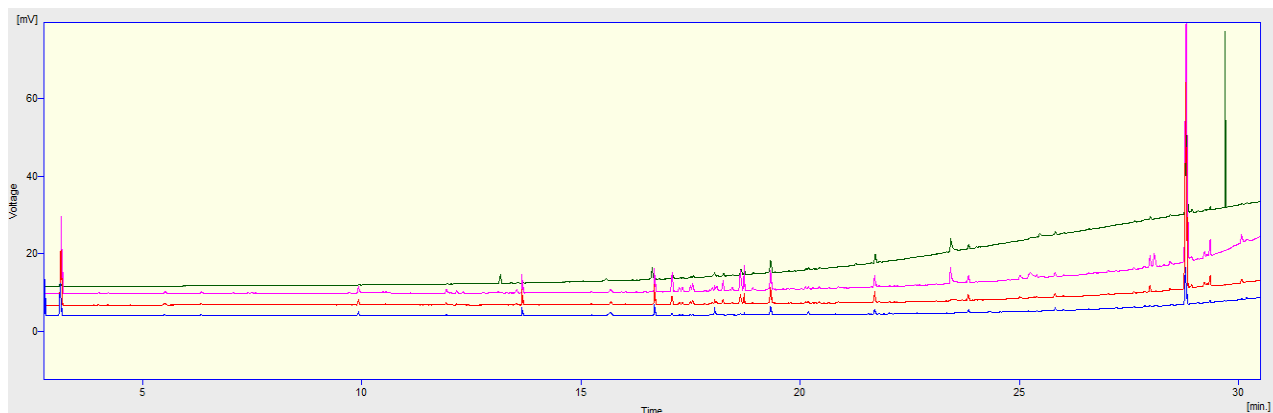


Figura 14 - Cromatogramas de la primera, segunda, tercera y cuarta extracción (de arriba hacia abajo) con hexanos de la muestra no tipificada.

De las inyecciones de los mismos se obtuvieron los siguientes cromatogramas (figura 14), donde podemos observar que si bien se realizaron cuatro extracciones las mismas no resultaron ser exhaustivas por lo que se requerirían más ciclos de extracción o mayor volumen de solvente. Entre los 15 y 20 minutos del cromatograma, encontramos que faltan algunos picos a medida que aumenta el número de extracción, lo que indica que ese compuesto si fue completamente extraído o que se encontraba en muy baja concentración en comparación al resto. Por último, cabe destacar la presencia de un gran pico cerca de los 30 minutos que puede corresponder a THC, CBD o CBN, si bien no conocemos su identificación, observamos que se encuentra en una gran proporción para las primeras corridas y que disminuye para la cuarta.

3) En la última estrategia, se utilizaron jeringas de vidrio para filtración, como la que se muestra en la figura 15, en las que se colocaron aproximadamente 0,1 gramos de muestra y sobre la cual se agregaron 5 mL de solvente siguiendo la idea planteada por Omar *et. al.* en 2013 [17]. La jeringa tapada en su parte inferior se sometió a ultrasonido por 3 minutos y luego se dejó



Figura 15 - Jeringa de vidrio utilizada para la extracción.

reposar 30 minutos. Posteriormente se colocó el filtro en el extremo de la jeringa y se obtuvo el extracto por presión del émbolo en un matraz, llevando a volumen final de 5,00 mL. Se hizo además una segunda extracción de cada remanente en la jeringa, con el mismo procedimiento. Los datos de extracción para cada solvente evaluado se observan en la tabla 6:

Tabla 6 – Solvente utilizado y masas pesadas de muestra de flores no tipificadas.

Solvente de extracción	Masa pesada (g)
Metanol	0,0976
Hexano	0,0974
Acetato de etilo	0,0993
1-butanol	0,1005

Se realizaron entonces ocho medidas cromatográficas, observándose que el segundo extracto seguía presentando un porcentaje de terpenos significativo, como se muestra en el cromatograma (figura 16), por lo que la extracción no fue exhaustiva y para un análisis cuantitativo deberían realizarse más ciclos de extracción.

De cada medida de la primera extracción con cada solvente se obtuvo la siguiente información:

Tabla 7 - Numero de picos, picos reconocidos por comparación de estándares y aquellos con mayor área a partir de la primera extracción con cada solvente.

Solvente de extracción	Nº de picos	Picos reconocidos por comparación con estándares	Mayor área
Hexano	79	6	11
Metanol	70	6	15
Acetato de etilo	72	7	11
1-butanol	76	8	16

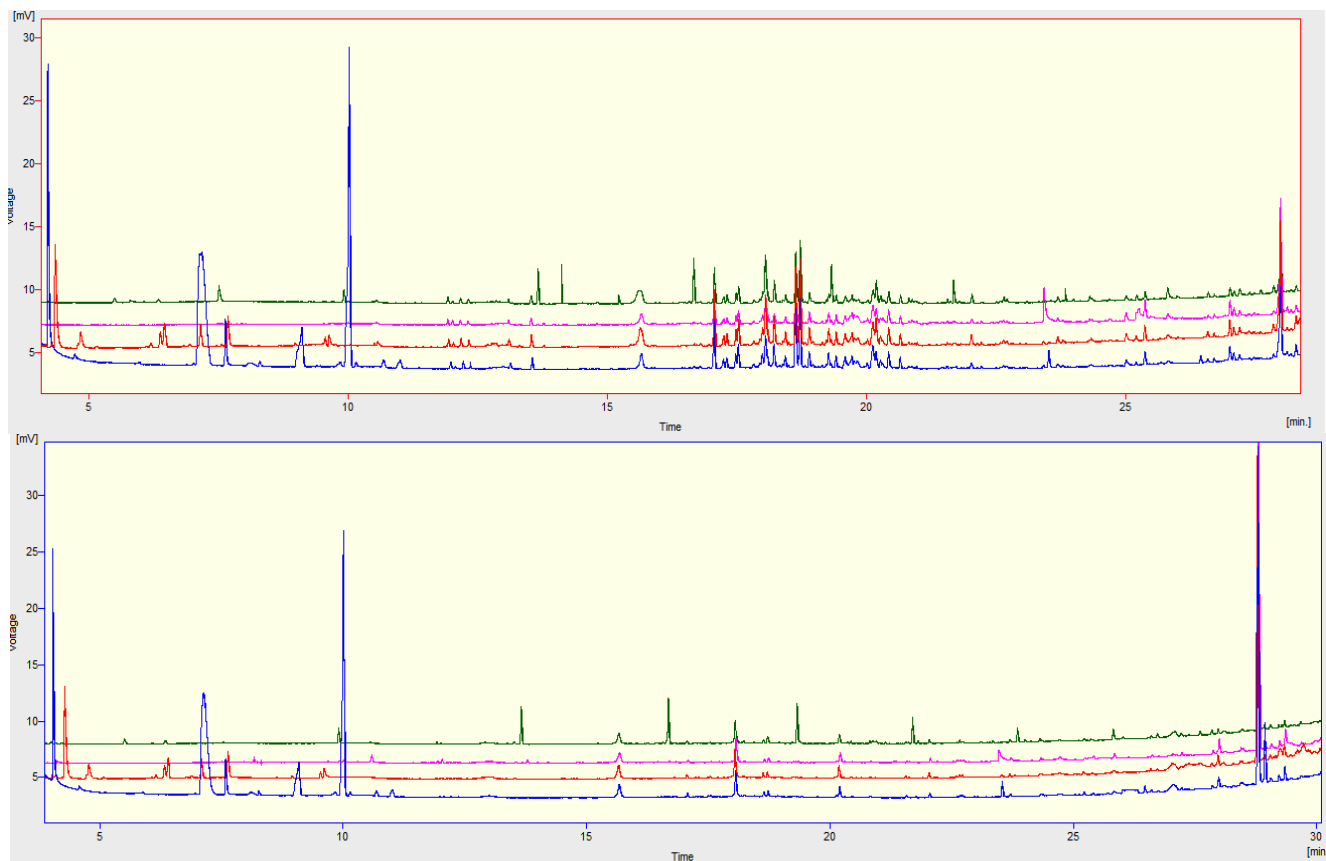


Figura 16 - Cromatogramas correspondientes a la primera y segunda extracción (arriba y abajo) con hexano, metanol, acetato de etilo y 1-butanol de arriba hacia abajo.

Observando la información suministrada por los cromatogramas, los alcoholes permitían obtener picos de mayor área, y entre ellos el que mostró un mayor rendimiento de extracción fue el 1-butanol, por lo que se llegó a la conclusión de que dicho alcohol permitía obtener un mejor resultado, de entre los solventes ensayados, pudiéndose inferir que las extracciones podrían arrojar mejores rendimientos empleando como extractante a alcoholes de cadenas más largas.

Head Space

Se realizó el estudio de las muestras CAT (Cepa Argentina Terapéutica) en sus variedades 1, 2 y 3 provistas por el CIM en recipientes cerrados y rotulados con su respectivo peso. Se trasvasaron cuantitativamente a viales de SPME (figura 17) y se llevaron a un horno a 40°C por 45 minutos, luego se inyectó 2 µl de la fracción gaseosa del vial en la columna usando el programa de temperatura que consideramos ideal.



Figura 17 - CAT 1, 2, 3 húmedas y 3 seca respectivamente. Las masas de cada una eran 1,2; 1; 1 y 0,9 gramos.

Los tratamientos térmicos se realizaron de manera que primero se llevó a cabo la desorción con la muestra de CAT 1 y se inyectó, a los 25 minutos de corrida se llevó al horno la siguiente muestra y así sucesivamente, de manera de dar tiempo a que termine cada corrida (que duraba aproximadamente 70 minutos, considerando el enfriamiento de la columna).

Por observación de los cromatogramas obtenidos (figura 18) podemos notar que las tres cepas de CAT presentan bastantes diferencias entre sí, una de ellas es que la CAT 1 es más rica en Cannabidiol (CBD) y Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC); que en la cepa 2 y 3, donde lo predominante es el THC, lo que condice a lo obtenido de bibliografía. Por otro lado si dividimos los cromatogramas en tres partes, siendo tiempos de retención bajos medios y altos, podemos ver que la CAT 1 y 3 presentan un perfil mayor de terpenos en tiempos bajos; y que en tiempos medios la cepa 3 tiene una elevada concentración de los mismos, a comparación de los otros dos casos; mientras que si comparamos la variedad de terpenos, en cantidad de picos presentes, es mayor en la cepa 1.

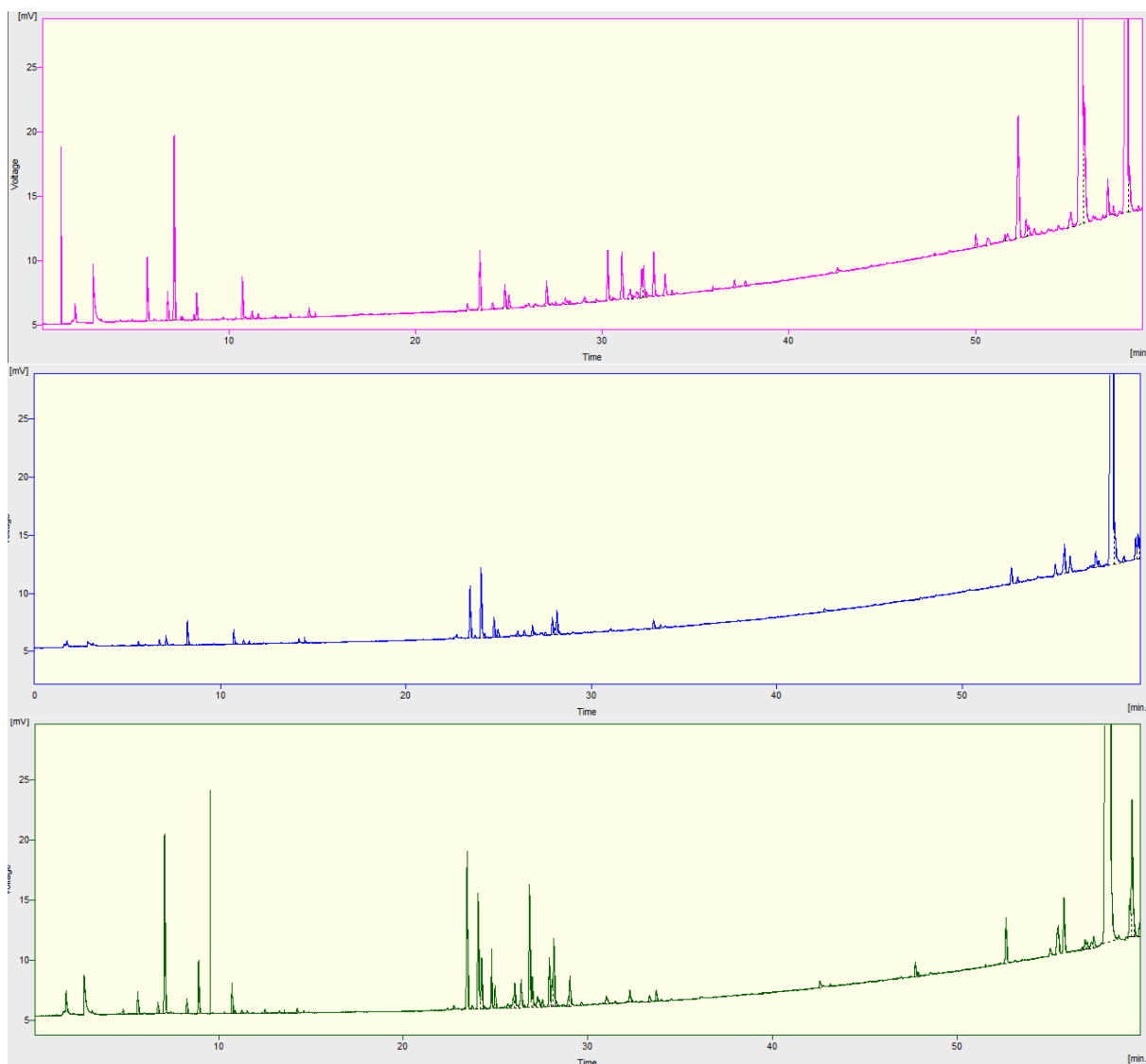


Figura 18 - Cromatogramas obtenidos a partir de la inyección del HS de muestras de CAT 1, 2 y 3 (de arriba hacia abajo respectivamente) luego de tratamiento térmico.

A partir de la información obtenida de los cromatogramas y con el uso de los índices de retención de Kováts y los estándares utilizados, se procedió a la identificación de los compuestos. Un resumen de los terpenos identificados a partir de la comparación con los índices publicados por Babushok en 2011, considerando, además, aquellos más comunes en estas plantas según Ascrizzi, se encuentran en la tabla 8.

Tabla 8 - Identificaciones realizadas sobre las 3 cepas CAT a partir del uso de IRL y sus abundancias relativas porcentuales.

t _R (min)	T _e (K)	Identificación	I calculado	I Babushok	Abundancia relativa %		
					CAT 1	CAT 2	CAT 3
4,778	347,33	n-nonano	900				
4,83	348	Heptanal	902	902,0	-	-	0,4
5,624	350	α-pineno	931,9	932,0	0,83	0,09	0,2
6,749	353	β-pineno	974,8	975,0	0,38	0,16	0,1
7,099	354	β-mirceno	988,1	988,0	2,16	0,23	1,52
7,394	355,18	n-decano	1000				
7,44	355	Octanal	1001,4	1002,8	0,04	-	-
7,529	356	α-Felandreno	1003,9	1004,1	0,05	-	-
8,162	357	p-cimeno	1021,6	1022,0	0,06	-	-
8,295	358	δ-limoneno	1025,4	1026,0	0,34	-	0,14
8,565	358	(Z)-ocimeno	1034,0	1034,0	-	0,73	-
8,927	360	(E)-ocimeno	1044,0	1044,3	-	-	0,45
10,783	365	Linalool	1097,0	1098,0	0,52	0,44	0,26
10,851	365,55	n-undecano	1100				
10,921	366	Cis-tujona	1102	1102,0	-	-	0,02
11,266	367	Hotrienol	1110,4	1106,8	0,13	0,11	0,03
11,58	368	Exo-fenchol	1118,2	1119,0	0,06	0,10	-
12,531	371	Isopulegol	1141,6	1142,0	0,02	-	0,03
13,291	373	β-oxido de pineno	1160,9	1158,0	0,04	-	-
14,281	376	α-terpineol	1185,7	1189,7	0,12	0,12	0,04
14,647	377	Mirtenol	1194,8	1192,0	0,05	-	-
14,855	377,57	n-dodecano	1200				
18,986	389,96	n-tridecano	1300				
22,775	401	β-elemeno	1393,4	1390,4	0,22	0,22	0,04

t _R (min)	T _e (K)	Identificación	I calculado	I Babushok	Abundancia relativa %		
					CAT 1	CAT 2	CAT 3
23,041	402,12	n-tetradecano	1400				
23,534	403	β -cariofileno	1411,6	1413,0	0,92	1,86	1,63
23,752	404	β -cedreno	1418,8	1421,0	-	0,10	0,04
24,063	405	α -bergamoteno, trans	1427,0	1434,5	-	2,60	1,26
24,252	405	γ -elemeno	1429,6	1436,4	0,09	0,16	0,54
24,865	407	α -humuleno	1446,8	1448,0	0,39	0,71	0,62
25,029	408	Allomadendreno	1452,6	1459,9	0,22	0,31	0,24
25,7	410	γ -gurjuneno	1470,3	1472,2	-	-	0,06
25,982	411	γ -muuroleno	1477,8	1476,2	-	-	0,12
26,068	411	β -selineno	1480,1	1486,1	-	0,23	0,31
26,428	412	Valenceno	1489,6	1491,7	0,07	0,20	0,39
26,821	413,46	n-pentadecano	1500				
26,86	414	β -bisaboleno	1500,9	1508,4	-	0,50	1,28
27,018	414	α -bulneseno	1505,2	1504,1	0,41	-	0,35
27,563	416	α -selinene-7-epi	1519,7	1517,2	0,05	0,13	0,09
27,928	417	Calamaneno	1529,4	1522,9	-	0,63	0,52
28,020	417	(Z)-nerolidol	1533,2	1532,0	0,13	0,20	0,26
28,164	417	α -cadineno	1535,7	1533,3	-	1,04	0,7
28,301	418	Elemol	1539,4	1547,5	0,06	-	0,07
28,994	420	5-metilpentadecano	1557,8	1551,0	-	-	0,08
29,159	420	(E)-nerolidol	1560,3	1560,0	0,06	-	0,36
29,768	422	Óxido de cariofileno	1577,0	1578,0	0,06	-	0,05
30,301	424	Carotol	1592,6	1595,3	0,77	-	-
30,472	425	Guaiol	1599,5	1597,0	0,05	-	-
30,58	424,74	n-hexadecano	1600				

t _R (min)	T _e (K)	Identificación	I calculado	I Babushok	Abundancia relativa %		
					CAT 1	CAT 2	CAT 3
31,053	426	Epóxido de humuleno II	1610,3	1604,7	0,76	-	0,13
31,495	427	γ-eudesmol-10-epi	1619,8	1617,7	0,2	-	-
31,88	429	γ-eudesmol	1628,2	1630,9	0,2	-	-
32,14	429	Caryophylla-4(14),8(15)-dien-5-ol	1633,8	1640,3	0,4	-	-
32,249	430	Epoxyalloaromandendreno	1636,2	1639,0	0,5	-	0,14
32,415	430	Selina-3,11-dien-6-α-ol	1639,8	1644,0	0,1	-	0,03
32,787	431	α-eudesmol	1647,9	1651,7	0,7	-	-
33,483	433	α-bisabolol	1661,0	1663,0	0,36	0,42	-
33,76	434	epi-α-bisabolol	1669,0	1685,3	0,1	0,14	0,13
35,192	438,58	n-heptadecano	1700				
35,946	441	Farnesol-2z-6e	1717,1	1722,5	0,08	-	-
37,111	444	Farnesol-2e-6e	1743,4	1743,5	0,12	-	-
37,692	446	α-sinsenal	1756,5	1573,5	0,1	-	-
39,613	451,84	n-octadecano	1800				
42,619	461	1-hexadecanol	1884,5	1879,7	0,1	0,24	0,09
43,172	462,52	n-nonadecano	1900				
47,811	476				0,04	0,11	0,02
47,965	477				-	-	0,04
50,045	483				0,24	-	-
50,688	485				0,23	-	-
51,601	488				0,07	-	-
51,733	488				0,18	0,01	0,03
52,287	490				2,82	-	-

t _R (min)	T _e (K)	Identificación	I calculado	I Babushok	Abundancia relativa %		
					CAT 1	CAT 2	CAT 3
52,714	491				0,33	0,67	0,51
52,86	492				0,22	0,21	-
55,13	498				0,43	0,58	0,12
55,694	500	CBD/CBD-A?			44,46	1,51	0,51
55,866	501				2,54	0,76	0,67
56,824	503				-	-	0,03
57,084	504				0,58	0,08	0,12
57,093	504				-	-	0,10
57,262	505				0,04	0,72	0,09
57,443	505				0,15	0,24	0,15
58,157	507	THC/THC-A?			33,01	77,03	82,33
58,288	508				1,04	2,20	-
58,779	509				0,07	0,24	-
59,402	511				0,38	0,91	0,5
59,524	512				0,60	0,98	1,61
59,623	512				0,36	0,97	0,25
59,929	513				0,14	0,47	0,16
62,318	520				-	0,63	-
				Σx_i (CAT_i)	100,0	100,0	100,0

Referencias: rojo, n-alcanos; verde, compuestos presentes en el estándar #1; azul, compuestos presentes en el estándar #2.

Las identificaciones se realizaron hasta el índice 1900 debido a que el mix utilizado para determinar los índices contenía hasta el nonadecano, realizar la extrapolación de los alcanos de cadena más larga no sería correcto. Se muestran, además otros compuestos que eluyen a temperaturas superiores que no pudieron ser identificados pero que demuestra que se trata de muestras muy complejas, entre ellos hay compuestos con abundancias relativas altas, por lo que se sospecha que sean cannabinoides abundantes en estas cepas, como el THC o CBD [11].

Los cromatogramas correspondientes a las 3 muestras CAT y sus perfiles de terpenos se puede encontrar en el Anexo I.

Discusión

El pretratamiento con solventes mostró ser muy eficaz a la hora de extraer terpenos de la muestra de Cannabis, sin embargo, ninguna de las experiencias realizadas demostró ser exhaustiva. Lo ideal sería realizar una serie de ciclos de extracción sobre la misma muestra y determinar la cantidad de veces que sería necesario adicionar solvente nuevo o también, optimizar el volumen y el tiempo de contacto con cada uno.

Se observó a partir de los resultados que los alcoholes permiten una mejor extracción y también se consideró que al aumentar el largo de la cadena de los alcoholes se obtenía una mejor extracción (observando la cantidad de picos y su altura) esto comparando los datos para el metanol y 1-butanol.

La extracción de tipo Head Space resultó satisfactoria a la hora de analizar las muestras de manera no destructiva, y permitió la determinación cualitativa de los terpenos de tres cepas diferentes. Considerando que las tres CAT pesaban aproximadamente lo mismo y si no se consideraran los errores relacionados al muestreo e inyección, los resultados podrían ser comparables entre sí.

La identificación de los terpenos se realizó mediante el uso estándares, índices de retención y comparación con datos de bibliografía, lo que resultó ser de gran utilidad, aunque el uso de un detector de masas sería fundamental para resolver algunas identificaciones tentativas.

Con respecto a las muestras CAT, podemos observar que se identificaron más de sesenta compuestos sin tener en cuenta aquellos con Índice de retención mayor a 1900, además de que se observaron claramente los picos correspondientes a los cannabinoides más abundantes. Considerando la información inicialmente obtenida, encontramos que la CAT 1 posee altos niveles de limoneno y pineno, además de concentraciones muy altas de β -cariofileno y mirceno, lo que le confiere propiedades antidepressivas, antimutagénicas, antibióticas y antiinflamatorias, además de aromas cítricos y herbales. Los valores de CBD+CBD-A y THC+THC-A en esta cepa también son elevados lo que se condice con lo estudiado por Vaccarini. Por su parte la CAT 2 muestra altos niveles de THC+THC-A, además de (Z)-ocimeno y α -trans-bergamoteno, por lo que presenta aromas relacionados al lúpulo y características analgésicas, antiinflamatorias y antibióticas. Por último la CAT 3, mostró tener un contenido alto de THC+THC-A y bajo en CBD, también condiciéndose con lo presentado en el trabajo anteriormente mencionado. Además, esta nueva cepa presenta elevados niveles de mirceno, lo que le brinda aroma a lúpulo y le confiere un efecto sedativo y relajante; (E)-ocimeno que aporta propiedades anticancerígenas, anti bactericidas y antifúngicas; y β -cariofileno, que está relacionado al tratamiento de isquemias cerebrales, osteoartritis, ansiedad y depresión, Alzheimer y tratamiento de células cancerígenas [30].

Perspectivas futuras

En función de la revisión bibliográfica y los resultados preliminares obtenidos, se empleará el uso de cromatografía gaseosa acoplada al detector de masas a través de la comparación de espectros de biblioteca para identificar con un mayor grado de confianza la composición cualitativa de terpenos en las muestras CATs. Se evaluará el uso de fibras de SPME (Solid Phase Micro Extraction) como método de preconcentración de este tipo de compuestos volátiles. Se optimizará el tratamiento térmico de las muestras (tiempo y temperatura) ya sea para HSE y SPME. Se estudiarán otros métodos de extracción como la extracción asistida por microondas y por ultrasonido.

Por otro lado, se empleará la columna de trihexil(tetradecil)fosfonio elaborada en el Laboratorio para estudiar la retención de los terpenos en columnas de líquidos iónicos.

Bibliografía

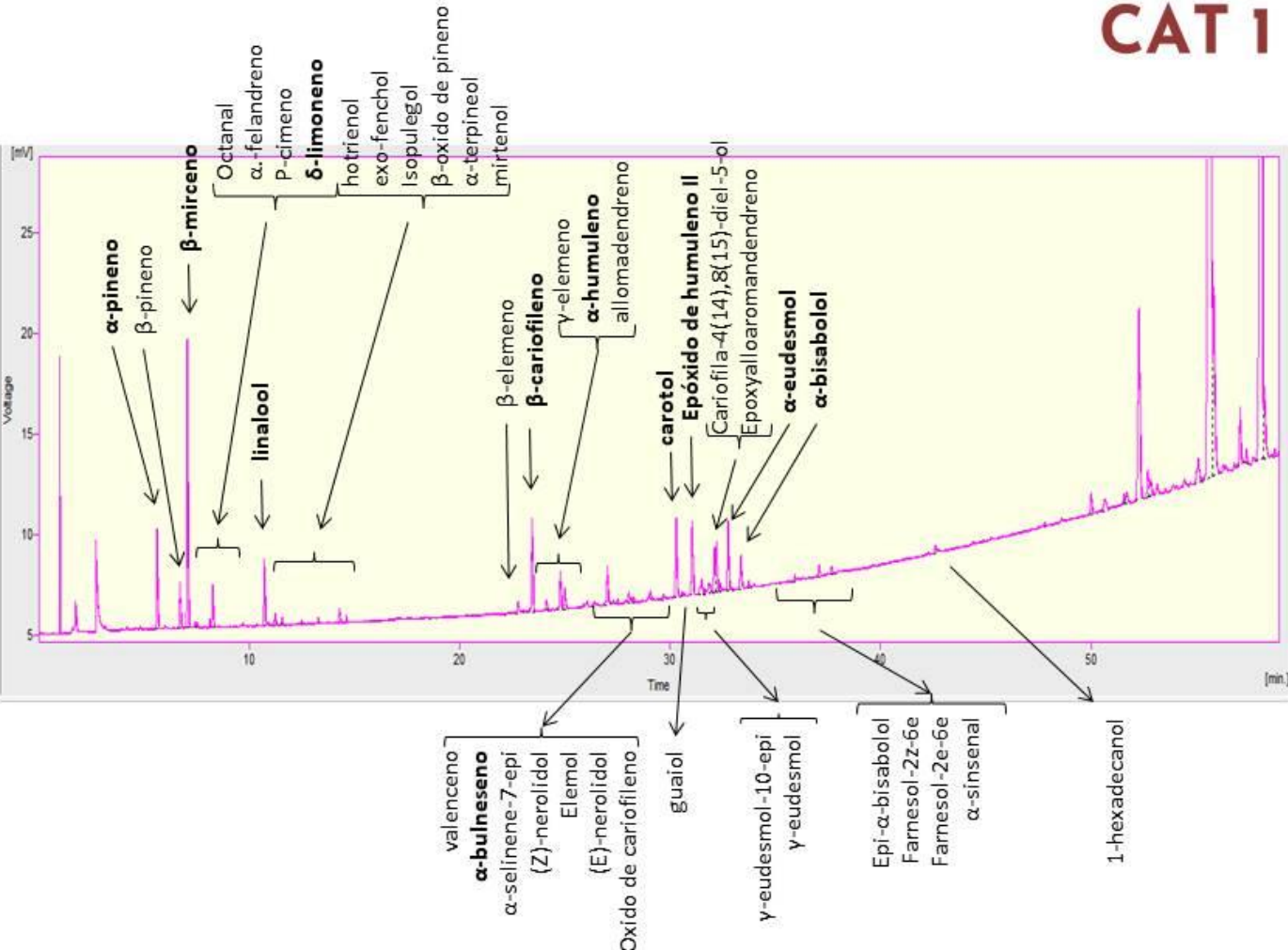
- [1] J.T. Fishedick, A. Hazekamp, T. Erkelens, Y.H. Choi, R. Verpoorte, Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes, *Phytochemistry*. 71 (2010) 2058–2073. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.10.001>.
- [2] E.B. Russo, Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects, *Br. J. Pharmacol.* 163 (2011) 1344–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>.
- [3] S. Andrade-Ochoa, A. Camacho, L. Rodríguez-Valdez, M. Villanueva, G. Nevarez-Moorillon, Theoretical Properties of Terpenes and their Relationship with Biological Activities., (2014). https://www.researchgate.net/publication/259474488_Theoretical_Properties_of_Terpenes_and_their_Relationship_with_Biological_Activities (accessed January 5, 2021).
- [4] J.K. Booth, J. Bohlmann, Terpenes in *Cannabis sativa* – From plant genome to humans, *Plant Sci.* 284 (2019) 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.022>.
- [5] J.M. McPartland, P.L. Pruitt, Side effects of pharmaceuticals not elicited by comparable herbal medicines: The case of tetrahydrocannabinol and marijuana, *Altern. Ther. Health Med.* 5 (1999) 57–62.
- [6] C.F. Carson, T. V. Riley, Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, *J. Appl. Bacteriol.* 78 (1995) 264–269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05025.x>.
- [7] F. Van Der Kooy, F. Maltese, H.C. Young, K.K. Hye, R. Verpoorte, Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting, *Planta Med.* 75 (2009) 763–775. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185450>.
- [8] Critical Mass CBD – Comprar de Semillas de Marihuana CBD Critical Mass, (n.d.). <https://www.dinafem.org/es/critical-mass-cbd/> (accessed January 7, 2021).
- [9] AK 48 (Feminizadas) Semillas de marihuana – Nirvana Shop, (n.d.). <https://es.nirvanashop.com/semillas-de-marihuana/820-ak-48-hembra.html> (accessed January 7, 2021).
- [10] Quinto elemento, la primera cepa 100% argentina | | Revista Cañamo Chile, (n.d.). <https://www.canamo.cl/quinto-elemento-la-primera-cepa-100-argentina/> (accessed January 7, 2021).
- [11] C.A. Vaccarini, Trabajo Final: Determinación de cannabinoides en distintas estructuras de la planta de *Cannabis sativa* sp . y derivados de la misma mediante HPLC / UV-DAD ., (2020).
- [12] E. Kováts, Gas-chromatographische Charakterisierung organischer

- Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone, *Helv. Chim. Acta.* 41 (1958) 1915–1932. <https://doi.org/10.1002/hlca.19580410703>.
- [13] H. Van den Dool, P.D. Kratz, A Generalization of the retention index system including lineal temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatography.* 266 (1962) 463–471. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70262-9_7.
- [14] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 1997.
- [15] R. Ascrizzi, G. Flamini, M. Giusiani, F. Stefanelli, V. Deriu, S. Chericoni, VOCs as fingerprints for the chemical profiling of hashish samples analyzed by HS-SPME/GC–MS and multivariate statistical tools, *Forensic Toxicol.* 36 (2018) 243–260. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0398-1>.
- [16] C. Citti, D. Braghiroli, M.A. Vandelli, G. Cannazza, Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 565–579. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.003>.
- [17] J. Omar, M. Olivares, M. Alzaga, N. Etxebarria, Optimisation and characterisation of marijuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1397–1404. <https://doi.org/10.1002/jssc.201201103>.
- [18] M. Halpenny, K.K. Stenerson, Quantitative Determination of Terpenes in Cannabis Using Headspace Solid Phase Microextraction and GC/MS, *Gerstel Appl. Note.* 189 (2017) 1–5.
- [19] M.W. Giese, M.A. Lewis, L. Giese, K.M. Smith, Development and validation of a reliable and robust method for the analysis of cannabinoids and terpenes in cannabis, *J. AOAC Int.* 98 (2015) 1503–1522. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-116>.
- [20] Customer insight into the identification and quantification of cannabinoids and cannabis terpenes Quality Assurance in Cannabis : Shamanics collaborates with Ellutia to provide quality and tested products to its consumers, (n.d.).
- [21] J. Zekič, M. Križman, Development of Gas-Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Cannabinoids and Terpenes in Hemp, *Molecules.* 25 (2020) 19–27. <https://doi.org/10.3390/molecules25245872>.
- [22] N.R. Ronco, C. Lancioni, L.M. Romero, C.B. Castells, Efficiency of capillary GC columns based on phosphonium ionic liquids, *J. Chromatogr. A.* 1622 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461127>.
- [23] C. Ragonese, D. Sciarrone, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, D. Farmaco-chimico, V. Annunziata, À. Messina, Analysis of Flavor and Fragrance Compounds, *Anal. Chem.* 83 (2011) 7947–7954.
- [24] T. Herring, Can HPLC-UV Be Used For Terpenes Analysis In Cannabis?

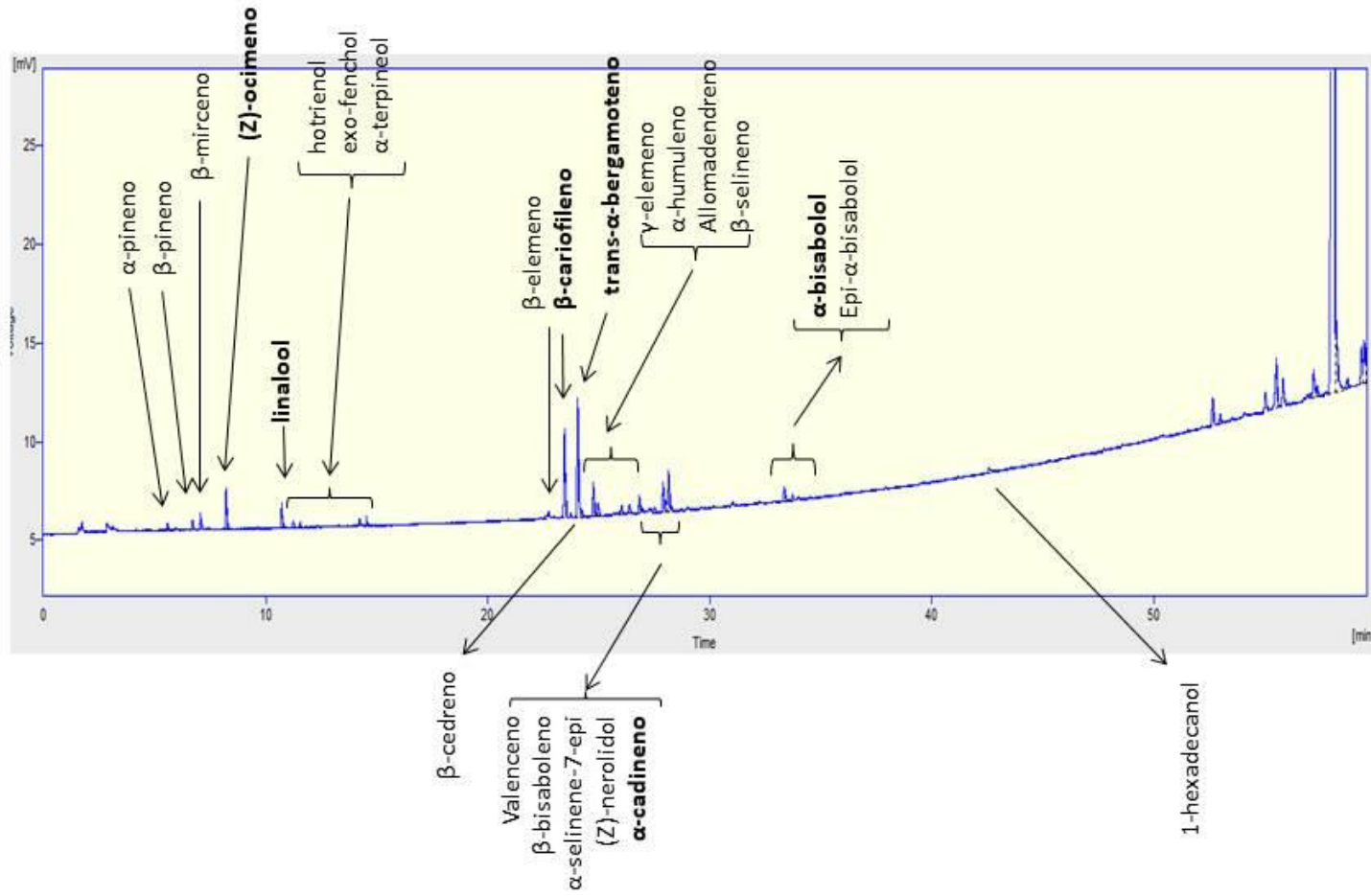
- « ChromaBLOGraphy: Restek's Chromatography Blog, (2016). <https://blog.restek.com/can-hplc-be-used-for-terpenes-analysis-in-cannabis/> (accessed February 10, 2021).
- [25] A. Musenga, A. Ferranti, M.A. Saracino, S. Fanali, M.A. Raggi, Simultaneous determination of aromatic and terpenic constituents of cloves by means of HPLC with diode array detection, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1251–1258. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600023>.
- [26] C. Laugel, A. Baillet, D. Ferrier, Improved HPLC determination of the Centella Asiatica terpenes: Analysis in a multiple emulsion, influence of the surfactants on the retention, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 21 (1998) 1333–1345. <https://doi.org/10.1080/10826079808005881>.
- [27] K. Hyland, C. Borton, P. Winkler, S. Roberts, M. Noestheden, Quantitation of Terpenes in Cannabis Products Using APCI LC-MS/MS, *Planta Med.* 82 (2016). <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579770>.
- [28] B.B. Sliz, Trabajo final de grado: "Desarrollo de metodos para la derivatizacion y cuantificacion de glufosinato, glifosato y acido aminometilfosfonico", 2017.
- [29] V.I. Babushok, P.J. Linstrom, I.G. Zenkevich, Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils, *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 40 (2011). <https://doi.org/10.1063/1.3653552>.
- [30] J.A. Hasrtel, A. Makriyannis, Caryophyllene - an overview | ScienceDirect Topics, (n.d.). <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/caryophyllene> (accessed February 8, 2021).

Anexo I

CAT 1



CAT 2



CAT 3

