



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Licenciatura en Química

Trabajo Final

*Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción
de cannabinoides empleados usualmente en
preparaciones caseras para la obtención de aceite de
Cannabis*

Cristina D. Bugvila

Directora:

Dra. Daniela Sedan

Tutor:

Dr. Darío Andrinolo

Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIM)

2022

Agradecimientos

Quiero agradecer efusivamente a mi directora Daniela por el acompañamiento brindado a lo largo de este trabajo, por su extra paciencia y dedicación; por las charlas, consejos y enseñanzas. La vocación que demostrás a la hora de investigar resulta inspiradora. Representa no solo una alegría, si no todo un orgullo trabajar juntas. A Darío, por la confianza y seguridad dada, por permitirme explorar en el laboratorio las ideas locas que se me ocurrían, parte de las cuales se reflejan en este trabajo. A Pita y Lucho por la ayuda brindada en el laboratorio, por rescatarme más de una vez de los problemas a los cuales me enfrentaba y por alentarme frente a las adversidades. Definitivamente me hace muy feliz ser parte del Proyecto de Extensión “Cannabis y Salud”. Nico, Antual, Dante, a todos los que forman y formaron parte, ¡Gracias! A Sonia por su amistad, consejo, escucha y guía durante más de 15 años que llevamos siendo amigas.

Un enorme GRACIAS a todas las amistades que fui tejiendo a lo largo de mi camino facultativo: Ivi, Mari, Offy, Flor, Emi, Ire, Casia, Anto, Leo, Pablo, Nico, Iván, Mari CIM y a todas aquellas personas con las cuales compartí risas y alegrías. Gracias por animarme a seguir a pesar de cada tropiezo, cada desaprobado y los nervios. Lo crean o no, son una parte fundamental de mi camino por Exactas y una de las más importantes que me llevo conmigo. Un agradecimiento enorme a Candela, Nermi y Julian por sentirme tan bienvenida en mis primeros pasitos junto al cannabis; es realmente un gusto escucharlos hablar con la pasión que tienen sobre esta maravillosa planta. No quiero dejar de agradecer a mi familia por el acompañamiento brindado desde el comienzo, gracias por hacer que todos estos años de carrera fueran más fáciles de transitar. Mami, muchas gracias por no solo alimentarme a mí, sino también a media Facultad. Tu cariño y cuidado también aportaron a la energía necesaria para terminar este trabajo. Ale, Adri, Male y Nicky, gracias por ayudarme, ya sea desde prestarme el auto, hasta escucharme y asesorarme en este camino, les estoy enormemente agradecida. Papi, sé que estarías orgulloso no solo de este trabajo sino de todo lo que he logrado en estos años, gracias por todas las herramientas y enseñanzas que me dejaste, te extraño y te quiero.

No existen suficientes palabras para describir lo agradecida que estoy con todos ustedes.

Infinitamente Gracias ♥

Índice

✿ Introducción	06
✿ Objetivos	12
1.1. Objetivo General.....	12
1.2. Objetivos específicos	12
✿ Materiales y Métodos	14
1. Material vegetal empleado	15
2. Procesos de obtención de aceites a base de Cannabis. Diseños Experimentales	16
2.1. Extracción Alcohólica	17
2.2. Macerado a temperatura ambiente	18
2.3. Macerado con calentamiento	19
2.4. Extracción por Afinidad	19
3. Procesamiento de muestras y determinaciones analíticas 3.1. Procesamiento de muestras para determinación de cannabinoides y terpenos	20
3.2. Determinación del perfil de cannabinoides por HPLC-UV/DAD	21
3.3. Determinación del perfil de terpenos por GC/FID	22
3.4. Determinación de etanol por microdifusión en Cámara de Conway	23
4. Análisis de resultados	23
✿ Resultados y Discusión	24
◇ Capítulo 1: Estudio de aceites de cannabis obtenidos por dos métodos tradicionales: Extracción alcohólica y Macerado en aceite.....	25
1. Método de obtención de aceites mediante Extracción alcohólica	26
1.1. Descripción de inflorescencias durante el proceso de extracción	27
1.2. Caracterización química del extracto alcohólico de partida.....	27
✿ Determinación del Perfil de Cannabinoides	27
✿ Determinación del Perfil de Terpenos.....	32
1.3. Caracterización química del aceite resultante de la extracción Alcohólica.....	35
✿ Perfil de Cannabinoides.....	35
✿ Perfil de Terpenos.....	38
✿ Etanol Residual	39

2. Método de obtención de aceites mediante Macerado de inflorescencias en aceite comestible.	
2.1. Descripción de inflorescencias durante los procesos de macerado	40
2.2. Caracterización química del aceite resultante de los procesos de macerado	
✿ Perfil de Cannabinoides	42
✿ Perfil de Terpenos.....	46
3. Estabilidad de los aceites obtenidos por extracción alcohólica y macerados	48
✿ Discusión	51
✿ Conclusiones particulares	57
◇ Capítulo 2: Estudio de un método alternativo de obtención de aceites de cannabis: Extracción por Afinidad	58
1. Método de obtención de aceites mediante Afinidad	59
1.1. Caracterización química del aceite resultante de la extracción por Afinidad	
✿ Perfil de Cannabinoides	60
✿ Perfil de Terpenos.....	63
✿ Etanol Residual	67
2. Estabilidad de los aceites obtenidos por el método de Afinidad	67
✿ Discusión	69
✿ Conclusiones particulares	73
✿ Conclusiones	75
✿ Bibliografía	79

Introducción



INTRODUCCIÓN

La planta de Cannabis (*Cannabis sativa* L.) se ha cultivado durante al menos 6000 años, lo que la convierte en uno de los cultivos más antiguos del mundo (Small, 2015). De hecho, el cannabis se describe en casi todos los manuales antiguos sobre medicina vegetal, más comúnmente en forma de tintura o té (Zuardi et al., 2006; Grotenhermen et al., 2002). Se trata de una especie dioica, perteneciente a la familia Cannabácea, que cuenta con inflorescencias femeninas formadas por cálices que se agrupan en racimos en las ramas y el tallo. *Cannabis sativa* L. es capaz de biosintetizar una amplia variedad de metabolitos secundarios; siendo estos los que generan el principal interés por el cultivo de la misma. Se reconocen y se emplean subespecies de *Cannabis sativa* L., tales como *Cannabis sativa sativa*, *Cannabis sativa indica* y *Cannabis sativa ruderalis* (Small & Cronquist., 1976). Hasta la fecha han sido identificados 565 compuestos químicos, entre ellos alrededor de 120 cannabinoides y otro centenar de terpenos (Deidda et al., 2019).

En el interior de la planta, los cannabinoides y terpenos se sintetizan en células secretoras dentro de los tricomas glandulares que están más concentrados en las flores femeninas no fertilizadas antes de la senescencia (Russo, 2011). Además de la localización en las inflorescencias, los cannabinoides se encuentran distribuidos en prácticamente todos los tejidos de la planta: hojas, tallos, raíces y semillas. (Vaccarini, 2020).

Los cannabinoides se sintetizan en la planta en forma de ácidos carboxílicos a partir del ácido cannabigerólico (CBGA), que se origina de la combinación de pirofosfato de geranilo y ácido olivetólico; transformándose luego en ácido tetrahidrocannabinólico (THC-A), ácido cannabidiólico (CBD-A) y ácido cannabicroménico (CBCA); siendo cada una de estas reacciones catalizadas por una enzima sintasa particular (Sirikantarmas et al., 2007) tal como se observa en la **Figura 1**. Estos cannabinoides ácidos sintetizados por la planta pueden luego sufrir un proceso denominado descarboxilación (**Figura 2**), dando como resultado moléculas neutras al ser expuestos a la luz, al calor o periodos prolongados de almacenamiento (Taura et al., 2009).

La mayor parte de la eficacia terapéutica de los preparados proviene del contenido y el perfil de cannabinoides, sustancias de características lipofílicas entre los cuales los más estudiados son el delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC o directamente THC), cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG) y el cannabinol (CBN).

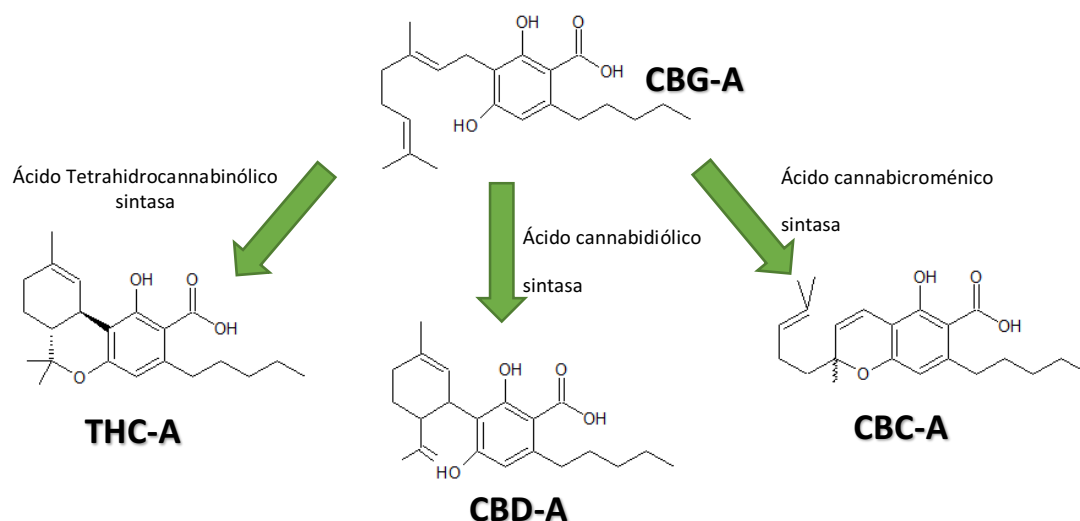


Figura 1. Representación gráfica de la ruta biosintética para los cannabinoides ácidos THC-A, CBD-A y CBC-A.

Las principales propiedades terapéuticas de estos cannabinoides se listan en la **Tabla 1**, destacando en el caso del THC los efectos analgésicos y antieméticos además de los efectos psicoactivos, en el caso del CBD las propiedades anti-inflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antipsicóticas; y finalmente en el caso del CBN propiedades anticonvulsivas y sedantes (Greydanus et al., 2013; Pertwee et al., 2014; NAS., 2017).

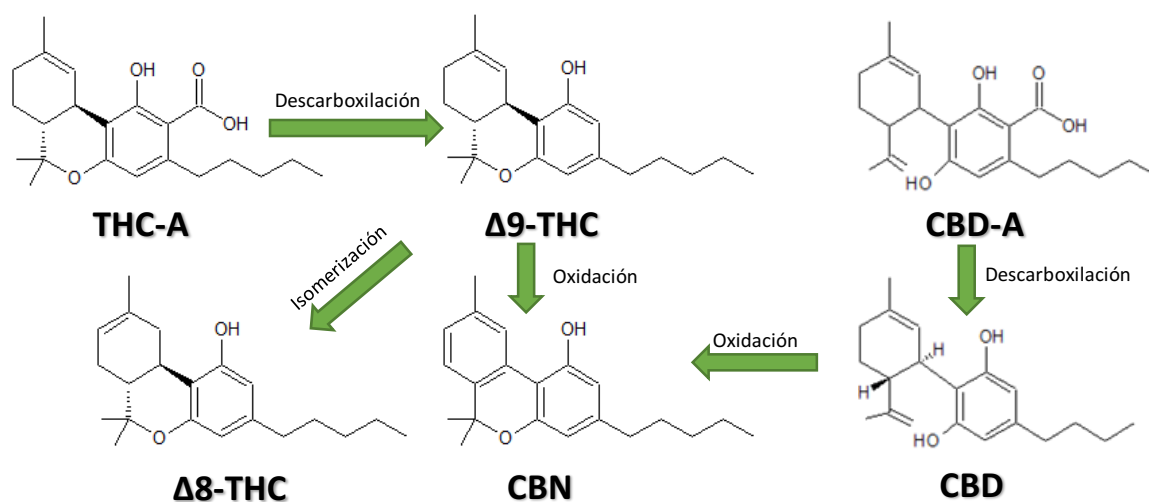


Figura 2. Representación gráfica del proceso de descarboxilación, isomerización y oxidación a partir del THC-A y CBD-A.

Los cannabinoides ácidos han recibido mucho menos interés en su investigación, sin embargo, presentan fascinantes propiedades farmacológicas (**Tabla 1**). El ácido tetrahidrocannabinólico (THC-A) posee efectos antiinflamatorios, antieméticos,

neuroprotectores y anti-convulsionantes. El ácido cannabidiólico (CBD-A) resulta ser también un poderoso agente ansiolítico, antiemético y antioxidante; siendo que ambos ácidos reportan prominentes beneficios en la piel y contra células tumorales. (MacCallum et al., 2018).

Cannabinoide	Propiedades
THC-A	Antiinflamatorio, Antiemético, Neuroprotector.
Δ 9-THC	Antioxidante, Analgésico, Antiinflamatorio, Euforizante.
Δ 8-THC	Mismas propiedades que el Δ 9-THC, pero con menor potencia. Antiemético
CBD-A	Antioxidante, Antiemético, Ansiolítico.
CBD	Ansiolítico, Antipsicótico, Antiinflamatorio, Antiespasmódico.
CBN	Sedativo, Antibiótico.

Tabla 1. Propiedades farmacológicas de los principales cannabinoides. Fuentes: MacPartland et al, 2001; Russo et al, 2011 y MacCallum et al, 2018.

Las principales propiedades fisicoquímicas de los cannabinoides se listan en la **Tabla 2**. Una particularidad respecto al CBN es que no es biosintetizado por la planta, sino que es un producto de la degradación oxidativa de otras moléculas neutras como el THC y CBD (**Figura 2**). Así mismo, el Δ 8-THC no se produce naturalmente, resultando ser un isómero térmicamente más estable que el Δ 9-THC, aumentando en su concentración durante los calentamientos prolongados (Hazekamp et al., 2004, Ramirez et al., 2018).

Propiedades	THC-A	Δ 9-THC	Δ 8-THC	CBD-A	CBD	CBN
Punto de ebullición (°C)	437±45	390±42	384±42	531±50	464±45	474
Flash point (°C)	142±22	149±22	145±22	289±27	206±23	213
H donador (puente de H)	2	1	1	3	2	1
PSA	66,8	29,5	29,5	77,8	40,5	29,5
Log Kow	8,4	7,7	7,6	7,9	7,0	5,7

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas para los principales cannabinoides. PSA: Área polar superficial, Kow: Coeficiente de reparto octanol/agua. Fuente: ChemSpider.

Por ello, los niveles de CBN y/o Δ 8-THC se interpretan en muchos casos como indicadores de la calidad de materiales o mecánicas de procesamiento en la elaboración de aceites, dado que las presencias de los mismos informarían el uso de inflorescencias con largos tiempos de

almacenamiento y/o mal conservadas para el caso del CBN, además de calentamientos excesivos si se encuentra la presencia de ambos (Dawson & Roggen, 2021; Sedan et al., 2021).

Dado que el perfil de cannabinoides y la relación entre ellos es característico de la variedad de Cannabis, se ha propuesto que una clasificación en base a su quimiotipo resulta más efectiva que la clasificación tradicional en sub-especies sativa, indica y ruderalis; dado que hoy en día la mayor parte de las variedades resultan ser híbridos resultantes de cruza entre estas sub-especies (Hazekamp et al., 2016). En este sentido se definen los siguientes 3 quimiotipos de Cannabis: Quimiotipo I: con altas cantidades de THC (THC: CBD \gg 1), Quimiotipo II: con iguales cantidades de THC y CBD, (THC: CBD = 1, aceptable entre 0.5-2) y Quimiotipo III: con alto contenido de CBD (THC: CBD \ll 1) (Pacífico et al., 2007).

Sin embargo, los cannabinoides no son las únicas sustancias con efectos benéficos reconocidos presentes en la planta de cannabis. Se encuentran acompañados por los terpenos, otra clase de compuestos biosintetizados por la planta, los cuales son los principales responsables del característico aroma que posee el cannabis (Ternelli et al., 2020).

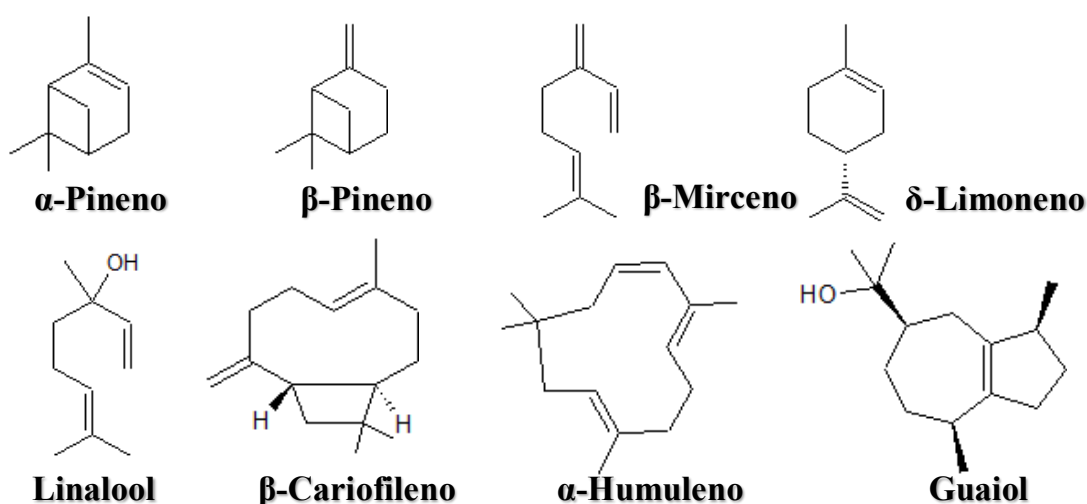


Figura 3. Estructura molecular de los principales terpenos hallados en CAT1.

Estos componentes volátiles derivan de varias combinaciones de unidades repetitivas de isopreno (esqueleto de 5 carbonos) y pueden ser divididos en dos clasificaciones basadas en el número de átomos de carbono encontrados en su estructura: monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15) (**Tabla 3**). La estructura final de los mismos (**Figura 3**) puede abarcar desde simples cadenas lineales a complejos compuestos policíclicos que pueden incluir

alcoholes, éteres, aldehídos, cetonas o esterés como grupos funcionales (McPartland et al., 2001). Los monoterpenos y los alcoholes terpénicos (aquellos terpenos con un alcohol como grupo funcional) son altamente volátiles, mientras que los sesquiterpenos son susceptibles a la degradación y presentan inestabilidad cuando son expuestos a la oxidación del aire y altas temperaturas (Namdar et al., 2018). El perfil de terpenos resulta característico y particular de cada variedad de cannabis, con lo cual se ha postulado la posibilidad de emplear dicho perfil en la identificación de diferentes especímenes de plantas (Zekič & Krisman, 2020).

Terpeno	P.E.(°C)	F.P. (°C)	P.Vapor	Propiedades
α -Pinoeno	156	32,2	3,49	Antiinflamatorio, Broncodilatador, Estimulante, Antibiótico, Antineoplásico
β -Pinoeno	165	36	2,93	Antibiótico, Antioxidante, Ansiolítico, Anticoagulante, Analgésico.
β -Mirceno	167	39,4	2,3	Analgésico, Antiinflamatorio, Antibiótico, Antimutagénico.
δ -Limoneno	175,4	48	1,5	Antagonista de cannabinoides, Potenciador inmunológico, Antidepresivo, Antimutagénico
Linalool	198,5	76,1	0,17	Sedante, Antidepresivo, Ansiolítico, Potenciador inmunológico
β -Cariofileno	268,4	104,9	0,12	Antiinflamatorio Citoprotector (de la mucosa gástrica), Antimalárico
α -Humuleno	168	90	0,01	Antiinflamatorio, Analgésico, Antibacterial
Guaiol	288	113,6	0,0003	Ansiolítico, Antiinflamatorio, Antioxidante Antirreumático

Tabla 3. Principales propiedades fisicoquímica y farmacológicas de algunos terpenos de interés. Fuentes: MacPartland et al, 2001; Russo et al, 2011; MacCallum et al, 2018; ChemSrc. P.E: Punto de Ebullición, F.P: Flash point y presión de vapor en mm de Hg a 25°C.

En la literatura se han reportado diferentes perfiles de cannabinoides y terpenos de distintas variedades de cannabis y se ha establecido que los rangos típicos en porcentaje respecto del peso seco de las inflorescencias van del 0,1 al 40% para los cannabinoides y del 0,01 al 1,5% para los terpenos (Giese et al., 2015).

El cannabis ha sido una planta terapéutica con una versatilidad sin precedentes durante milenios, pero su mecanismo de acción resultaba ser un misterio sin resolver. A partir de la década del 60 comenzaron los descubrimientos que permitieron dilucidar cuales son las

moléculas del cannabis vinculadas con el efecto que el mismo produce sobre el organismo, las dianas celulares donde ejerce su acción y las moléculas endógenas que actúan sobre esas mismas dianas. El puntapié inicial de estos descubrimientos fue el aislamiento y purificación del THC (Gaoni & Mechoulam, 1964), seguido por la clonación de los receptores sobre los cuales actúa, conocidos como CB1 y CB2 (Devane et al., 1988); y la determinación de las dos moléculas endógenas, anandamida (araquidoniletanolamina, AEA) y 2-araquidonil glicerol (2-AG), denominados en conjunto endocannabinoides (**Figura 4**), que activan esos receptores (Mechoulam & Ben-Shabat, 1999; Mechoulam, 1982).

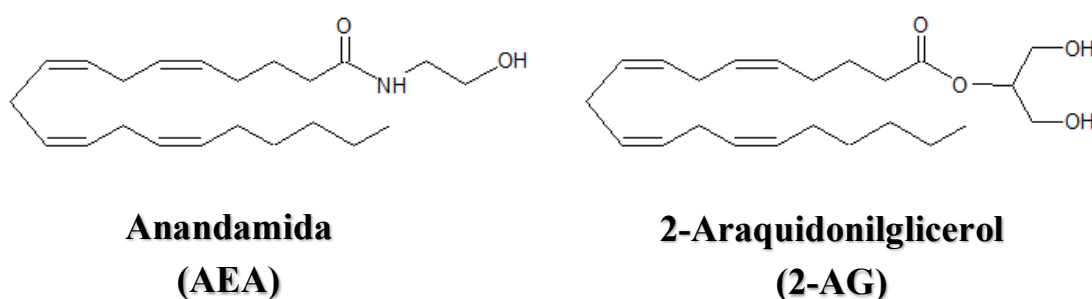


Figura 4. Estructura molecular de los endocannabinoides anandamida y 2-araquidonilglicerol.

Finalmente se estableció que el conjunto formado por los receptores de cannabinoides, los endocannabinoides, las enzimas que los sintetizan y degradan constituyen el Sistema Endocannabinoides (SEC). El SEC es un sistema homeostático que regula o modula un enorme número de funciones fisiológicas (De Pterocellis & Di Marzo, 2009). El hecho que los fitocannabinoides ejerzan su acción de forma similar a la de los endocannabinoides es lo que permite a estas moléculas externas modular la actividad de este sistema y resulta la base del impacto terapéutico que tienen los derivados de cannabis sobre muchas enfermedades y trastornos que afectan a los humanos como el síndrome metabólico, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, inflamación, problemas cardiovasculares y gastrointestinales, problemas en la piel, dolor crónico, cáncer, efectos secundarios de la quimioterapia como las náuseas o la falta de apetito, entre otras, según afirman distintos investigadores (Di Marzo & Piscitelli, 2015; Mechoulam et al, 2016).

Las diferencias en las propiedades benéficas de las distintas variedades de cannabis y productos derivados pueden atribuirse estrictamente a las interacciones definidas como "efecto sequito" entre los cannabinoides y los terpenos que hacen que el efecto de la combinación de estos compuestos resulte diferente del efecto generado por cada uno de ellos de manera aislada (Calvi et al., 2018). Así, el efecto combinado de los cannabinoides con los

terpenos puede producir una exacerbación o una disminución de la potencia que los mismos poseen por separado.

Haciendo uso de las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos y ante la necesidad de la población de obtener derivados de cannabis en sus hogares, los métodos de extracción más utilizados por los mismos se pueden dividir en dos categorías: la extracción alcohólica y los macerados en aceite.

Por un lado, en la extracción alcohólica se suele usar como referencia la experiencia de Rick Simpson, un canadiense que entre varias declaraciones afirma haber curado su cáncer de piel a partir de la aplicación repetitiva de aceite de cannabis producido de acuerdo a su propia receta. A partir de su experiencia se han realizado pequeños cambios en el método buscando usar solventes más seguros que la nafta empleada por Simpson, como el etanol, para finalmente obtener una resina concentrada de cannabinoides que es disuelta en aceite previo a su uso (Romano & Hazekamp, 2013). Por otro lado, los macerados en aceite se vienen utilizando de manera casi cotidiana en el ámbito culinario y en la herboristería para extraer las propiedades organolépticas y los principios activos de alimentos, flores, hierbas y especias como puede ser el romero, el ajo, la pimienta y el orégano entre otras; con la ventaja de no precisar ningún solvente o reactivo químico, más allá del contacto de la planta de interés con el aceite por un cierto tiempo de contacto.

Basándose en estos conocimientos y en experiencias transmitidas de boca en boca, las organizaciones sociales y los usuarios han desarrollado sus propios aceites en sus hogares, declarando en el proceso y de manera empírica como tal o cual aceite resulta ser más o menos efectivo para determinadas patologías.

Dado que estas prácticas de preparación de aceite a base de cannabis de forma casera resulta una práctica habitual entre los usuarios terapéuticos y cultivadores solidarios, y entendiendo que es necesario establecer las características químicas que estos preparados presentan con el fin de aportar información a usuarios y médicos tratantes que permitan entender y optimizar la terapéutica empleada es que se establecieron los ensayos necesarios para caracterizar los aceites obtenidos por cada método desde un punto de vista químico; analizando cómo se ven afectados los perfiles de cannabinoides y de terpenos durante las extracciones caseras y observando cómo se comportan los mismos durante su almacenamiento. Así mismo, se ha propuesto un método de obtención de aceite diferente a los empleados tradicionalmente y se ha realizado la evaluación y caracterización del producto obtenido.

Objetivos

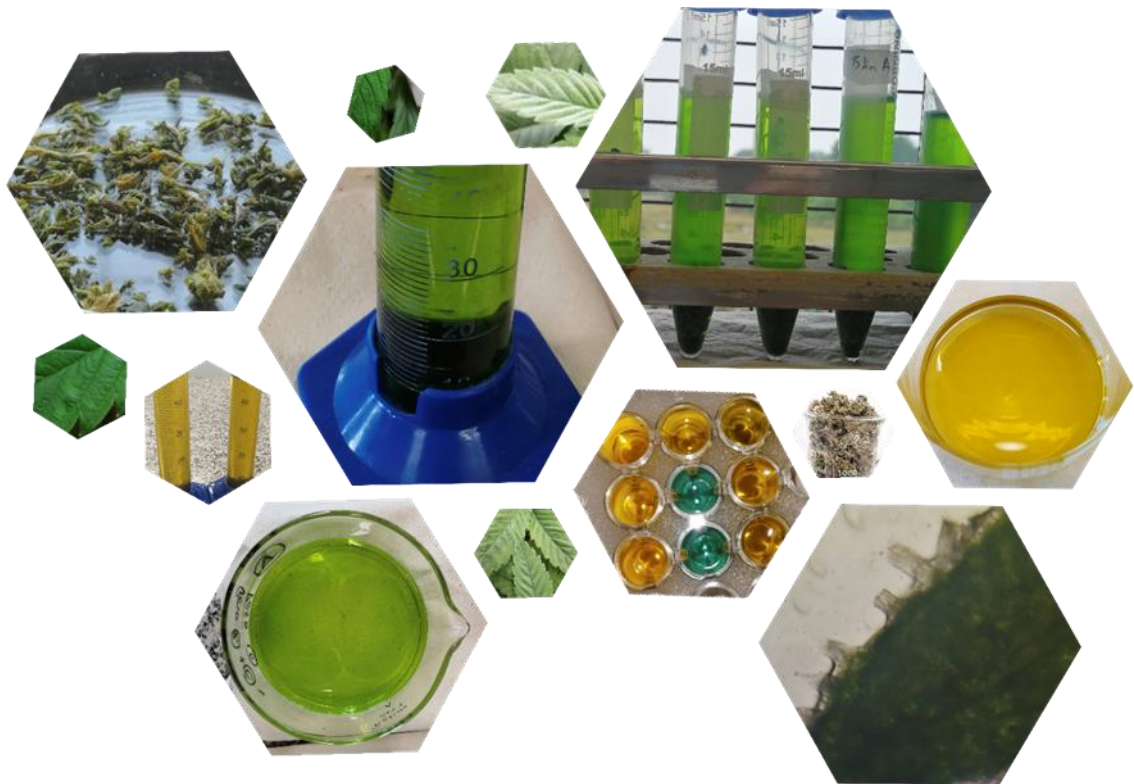
1.1. Objetivo General

Dado el auge del uso de cannabis de forma terapéutica y la multiplicidad de orígenes y procesos empleados de forma casera para obtener aceites a base de cannabis, se ha constatado una gran variabilidad en los productos derivados de cannabis de uso terapéutico/medicinal. Por ello el objetivo general del presente plan de trabajo es realizar un estudio comparativo de los métodos de extracción de cannabinoides más comúnmente empleados en la obtención casera de aceites; así como analizar un método alternativo de preparación de los mismos.

1.2. Objetivos Específicos:

- ✿ Estudio del perfil de cannabinoides en los aceites producidos mediante extracción alcohólica y diversas condiciones de macerado en aceite, empleando determinación analítica por cromatografía líquida (HPLC-UV/DAD).
- ✿ Estudio del perfil de terpenos en los aceites producidos mediante extracción alcohólica y diversas condiciones de macerado en aceite, empleando determinación analítica por cromatografía gaseosa (GC/FID).
- ✿ Estudio del perfil de cannabinoides (HPLC-UV/DAD) y terpenos (GC/FID) en aceites obtenidos mediante un método alternativo de extracción basado en afinidad.
- ✿ Evaluar comparativamente la eficiencia de extracción, estabilidad y características de los perfiles de cannabinoides y terpenos presentes en los productos obtenidos a partir de la misma variedad de Cannabis en los distintos procesos estudiados.

Materiales y Métodos



Materiales y Métodos

1. Material vegetal empleado.

Para este trabajo se utilizaron inflorescencias de la Cepa Argentina Terapéutica 1 (CAT 1) (**Figura 5**). Dicho material proviene del primer Cultivo Universitario de Cannabis que se encuentra en el Centro de Investigación del Medioambiente (CIM-UNLP-CONICET). Estas plantas fueron mantenidas y cultivadas como se detalla en Vaccarini (2020).



Figura 5. Ejemplares de las Cepas Argentinas Terapéuticas (CAT) 1 en período vegetativo.

Se decidió trabajar con la variedad CAT 1, ya que es una variedad rica en CBD, que también contiene THC (Relación CBD:THC 1,5:1), empleada frecuentemente en preparaciones de uso terapéutico por los usuarios y organizaciones sociales. Así mismo posee un perfil de terpenos el cual fue determinado a partir del aceite esencial obtenido mediante destilación por arrastre de vapor presentado en la **Tabla 4**.

α -Pino	β -Pino	β -Mirceno	δ -Limoneno	Linalool	β -Cariofileno	α -Humuleno	Guaiol
1,72 \pm 0,15	1,09 \pm 0,03	9,31 \pm 1,13	1,29 \pm 0,16	2,02 \pm 0,07	2,83 \pm 0,24	1,95 \pm 0,19	1,28 \pm 0,11

Tabla 4. Concentración en mg/ g de flor para el perfil de terpenos de CAT1.

Luego de cosechar, las inflorescencias fueron secadas a temperatura ambiente en un ambiente seco, fresco y a resguardo de la luz durante 2 semanas. Se escogió trabajar con inflorescencias sin descarboxilar para observar cómo se comportan tanto los

cannabinoides ácidos como neutros en cada método de obtención de aceites y en el posterior almacenamiento de los mismos.

El material vegetal así preparado fue empleado en los diseños experimentales que se describirán a continuación. El material que no se empleó inmediatamente fue mantenido en frascos con cierre hermético en freezer a -20°C hasta su utilización.

2. Procesos de obtención de aceites a base de Cannabis. Diseños experimentales:

Este trabajo fue realizado utilizando dos procesos de obtención de aceites empleados habitualmente por organizaciones sociales basados uno en la extracción alcohólica y el otro en el macerado directo de las flores en aceite. A partir de esto se estudió un proceso de obtención de aceite, que no se emplea habitualmente, basado en la extracción por afinidad utilizando como base una solución hidroalcohólica obtenida de inflorescencias de CAT1 y como fase extractante aceite de girasol. Para el diseño de los protocolos de los métodos de obtención por extracción alcohólica y macerado en aceite, se tomaron como base los folletos realizados por la Asociación Cultural Jardín del Unicornio y Mamá Cultiva La Plata (**Figura 6**) entre otros, con el fin de reproducir en el laboratorio lo más fielmente posible las prácticas realizadas de forma casera por los usuarios.

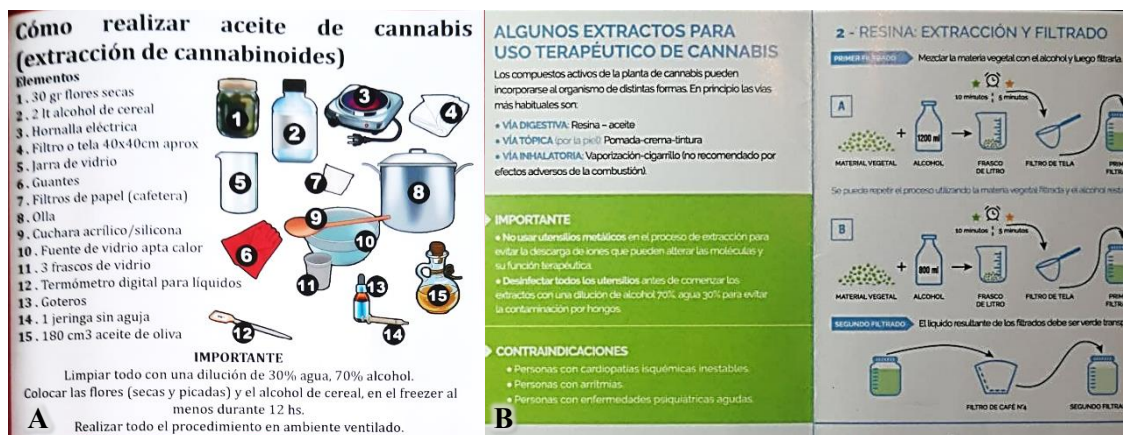


Figura 6. Manuales de extracción de cannabinoides pertenecientes a: A) Asociación Cultural Jardín del Unicornio. B) ONG Mamá Cultiva La Plata.

Previo a cada extracción, el material vegetal seco fue picado manualmente con tijeras con el fin de dejarlo finamente dividido para aumentar la superficie de contacto con cada uno de los extractantes empleados. Así mismo se observaron al microscopio óptico muestras de las inflorescencias empleadas antes y después de los procesos de

extracción. Cada uno de los diseños experimentales descritos a continuación, fue llevado a cabo por triplicado.

2.1. Extracción Alcohólica

En un vaso de precipitados se colocó una relación 1 gr de inflorescencias cada 20 ml de etanol 96% (Purocol ®) con agitación magnética durante 5 minutos. Pasado el tiempo de contacto la mezcla se filtró inicialmente con gasa estéril y luego con papel de filtro (*Figura 7 A, B y C*). Se tomó una muestra de la solución etanólica obtenida para la posterior determinación de cannabinoides y terpenos.



Figura 7. Obtención del extracto alcohólico a partir de inflorescencias de CAT1. **A)** Material vegetal picado. **B)** Extracto alcohólico durante la agitación. **C)** Filtración con papel de filtro posterior al filtrado con gasa. **D)** Extracto alcohólico resultante.

El resto del extracto alcohólico se colocó en un cristalizador y se llevó a un baño termostático a 45°C para favorecer la evaporación del solvente (*Figura 8 A*).

Finalizada la evaporación del alcohol se obtuvo una resina color caramelo, la cual fue resuspendida en 30 ml de aceite de girasol (Natura®) (*Figura 8 B y C*).



Figura 8. Obtención de aceite a partir del extracto alcohólico de CAT1. **A)** Evaporación del etanol dentro del baño termostático **B)** Resina obtenida al finalizar la evaporación **C)** Aceite resultante al disolver la resina en el mismo.

Una muestra del aceite a base de cannabis obtenido fue tomada para la posterior determinación de cannabinoides, terpenos y para la medición del remanente de etanol empleando microdifusión en Cámara de Conway. El aceite restante fue fraccionado en dos goteros color caramelo y almacenados uno en heladera (4°C) y otro a temperatura ambiente (T amb) durante varios meses.

2.2. Macerado a temperatura ambiente

El estudio de la obtención de aceites por macerado a temperatura ambiente se llevó a cabo considerando diferentes tiempos de contacto, definiendo un tiempo máximo para la experiencia de 60 días. Para ello se realizaron ensayos independientes a los siguientes tiempos de contacto total: 1, 5, 15, 30 y 60 días. En cada tiempo estipulado se empleó un frasco con tapa donde se colocó una relación de 1 gr de inflorescencias picadas con 15 ml de aceite (Natura®).



Figura 9. Obtención de aceite por macerado a temperatura ambiente de inflorescencias de CAT1 en aceite de girasol. **A)** Flores picadas de CAT 1 y aceite de girasol inicial **B)** Material vegetal cubierto de aceite **C)** Filtrado por gasa del material vegetal **D)** Material vegetal post extracción.

El frasco se cubrió con papel aluminio para evitar el contacto con la luz solar, se mantuvo a temperatura ambiente y fue agitado vigorosa y periódicamente durante el tiempo de contacto estipulado en cada caso. Cumplido el tiempo de contacto se filtró el material vegetal con gasa estéril y se tomó una muestra de cada aceite para la posterior determinación de cannabinoides y terpenos (**Figura 9**). El remanente de aceite en cada caso, fue fraccionado en dos goteros color caramelo, siendo almacenados uno en heladera (4°C) y otro a T amb durante varios meses.

2.3. Macerado con calentamiento

En frascos de vidrio boro silicato con tapa se colocó una relación de 1 gr de material vegetal cada 15 ml de aceite (Natura®). Los frascos tapados fueron calentados en simultaneo a baño de María durante 1, 2 y 3 horas respectivamente, siendo agitados cada 10 minutos. Pasado el tiempo correspondiente, cada frasco se retiró del baño y se esperó a que alcancen temperatura ambiente, luego de lo cual se procedió a filtrar con gasa estéril para obtener el aceite. Seguidamente se tomó una muestra del aceite obtenido en cada caso para la posterior determinación de cannabinoides y terpenos. Los aceites fueron fraccionados en goteros color caramelo y para cada condición de obtención se almacenó una parte en la heladera (4°C) y la otra a temperatura ambiente durante varios meses.

2.4. Extracción por Afinidad

El paso inicial para la extracción por afinidad es exactamente igual al descrito para la extracción alcohólica clásica (*Sección 2.1*), consistiendo básicamente en una extracción por contacto de inflorescencias (1 gr) con etanol (20 ml, 96% Purocol ®) seguido de filtrado con gasa estéril y papel de filtro hasta obtener un extracto alcohólico. Se llevó a cabo la medida del volumen de extracto etanólico obtenido y se procedió al agregado de un 50% de dicho volumen de agua mineral apta para consumo humano saturada con sal de mesa para favorecer la extracción por efecto Salting-out (Gross, 1933). Sobre esta fracción hidroalcohólica se realizó el agregado de 30 ml de aceite girasol (Natura®) y se procedió a agitar vigorosamente la mezcla por 5 minutos con buzo magnético. Luego, se colocó la mezcla heterogénea obtenida en una ampolla de decantación y se llevó a heladera para favorecer la separación de las fases. Al día siguiente, se separó la fase hidroalcohólica del aceite obtenido en primera instancia (aceite crudo). De cada una de estas fases se tomó una muestra para la posterior determinación de cannabinoides, terpenos y etanol remanente.

Teniendo en cuenta que el aceite crudo podría retener restos de alcohol, se procedió a lavar el aceite crudo 3 veces, agregando en cada lavado 30 ml de agua mineral en la ampolla de decantación, agitando vigorosamente, para luego separar nuevamente las fases.

El aceite lavado fue centrifugado por 5 minutos con el fin de separar el agua remanente. Una muestra de las aguas de los lavados y el aceite final (aceite lavado) fueron tomados para la determinación de cannabinoides, terpenos y etanol remanente (**Figura 10**). Posteriormente se guardó el aceite en dos frascos caramelo, cada uno almacenado en una condición de temperatura distinta (4°C y T amb) por varios meses.

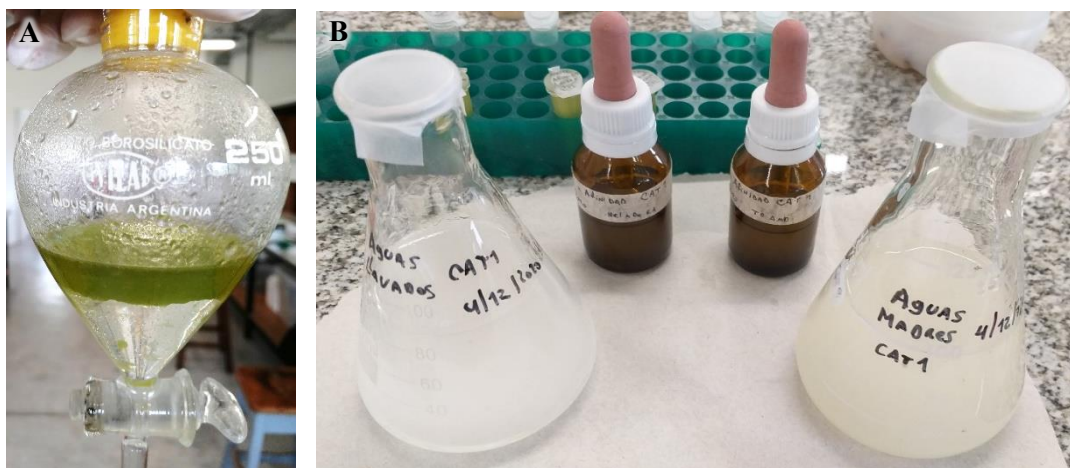


Figura 10. Obtención de aceite a partir de CAT1 por extracción por Afinidad. **A)** Ampolla de decantación con ambas fases inmiscibles entre sí, aceite crudo en la parte superior y aguas madres en la parte inferior. **B)** Aguas de los lavados, aguas madres y aceites en sus respectivos goteros al finalizar la extracción.

3. Procesamiento de muestras y determinaciones analíticas.

3.1. Procesamiento de muestras para determinación de cannabinoides y terpenos:

Cannabinoides:

Para la determinación de cannabinoides sobre las distintas muestras se llevó a cabo el siguiente procesamiento de muestras:

- En el caso de las muestras de aceites se realizó una extracción de los cannabinoides, utilizando 20 ml etanol (96% Purocol®) por gr de aceite. Luego se agitó la mezcla 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 para ser inyectado en el equipo luego de ser diluido adecuadamente.
- Para el caso del material vegetal el proceso de extracción consistió en un contacto con etanol 96° a razón de 20 ml/gr de inflorescencia, luego fue sonicado durante 10 minutos a 400 Watts de potencia y una frecuencia de 40 Khz (Testlab SRL®/TB10) y finalmente se centrifugó durante 10 minutos a 5.000 rpm. El sobrenadante se separó para la posterior inyección de una dilución apropiada.

- Sobre el material vegetal resultante de las extracciones se realizó una segunda extracción de igual forma que la descripta anteriormente.
- Sobre las muestras de los extractos alcohólicos, las aguas madres y aguas de lavado solo se realizó una dilución adecuada con etanol 96% previo a la inyección en el equipo.

Terpenos:

La preparación de las muestras previa a la inyección en el equipo consistió en la adición de nonano como patrón interno seguido de una dilución con isopropanol de 1/50 para los aceites, una dilución de 2,5 veces tanto para los extractos alcohólicos como las aguas madres y a las aguas de los lavados se les realizó una extracción previa con acetato de etilo. Las muestras para terpenos fueron preparadas, diluidas e inyectadas inmediatamente luego de su elaboración; caso contrario, se recurrió a almacenarlas sin cámara de aire a -20°C.

3.2. Determinación del perfil de cannabinoides por HPLC-UV/DAD

La determinación analítica de cannabinoides se llevó a cabo mediante HPLC con detección UV con arreglo de diodos. El equipo con el que contamos en el CIM consiste en un módulo de cromatografía líquida (Shimadzu, LC-20A), un desgaseador (DGU-20A5), 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.

La técnica analítica empleada fue la descrita por De Backer et al. (2009) con pequeñas modificaciones. Se utilizó una columna BDS Hypersil C18 (Macherey-Nagel®, 150x4.6); empleando un método en gradiente con las siguientes fases móviles: Fase A: solución acuosa de acetato de amonio 25 mM, y Fase B: metanol. La condición inicial fue de 75 % B que se aumentó linealmente hasta 95% B en 15 minutos, condición que se mantuvo durante 2 minutos. Luego se retorna a 75 % de B en 3 minutos para finalmente equilibrar en condiciones iniciales durante 5 minutos. El tiempo total de corrida fue de 25 minutos. El 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 cannabinoides se emplearon estándares analíticos de CBD, CBN y THC (Cerilliant Corporation®) y estándares secundarios de THC-A y CBD-A

purificados en nuestro laboratorio. Se emplearon curvas de calibración con 6 niveles de concentración 0.25, 0.5, 1, 5, 10 y 25 µg/ml.

En base a los resultados de las concentraciones de los cannabinoides obtenidos se establecieron relaciones y variables derivadas según los siguientes cálculos (Farmacopea Herbal Americana, 2014):

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

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

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

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

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

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

Dada la convertibilidad de THC-A, el total de la concentración de THC se calcula como la sumatoria de THC-A (multiplicada por un factor de corrección 0,877) más la concentración medida de THC. Se utiliza el mismo criterio y factor para el CBD según la Farmacopea Herbal Americana (2014).

3.3. Determinación del perfil de terpenos por GC/FID:

Para la determinación cuantitativa de terpenos y terpenoides mediante CG-FID se utiliza una columna convencional con fase estacionaria 5% fenilo, de dimensiones 28 m, 250 µm y 0,22 µm de espesor de película.

Se emplea el siguiente programa de temperatura del horno: temperatura inicial de 50°C, aumento cada 5°C/min hasta 240°C y luego cada 10°C/min hasta 270°C, temperatura a la que se mantiene 2 minutos para la completa elución de los componentes de la muestra, con un tiempo de análisis total de 43 minutos. Como gas portador se utiliza hidrógeno a 0,9 mL/min; siendo que las temperaturas del inyector y del detector son

260°C y 270°C, respectivamente. La inyección es de 1 µL de muestra o estándares, la cual se realiza con un pulso de presión en el modo sin división (splitless). La cuantificación empleada es mediante el método del estándar interno y para la identificación de los mismos se emplea un estándar analítico de los 17 principales terpenos y terpenoides de cannabis (Restek Co.®). Es posible determinar: α-Pineno, Canfeno, β-Pineno, β -Mirceno, δ-3-Careno, α -Terpineno, p-Cimeno, δ-Limoneno, Ocimeno, γ-Terpineno, Terpinoleno, Linalool, Isopulegol, β-Cariofileno, α-Humuleno, Guaiol y α-Bisabolol.

3.4. Determinación de etanol por microdifusión en Cámara de Conway.

Se empleó una cámara de Conway que cuenta con dos compartimientos (externo e interno) que sólo comparten la atmósfera una vez cerrada. Este método permite determinar y cuantificar sustancias volátiles, tales como el etanol, presentes en una muestra mediante el desplazamiento del analito volátil de la muestra original empleando un agente liberador, ambos contenidos en el compartimiento externo; hacia la atmósfera compartida y la reacción final del analito con el agente atrapante contenido en el compartimiento interno para generar un compuesto coloreado que se determina espectrofotométricamente. En el caso del método que permite determinar etanol el agente liberador es una solución saturada de K₂CO₃ y el agente atrapante es una solución de K₂Cr₂O₇ en medio ácido. La reacción que se produce es la reducción del dicromato a Cr⁺³ mientras que el etanol se oxida al correspondiente ácido carboxílico. Una vez completada la reacción se tomó la solución contenida en el compartimiento interno y se realizó la determinación de absorbancia a 620nm empleando un espectrofotómetro UV-visible (Tecan Infinite). Para la cuantificación se empleó soluciones patrones de etanol entre 0 y 2,5 g/L.

4. Análisis de resultados.

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

Resultados y Discusión



Capítulo 1

*Estudio de aceites de cannabis obtenidos por
dos métodos tradicionales:*

Extracción alcohólica y Macerado en aceite.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización de los aceites producidos en base a los métodos de extracción clásicamente utilizados por las asociaciones y usuarios terapéuticos al realizar sus preparados artesanales. En este sentido, los métodos estudiados fueron:

- ✦ Extracción alcohólica
- ✦ Macerados en Aceite a temperatura ambiente y a baño de María

1. Método de obtención de aceites mediante Extracción alcohólica:

A partir de las inflorescencias picadas y homogeneizadas de la variedad de *Cannabis sativa* CAT1 se realizó la extracción alcohólica, según se detalló en la **Sección 2.1** del capítulo de **Materiales y Métodos**, obteniendo el extracto alcohólico empleado como insumo inicial para la posterior obtención de aceite.

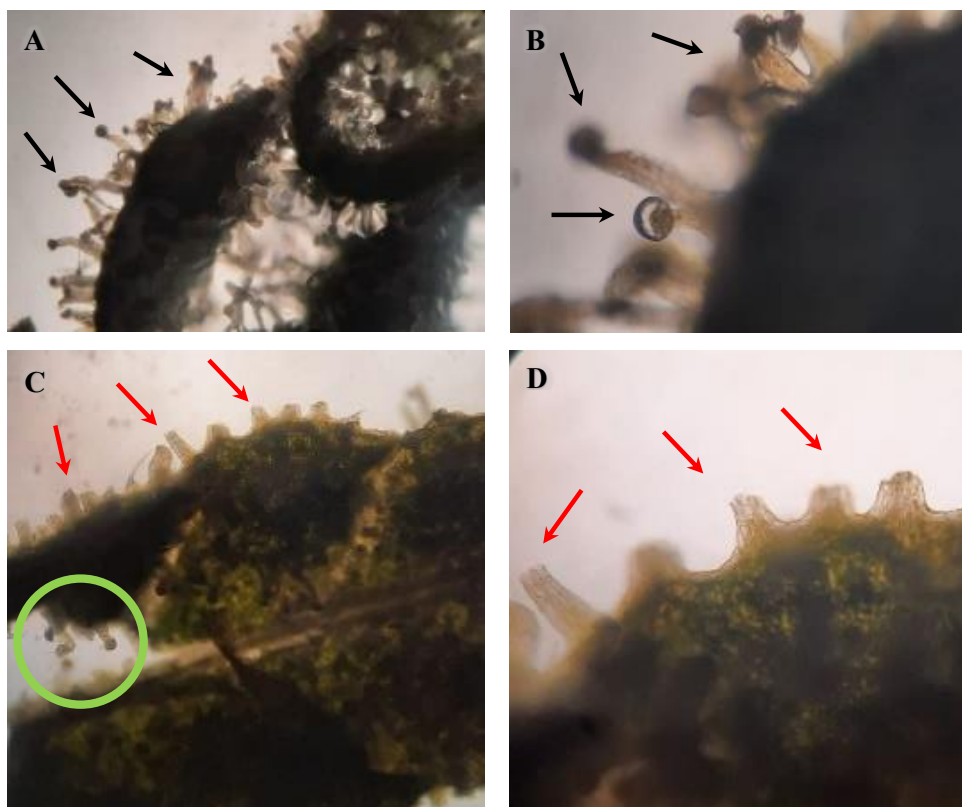


Figura 1.1. Micrografías representativas de material vegetal, visto al microscopio óptico, en fresco (**A:** 40X, **B:** 100X) donde se observan tricomas intactos (flechas negras) y post-extracción alcohólica (**C:** 40X, **D:** 100X) donde la mayoría de los tricomas presentan alteraciones de estructura (flecha roja) manteniendo algunos de ellos la cabeza al encontrarse en superficies menos expuestas (círculo verde).

1.1 Descripción de inflorescencias durante el proceso de extracción.

Las flores de la variedad CAT1 fueron observadas al microscopio óptico. Previo al contacto con etanol, se apreció en las flores (**Figura 1.1 A y B**) una gran cantidad de tricomas erguidos y completamente enteros, con sus cuellos y cabezas intactas, donde se almacenan los cannabinoides sintetizados por la planta. Sin embargo, post extracción (**Figura 1.1 C y D**) fue visible la alteración en estas estructuras representada por la pérdida de la gran mayoría de las cabezas de los tricomas. En el papel de filtro empleado en el proceso de filtración del extracto alcohólico quedó retenido un residuo de aspecto pulverulento (**Figura 2.1 A**), que al ser observado al microscopio óptico mostró estar constituido por los restos de cabezas y cuellos de tricomas (**Figura 2.1 B y C**). Es interesante notar que, si bien la mayoría de los tricomas aparecen rotos, también se observaron algunos otros en las superficies menos expuestas que conservaron su cabeza (**Figura 1.1 C**).

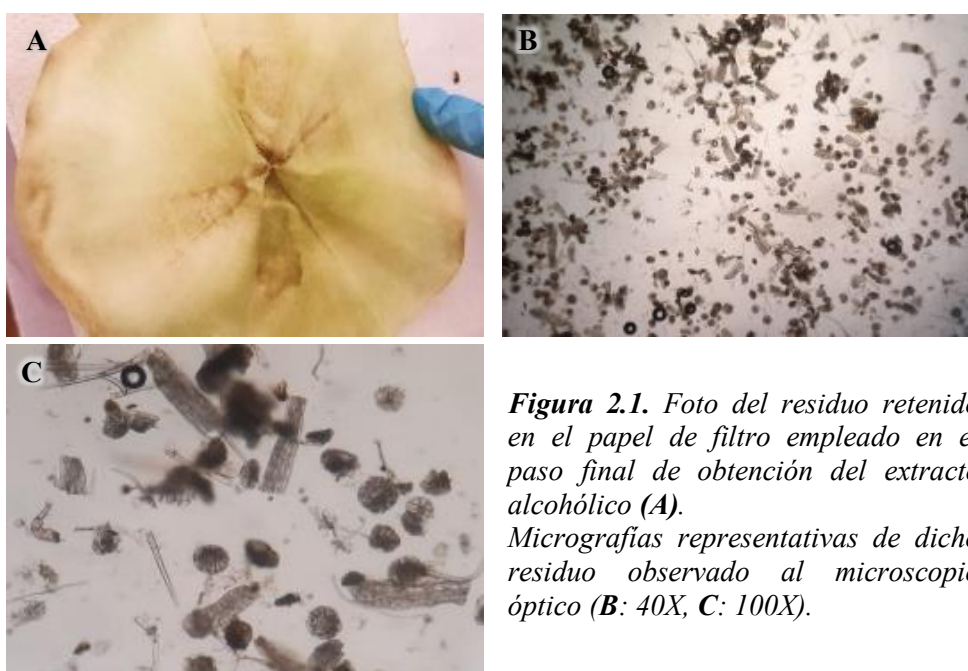


Figura 2.1. Foto del residuo retenido en el papel de filtro empleado en el paso final de obtención del extracto alcohólico (A). Micrografías representativas de dicho residuo observado al microscopio óptico (B: 40X, C: 100X).

1.2. Caracterización química del extracto alcohólico de partida.

🌿 Determinación del Perfil de Cannabinoides.

Se procedió a analizar mediante HPLC-UV/DAD los cannabinoides presentes en el extracto alcohólico obtenido. En la **Figura 3.1 C** se presenta un cromatograma

representativo de un estándar que consta de 5 cannabinoides: CBD-A, CBD, THC-A, THC y CBN.

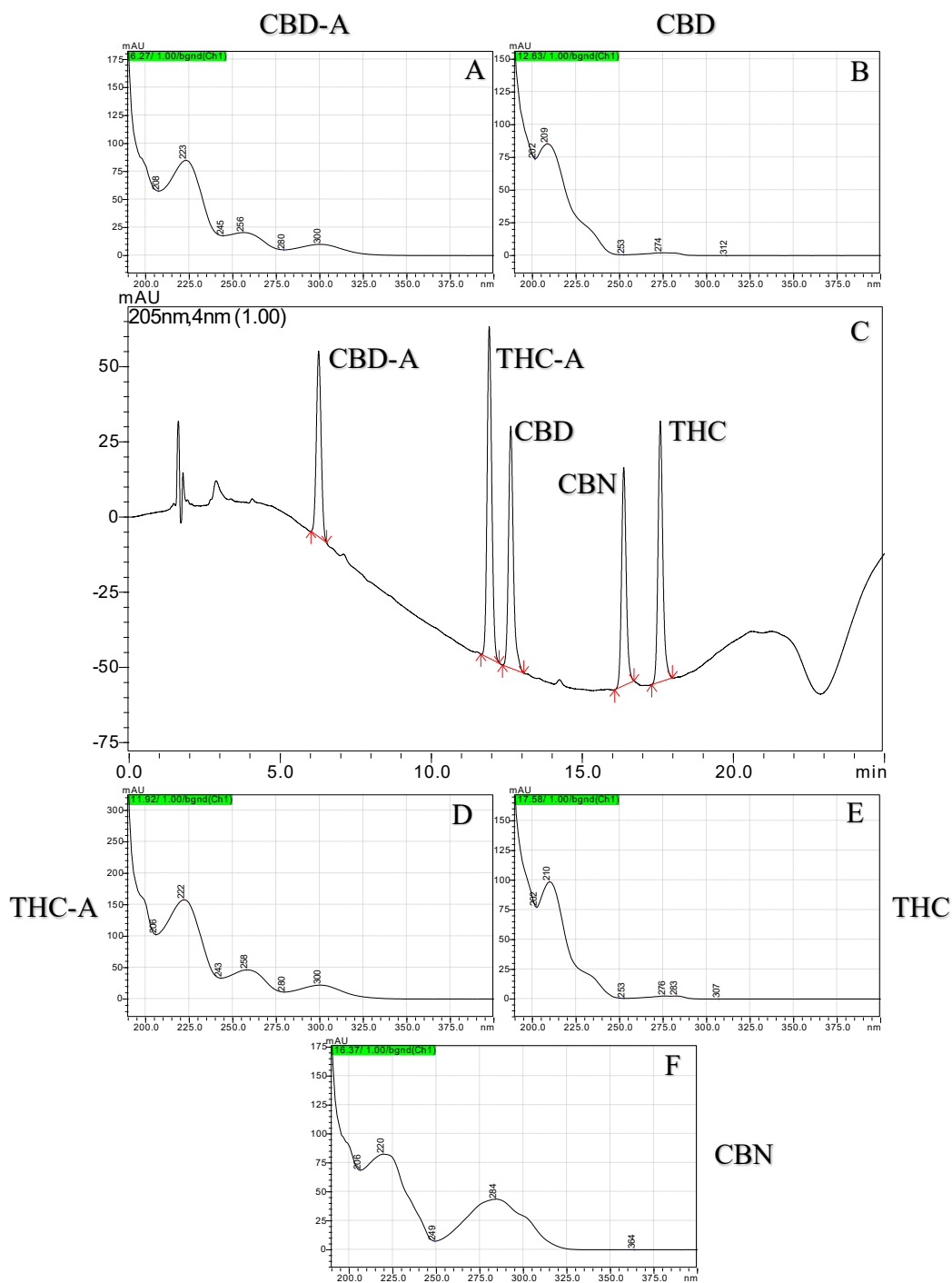


Figura 2.1. Cromatograma representativo del estándar de 5 cannabinoides CBD-A, THC-A, CBD, CBN y THC, obtenido mediante HPLC-UV/DAD, $\lambda=205\text{nm}$ (C). Espectros de absorción UV de los cannabinoides detectados: CBD-A (A), CBD (B), THC-A (D), THC (E) y CBN (F).

En dicho cromatograma se aprecia que el orden de elución en el método analítico empleado y los tiempos de retención (t_r) para cada uno de los cannabinoides son los siguientes: 6,27 min para el CBD-A, 11,92 min para el THC-A, 12,63 min en el caso del CBD, 16,37 min para el CBN y finalmente 17,58 min para el THC. La detección mediante detector UV con arreglo de Diodos (UV-DAD) permite la obtención de los espectros de absorción en el UV de cada compuesto, presentando máximos de absorción característicos de cada compuesto vinculados fundamentalmente a su estructura química (**Figura 3.1 A B, D, E y F**). Así, los cannabinoides ácidos CBD-A y THC-A (**Figura 3.1 A y D**) presentan espectros UV similares, cuyo máximo se encuentra en longitudes de onda (λ) de 223nm y 222nm respectivamente, seguidos de otros dos máximos locales de menor intensidad que se dan a valores de λ 256 nm y 300 nm para CBD-A y en valores de λ 258 nm y 300 nm en el caso de THC-A. Lo mismo ocurre con los cannabinoides neutros, CBD y THC (**Figura 3.1 B y E**), quienes presentan máximos absolutos en λ 209 nm y 210 nm; mientras que en el caso del cannabinoide CBN (**Figura 3.1 F**) su espectro UV presenta dos máximos, de intensidades similares entre sí, uno a λ 220 nm y otro a λ 284nm.

Cannabinoide	Concentración (mg/ml)		
	Extracto alcohólico	2da Extracción	Polvo retenido en filtro
CBD-A	2,13 ± 0,24	0,16 ± 0,03	0,02 ± 0,01
THC-A	1,51 ± 0,20	0,12 ± 0,02	0,01 ± 0,01
CBD	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	ND
THC	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,01	ND
CT	3,75 ± 0,42	0,30 ± 0,05	0,03 ± 0,01

Tabla 1.1. Concentración (mg/ml) de CBD-A, THC-A, CBD, THC y Cannabinoides Totales (CT) presentes en el extracto alcohólico obtenido a partir de un contacto de inflorescencias de CAT1 con etanol; en un extracto proveniente de un segundo contacto con etanol del material vegetal ya extraído (2da extracción) y en un extracto obtenido del contacto con etanol del material de características pulverulentas retenido en el papel de filtro luego de la filtración del extracto alcohólico. (Media ± SD) (N = 3)

En este sentido, en los análisis que se realizan de las diversas muestras obtenidas, se emplean como criterios para establecer la identidad de los cannabinoides el tiempo de

retención (t_r) en conjunto con el espectro de absorción UV, contrastándolos con el estándar analítico.

En el cromatograma del extracto alcohólico (**Figura 4.1**) observamos que la mayor cantidad de cannabinoides corresponde a los compuestos ácidos, CBD-A ($t_r=6,38$ min.) y THC-A ($t_r=12,04$ min.), siendo estos los dos picos más altos de la figura, los cuales corresponden a una concentración de $2,13 \pm 0,24$ mg/ml para CBD-A y $1,51 \pm 0,20$ mg/ml para THC-A (**Tabla 1.1**). Por otro lado, podemos apreciar dos picos más pequeños que corresponden al CBD ($t_r=12,69$ min.) y THC ($t_r=17,65$ min.), registrando concentraciones de $0,04 \pm 0,01$ mg/ml y $0,07 \pm 0,01$ mg/ml respectivamente. Así mismo no se observó la presencia de CBN en el extracto alcohólico, lo cual da cuenta del uso de inflorescencias con poco tiempo de almacenamiento, una adecuada conservación (freezer -20°C) y una elaboración sin uso de altas temperaturas u otros agentes oxidantes. De esta forma la concentración de cannabinoides totales obtenidos luego de una primera extracción alcohólica de las inflorescencias de CAT1 fue de $3,75 \pm 0,42$ mg/ml (**Tabla 1.1**).

Estos resultados indican que el extracto alcohólico de trabajo está caracterizado por una relación entre los cannabinoides mayoritarios CBD-A/THC-A de 1,4:1 ($SD \pm 0,1$). Asimismo, la relación CBDtotal/THCtotal tradicionalmente empleada para caracterizar derivados de cannabis, registró un valor de 1,4: 1 ($SD \pm 0,1$) que no resultó significativamente diferente de la relación expresada anteriormente; lo cual indica que los cannabinoides ácidos CBD-A y THC-A, al ser los predominantes, son los que más influyen en la relación CBDtotal/THCtotal. Sin embargo, cuando observamos la relación de cada cannabinoide ácido con su cannabinoide neutro respectivo obtenemos relaciones diferentes entre sí. En este sentido, los valores estudiados indican que el extracto alcohólico fue 64 veces más rico en CBD-A frente al CBD; mientras que se presentó una relación 16:1 para THC-A/THC. Estas diferentes relaciones aportan a la relación neta de cannabinoides Ácidos/Neutros, siendo de 36:1, información que completa la caracterización del perfil de cannabinoides del extracto de partida.

Con el fin de determinar el contenido remanente de cannabinoides en el material vegetal extraído, se realizó una segunda extracción con un volumen de etanol fresco, respetando la misma relación etanol/material vegetal utilizada durante el primer contacto. La determinación de cannabinoides en esta segunda extracción indicó un valor de

cannabinoides totales de $0,30 \pm 0,05$ mg/ml representado mayormente por CBD-A y THC-A, con contenidos menores de CBD y THC (*Tabla 1.1*). Del mismo modo se realizó una extracción alcohólica del material retenido en el papel de filtro (*Figura 2.1 A*) y se determinó el contenido de cannabinoides por HPLC/UV-DAD.

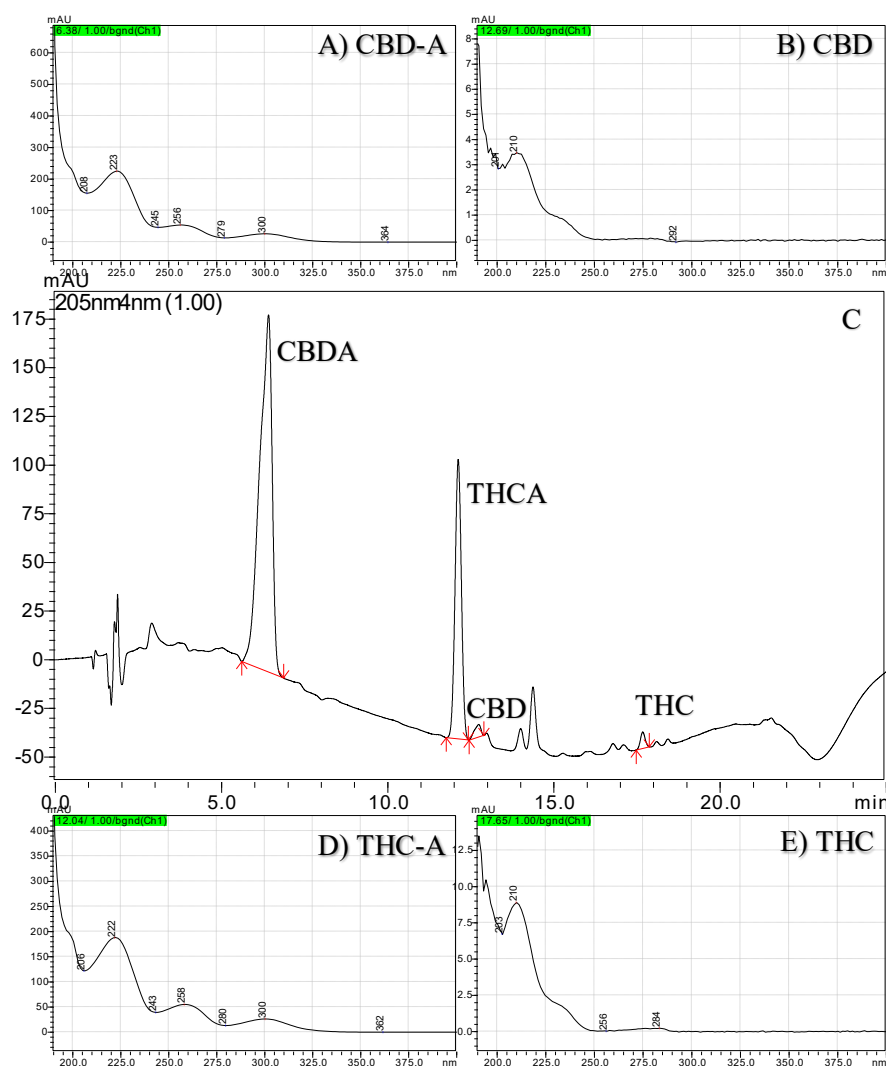


Figura 4.1. Cromatograma representativo del extracto alcohólico obtenido de las inflorescencias de CAT1 (C), conteniendo cuatro cannabinoides detectados mediante HPLC-UV/DAD: CBD-A, CBD, THC-A y THC; caracterizados por sus espectros de absorción UV (A, B, D y E, respectivamente).

Al igual que en el caso anterior los niveles de cannabinoides encontrados fueron bajos, registrándose una concentración de cannabinoides totales de $0,03 \pm 0,01$ mg/ml atribuibles en este caso a las formas ácidas (CBD-A y THC-A), mientras que las formas neutras de los cannabinoides (CBD y THC) no fueron detectables (*Tabla 1.1*).

Estos resultados indican que la extracción resulta eficiente ya que en el primer contacto alcohólico se obtienen el 92% de los cannabinoides extraíbles; encontrándose un 8%

comprendido entre la segunda extracción alcohólica y la extracción del material particulado retenido en el filtro.

🌿 Determinación del Perfil de Terpenos:

Para obtener el perfil de terpenos del extracto alcohólico de CAT1 empleado en el estudio se procedió al análisis del mismo, mediante CG-FID.

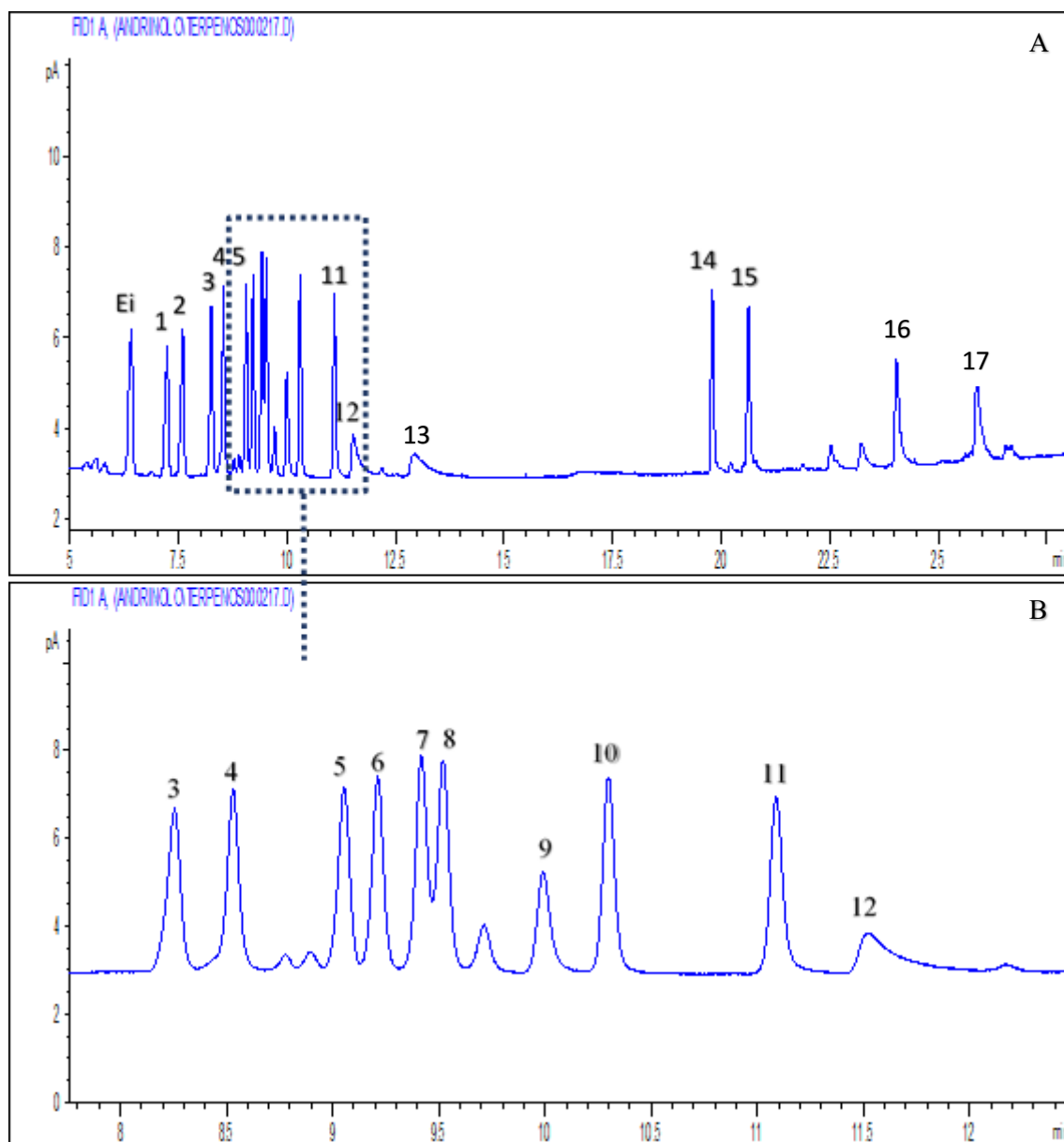


Figura 5.1. (A) Cromatograma representativo correspondiente al estándar de 18 terpenos obtenido por CG-FID: 1. α -Pinenol (*), 2. Canfeno (*), 3. β -Pinenol (*), 4. β -Mirceno (*), 5. δ -3-Careno (*), 6. α -Terpineno (*), 7. p-Cimeno (*), 8. δ -Limoneno (*), 9. Ocimeno (*), 10. γ -Terpineno (*), 11. Terpinoleno (*), 12. Linalool (*), 13. Isopulegol (*), 14. β -Cariofileno (s), 15. α -Humuleno (s), 16. Guaiol (s), 17. α -Bisabolol (s). Ei: Estándar interno (nonano), (*) Monoterpenos, (s) Sesquiterpenos. (B) Ampliación de la vista del cromatograma del estándar de terpenos, en la región de tiempos de retención entre 8 y 12 min.

En la **Figura 5.1** puede observarse el cromatograma correspondiente al estándar de concentración 10 PPM de 17 terpenos (Restek Co[®]) que poseemos en el laboratorio, constituido por 13 monoterpenos y 5 sesquiterpenos. Para la determinación analítica hemos empleado como estándar interno (Ei) el alcano nonano. En este caso el orden de elución de los terpenos y los tiempos de retención respectivos se indican a continuación: el primer compuesto en salir corresponde al estándar interno (nonano) a los 6,55 min, seguido de los monoterpenos α -Pineno (tr=7,24 min), Canfeno (tr=7,60 min), β -Pineno (tr=8,26 min), β -Mirceno (tr=8,53 min), δ -3-Careno (tr=9,05 min), α -Terpineno (tr=9,21 min), p-Cimeno (tr=9,42 min), δ -Limoneno (tr=9,52 min), Ocimeno (tr=9,99 min), γ -Terpineno (tr=10,30 min), Terpinoleno (tr=11,09 min), Linalool (tr=11,52 min) e Isopulegol (tr=12,73 min). Luego, cerca del final de la corrida se detectan los sesquiterpenos: β -Cariofileno (tr=19,80 min), α -Humuleno (tr=20,63 min), Guaiol (tr=24,04 min) y finalmente el α -Bisabolol a los 25,89 minutos.

Del mismo modo fue analizado el extracto alcohólico inicial empleado en los ensayos, el cual presentó un perfil compuesto por 8 terpenos (5 monoterpenos y 3 sesquiterpenos) (**Figura 6.1**).

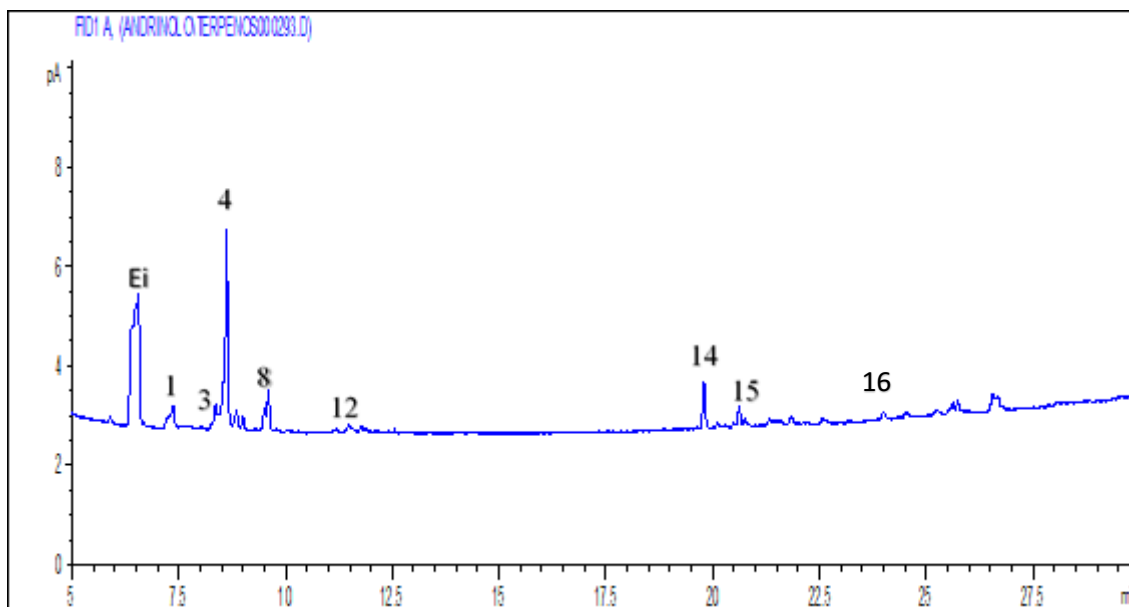


Figura 6.1. Cromatograma representativo correspondiente al perfil de terpenos del extracto alcohólico, determinado por GC/FID, compuesto por los siguientes terpenos: 1) α -Pineno 3) β -Pineno 4) β -Mirceno 8) δ -Limoneno 12) Linalool 14) β -Cariofileno 15) α -Humuleno 16) Guaiol. Ei: Estándar Interno (Nonano).

Los monoterpenos observados en el cromatograma fueron los siguientes: α -Pinoeno ($tr=7,37$ min), β -Pinoeno ($tr=8,36$ min), β -Mirceno ($tr=8,62$ min), δ -Limoneno ($tr=9,60$ min) y Linalol ($tr=11,77$ min); mientras que correspondientes al grupo de los sesquiterpenos encontramos β -Cariofileno ($tr=19,80$ min), α -Humuleno ($tr=20,62$ min) y el Guaiol ($tr=24,01$ min). Una vez identificados los terpenos se procedió a calcular la concentración de los mismos empleando las curvas de calibración obtenidas para cada terpeno en particular. En el extracto alcohólico los terpenos más abundantes encontrados fueron el β -Mirceno con $630,19 \pm 118,13$ PPM, seguido por el β -Cariofileno con $158,42 \pm 12,24$ PPM, constituyendo entre los dos una abundancia relativa del 60%. El resto de los terpenos presentaron abundancias relativas entre el 8 y 5%, con las siguientes concentraciones: $105,50 \pm 32,47$ PPM para el α -Pinoeno, $62,44 \pm 14,28$ PPM para el β -Pinoeno, $90,87 \pm 9,91$ PPM en el caso del δ -Limoneno, $99,63 \pm 5,35$ PPM para el Linalool, $80,64 \pm 11,74$ PPM para el α -Humuleno y finalmente el $75,47 \pm 4,67$ PPM en el caso del Guaiol (**Tabla 2.1**).

Terpeno	Concentración (PPM)	Abundancia Relativa %
α -Pinoeno	$105,50 \pm 32,47$	8%
β -Pinoeno	$62,44 \pm 14,28$	5%
β -Mirceno	$630,19 \pm 118,13$	48%
δ -Limoneno	$90,87 \pm 9,91$	7%
Linalool	$99,63 \pm 5,35$	8%
β -Cariofileno	$158,42 \pm 12,24$	12%
α -Humuleno	$80,64 \pm 11,74$	6%
Guaiol	$75,47 \pm 4,67$	6%

Tabla 2.1. Concentración (PPM) y abundancias relativas (%) de los terpenos integrantes del perfil del extracto alcohólico de CAT1, detectados por CG-FID. (Media \pm SD) (N = 3)

1.3. Caracterización química del aceite resultante de la extracción alcohólica.

Tomando como material de partida el extracto alcohólico caracterizado químicamente en cuanto al perfil de cannabinoides y terpenos en las secciones precedentes, se procedió a la obtención de aceite. Para ello se ha usado uno de los métodos empleados habitualmente por la población, que incluye la evaporación del solvente (etanol) a baja

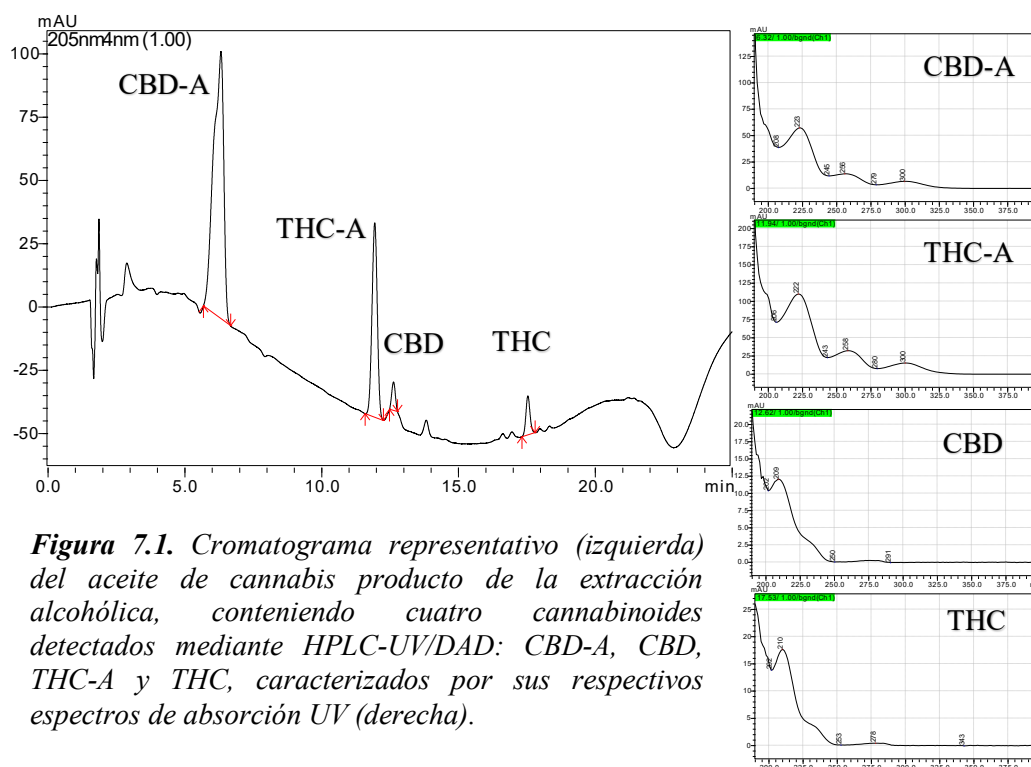


Figura 7.1. Cromatograma representativo (izquierda) del aceite de cannabis producto de la extracción alcohólica, conteniendo cuatro cannabinoides detectados mediante HPLC-UV/DAD: CBD-A, CBD, THC-A y THC, caracterizados por sus respectivos espectros de absorción UV (derecha).

temperatura (45°C) para obtener un material concentrado de características viscosas y semi-sólido que denominan “resina” y la posterior redisolución de dicha resina en aceite vegetal. De esta manera se obtuvo lo que coloquialmente se conoce como aceite de cannabis; el cual se procedió a caracterizar en contenido de cannabinoides y terpenos.

🌿 Perfil de Cannabinoides:

Los aceites a base de cannabis obtenidos mediante esta técnica, y analizados mediante HPLC-UV/DAD, presentaron un perfil de cannabinoides integrado por los cuatro cannabinoides contenidos en el extracto alcohólico. Los dos compuestos mayoritarios observados en el cromatograma corresponden a los cannabinoides ácidos CBD-A y THC-A (**Figura 7.1**). Dichos cannabinoides ácidos presentaron concentraciones de

4,94 ± 0,03 mg/ml para el CBD-A y 3,13 ± 0,19 mg/ml para el THC-A. En lo que respecta a los cannabinoides neutros, encontramos 0,32 ± 0,08 mg/ml para el CBD y 0,46 ± 0,09 mg/ml para el THC; siendo la concentración de cannabinoides totales de 8,85 ± 0,39 mg/ml (**Figura 8.1**). Estos resultados indican que la concentración de los cannabinoides ácidos CBD-A y THC-A en el aceite obtenido en estas condiciones se ha incrementado 2,5 veces respecto al extracto alcohólico inicial; mientras que en el caso de los cannabinoides neutros, CBD y THC el incremento de concentración ha sido de 7 y 8 veces respectivamente. Así mismo, la concentración de cannabinoides totales en el aceite fue 2,5 veces mayor respecto de la registrada en el extracto alcohólico de partida. El aumento de concentración de cannabinoides totales en el aceite se correlaciona con el observado para CBD-A y THC-A, dado que los cannabinoides ácidos son las formas mayoritarias presentes en el aceite, al igual que ocurría en el extracto alcohólico de CAT1 empleado para la preparación del mismo. Sin embargo, el incremento en la concentración de cannabinoides neutros implica que aun cuando la evaporación del etanol fue llevada a cabo a baja temperatura (45°C), la misma fue suficiente para que ocurran transformaciones de los cannabinoides ácidos en neutros.

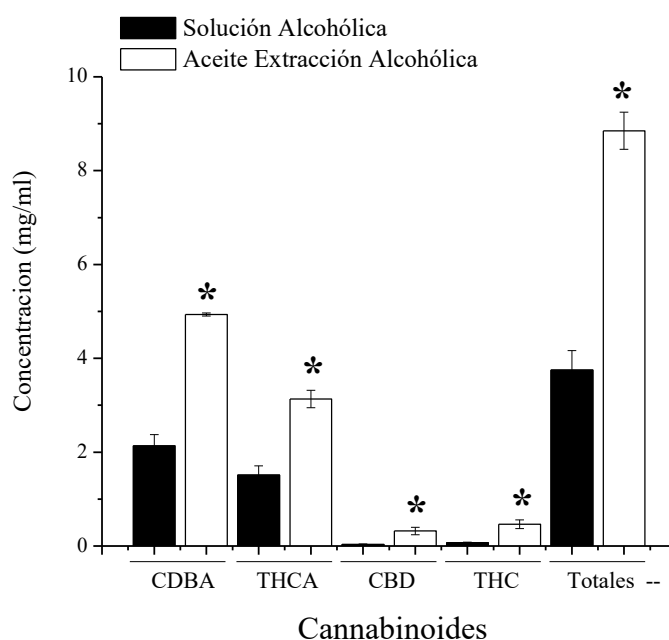


Figura 8.1. Concentración (mg/ml) de cannabinoides ácidos (CBD-A y THC-A), neutros (CBD y THC) y totales en la solución alcohólica de partida (barras negras) y en el aceite (barras blancas) obtenido a partir de la extracción alcohólica (Media ± SD, N=3). Los * indican diferencias significativas.

Teniendo en cuenta los mg de cannabinoides contenidos en el extracto alcohólico y en el aceite obtenido finalmente (**Tabla 3.1.**) hemos determinado que en este preparado se ha conseguido recuperar el 92% de los cannabinoides totales presentes en el extracto inicial, indicando así una muy buena eficiencia en este método de elaboración de aceite de cannabis. Así mismo, vemos que el contenido neto de cannabinoides ácidos presenta una disminución en el aceite respecto del extracto alcohólico; mientras que los cannabinoides neutros muestran un incremento (**Tabla 3.1.**).

Muestra	mg totales				
	CBDA	THCA	CBD	THC	Cannabinoides totales
Solución Alcohólica	160,71 ± 7,49	113,90 ± 5,31	2,65 ± 0,12	5,14 ± 0,24	248,63 ± 11,59
Aceite	144,12 ± 0,98*	91,48 ± 5,49*	9,33 ± 2,34*	13,50 ± 2,70*	229,45 ± 10,71

Tabla 3.1. Tabla comparativa de los mg totales para CBD-A, THC-A, CBD, THC y cannabinoides totales para la solución alcohólica y el aceite obtenido. Los * indican diferencias significativas.

Esto concuerda con lo establecido previamente en cuanto a la existencia posibles descarboxilaciones o modificaciones en las moléculas de los cannabinoides ácidos que deriven en cannabinoides neutros.

En lo que respecta a las relaciones entre los cannabinoides (**Tabla 4.1**) no se observan diferencias significativas tanto para las relaciones CBDA/THCA, como CBD total/THC total. Esto se debe a que los cannabinoides ácidos siguen representando el porcentaje mayoritario en el aceite. Sin embargo, se aprecian variaciones significativas en las relaciones donde la proporción de los cannabinoides neutros toma relevancia tras haber aumentado. Tal es el caso de la disminución encontrada en la relación Ácidos/Neutros (**Tabla 4.1**).

	CBD-A/THC-A	CBD total/ THC total	Ácidos/ Neutros
Solución Alcohólica	1,4: 1(SD: 0,1)	1,4: 1(SD: 0,1)	36: 1(SD: 8)
Aceite	1,6: 1(SD: 0,1)	1,5: 1(SD: 0,1)	11: 1(SD: 2)*

Tabla 4.1. Relaciones entre CBD-A/THC-A, CBD total/ THC total y entre cannabinoides Ácidos/Neutros en el extracto alcohólico obtenido de inflorescencias de CAT1 y en los aceites obtenidos a partir de dicho extracto. Los * indican diferencias significativas.

🌿 Perfil de Terpenos:

En la **Figura 9.1** se presenta el perfil de terpenos obtenido para el aceite de cannabis producido mediante extracción alcohólica. En el mismo encontramos la presencia de 5 terpenos. Del grupo de los monoterpenos encontramos en este aceite al Linalool con una concentración de $88,33 \pm 12,54$ PPM y al β -Mirceno siendo detectable no cuantificable.

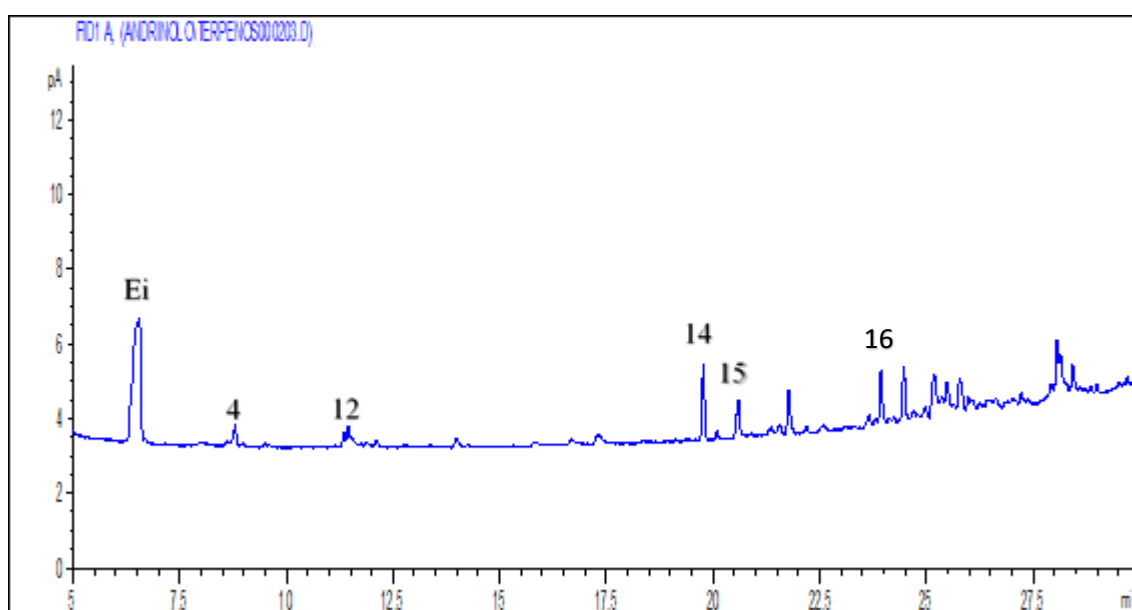


Figura 9.1. Cromatograma representativo del perfil de terpenos del aceite de cannabis obtenido por el método de extracción alcohólica, determinado por CG-FID. Ei: Estándar interno (Nonano), 4: β -Mirceno, 12: Linalool, 14: β -Cariofileno, 15: α -Humuleno, 16: Guaiol (se mantiene la numeración asignada a los terpenos contenidos en el estándar analítico empleado)

Los tres terpenos restantes detectados corresponden al conjunto de sesquiterpenos, cuyas concentraciones fueron las siguientes: $100,88 \pm 10,49$ PPM para β -Cariofileno, $73,22 \pm 10,73$ PPM para α -Humuleno y $129,63 \pm 34,31$ PPM para el Guaiol. Estos resultados indicaron un porcentaje de recuperación del 12% de los terpenos totales respecto del contenido de los mismos en el extracto alcohólico de partida. El aceite de cannabis obtenido por esta técnica presenta un perfil de terpenos diferente del existente en el extracto alcohólico de CAT1 (**Figura 6.1**); ya que los terpenos mayoritarios en el aceite son el Guaiol, el β -Cariofileno y el Linalool, representando en conjunto el 81% de

los terpenos contenidos en el aceite; a diferencia de lo que ocurría en el extracto alcohólico donde los terpenos mayoritarios eran el β -Mirceno y el β -Cariofileno (60% del contenido de terpenos). De esta forma el perfil de terpenos del aceite presenta variaciones en cuanto a la presencia, concentración y relación o aporte relativo de los mismos al perfil. La mayor parte de los monoterpenos se pierden en el proceso de evaporación quedando solo el β -Mirceno y el Linalool como representantes de ese grupo (*Figura 9.1 y 10.1*).

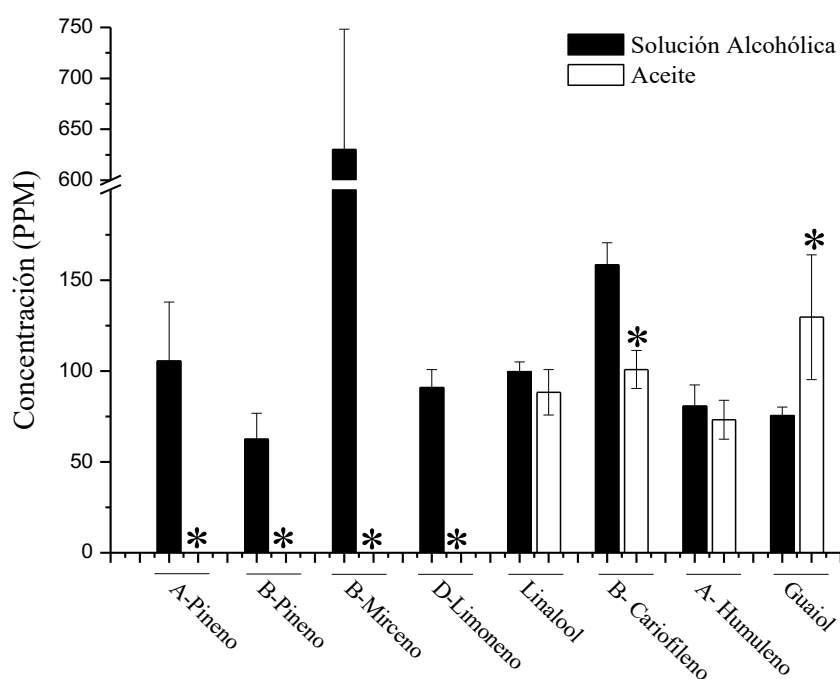


Figura 10.1. Concentración de terpenos presentes en la solución alcohólica de partida (barras negras) y en el aceite de cannabis (barras blancas) obtenido a partir de la extracción alcohólica (Media \pm SD, N=3). Los * indican diferencias significativas.

🌿 Etanol Residual

Dado que la solución de partida para la obtención del aceite de cannabis por éste método es un extracto etanólico de CAT1, se realizó el análisis del contenido de etanol que pudiera quedar de forma residual en los aceites luego de la evaporación del mismo; mediante la técnica de Microdifusión en cámara de Conway (*Figura 11.1*).

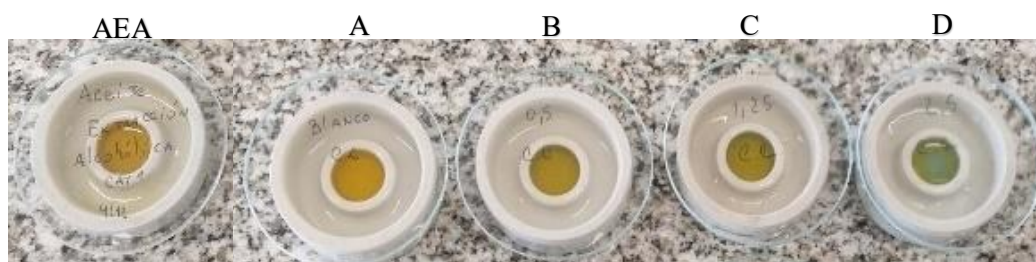


Figura 11.1. Determinación de etanol mediante microdifusión en cámara de Conway. AEA: Aceite de cannabis obtenido a partir del extracto alcohólico de CAT1, Curva de Calibración realizada con etanol de las siguientes concentraciones: Blanco (A), 0,5 gr/l (B), 1,25 gr/l (C) y 2,5 gr/l (D).

Para el cálculo de la concentración etanólica se obtuvo inicialmente la curva de calibración empleando cuatro puntos de concentraciones conocidas de etanol en la misma matriz (*Ecuación 1*).

$$\text{Abs}^{620\text{nm}} = 0,003 + 0,110 [\text{EtOH}] \text{ (g/L)} \quad \text{Ecuación 1.}$$
$$r^2 = 0,9991$$

El valor de concentración determinado para el aceite obtenido por este método, fue de $0,39 \pm 0,59$ gr EtOH_{eq}/L de aceite. Este valor representa una graduación alcohólica de 0,05° o 0,05% v/v.

2. Método de obtención de aceites mediante Macerado de inflorescencias en aceite comestible

El paso inicial para la elaboración de los macerados, al igual que en el caso del extracto alcohólico, correspondió al picado de manera manual de las inflorescencias de CAT1. En este método en lugar de usar alcohol, el agente extractante utilizado fue el aceite de girasol en un volumen suficiente para que todas las flores se encuentren cubiertas. Se estudió la elaboración de los macerados a temperatura ambiente y con calentamiento por diferentes intervalos de tiempo.

2.1. Descripción de inflorescencias durante los procesos de macerado:

Las inflorescencias de CAT1 fueron analizadas al microscopio óptico antes y después de realizar los macerados descritos en la Sección 2.2 y 2.3 de *Materiales y Métodos*.

El material vegetal de partida mostró tricomas erguidos, con cuellos y cabezas intactos (*Figura 12.1 A*). En el caso de los macerados, donde el extractante empleado fue aceite, se visualizó una cierta cantidad de tricomas que conservan sus cabezas, tanto para los macerados a T ambiente (*Figuras 12.1 E a H*) como con calentamiento (*Figuras 12.1 B a D*). De manera general, en los macerados se nota una mayor tendencia a encontrar tricomas sin romper en las superficies menos expuestas, en comparación con la extracción alcohólica.

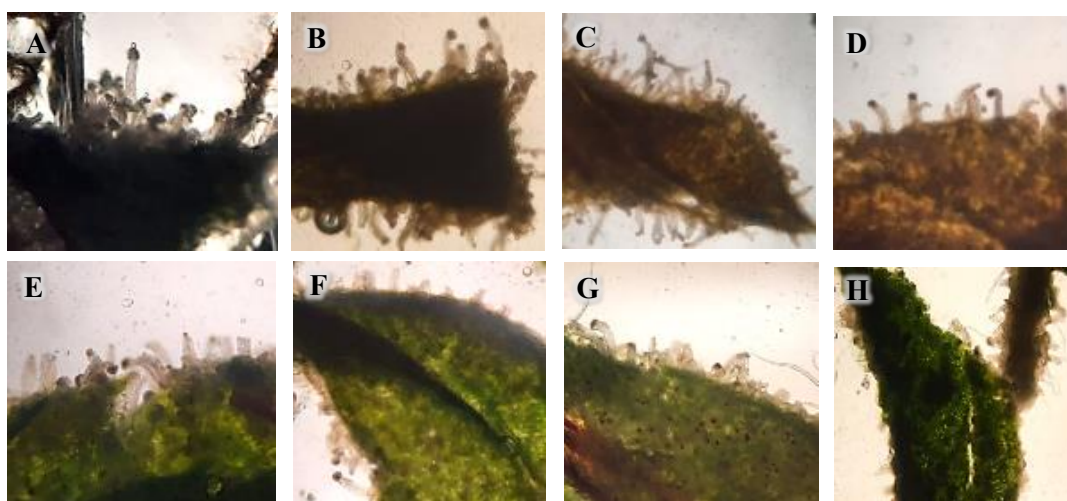


Figura 12.1. Micrografías representativas de las inflorescencias de CAT1 vistas al microscopio óptico (40X) previo al macerado (*A*), post macerado con calentamiento durante distintos tiempos: 1 hora (*B*), 2 horas (*C*), 3 horas (*D*); y post macerado a temperatura ambiente durante distintos tiempos: 1 día (*E*), 5 días (*F*), 15 días (*G*) y 30 días (*H*).

Así mismo se observó un color pardo en las inflorescencias luego del macerado realizado a baño de María (*Figura 13.1 A*), que no fue apreciable en el caso del macerado a temperatura ambiente (*Figura 13.1 B*).



Figura 13.1. Inflorescencias de CAT1 post-macerado a baño de María (*A*) y a temperatura ambiente (*B*)

2.2. Caracterización química del aceite resultante de los procesos de macerado.

🌿 Determinación del Perfil de Cannabinoides:

Todos los aceites obtenidos fueron procesados y cuantificados mediante HPLC-UV/DAD. En el caso de los macerados a temperatura ambiente (**Figura 14.1 D, E y F**) se observa la presencia de los cannabinoides ácidos, siendo éstos los mayoritarios, y a medida que avanza el tiempo de macerado los cannabinoides neutros aumentan su presencia siendo en un primer momento detectables no cuantificables para luego presentarse en cantidades minoritarias respecto los cannabinoides ácidos.

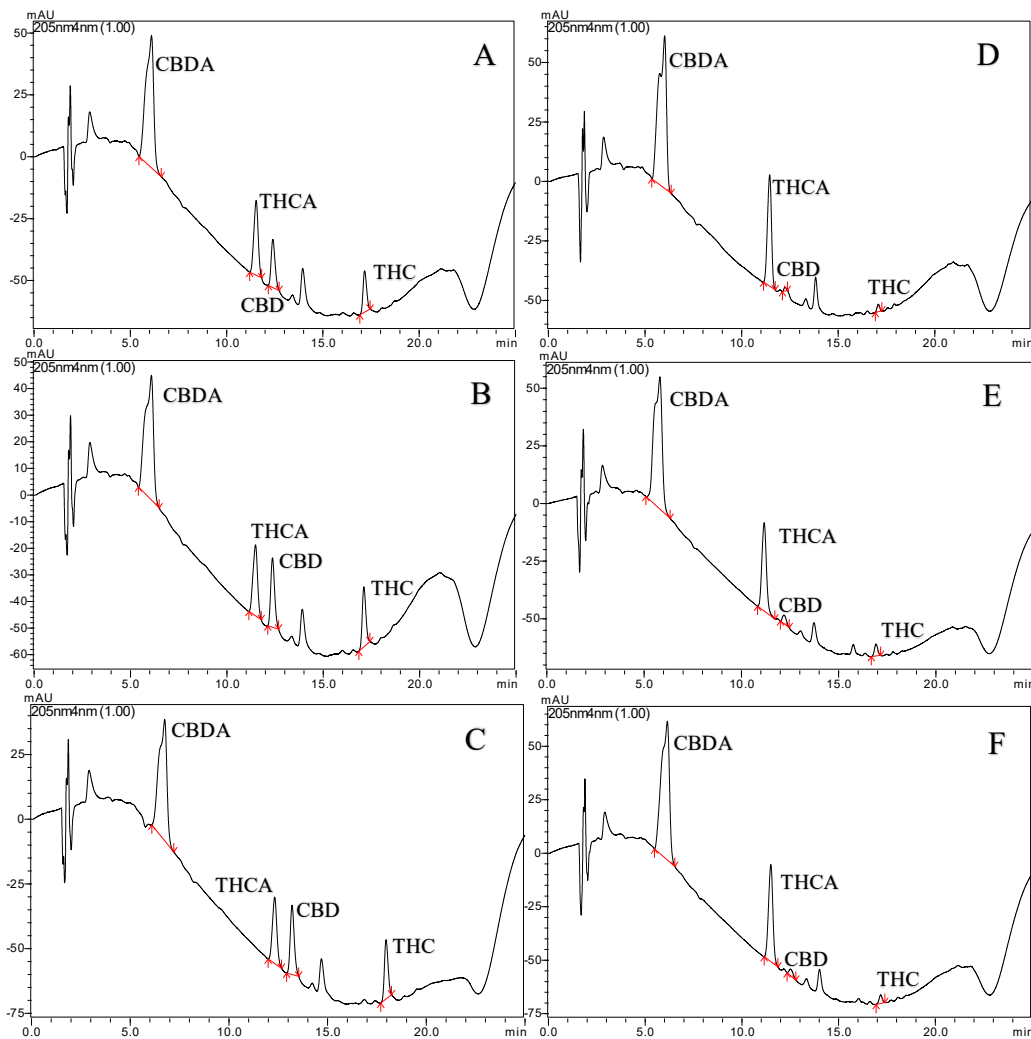


Figura 14.1. Cromatograma representativo del perfil de cannabinoides del aceite de cannabis obtenido por el método de macerado. Empleando calentamiento luego de 1 hora (A), 2 horas (B), 3 horas (C). En el caso de macerado a temperatura ambiente durante 5 días (D), 30 días (E) y 60 días (F). Los picos integrados con líneas rojas representan los cannabinoides cuantificados por HPLC-UV/DAD. De izquierda a derecha: CBD-A, THC-A, CBD y THC.

En este sentido, a tiempos cortos de maceración (entre 1 y 15 días) las concentraciones de los cannabinoides ácidos no presenta diferencias significativas entre sí encontrándose cercanas o un poco por debajo de los 3 mg/ml en el caso del CBD-A y de 2 mg/ml en el caso del THC-A (**Tabla 5.1**). Cuando evaluamos estos cannabinoides en aceites con tiempos más prolongados de maceración (30 y 60 días) se observó un aumento significativo respecto de lo descrito a tiempos cortos, con concentraciones de $3,46 \pm 0,14$ mg/ml de CBD-A y $2,31 \pm 0,08$ mg/ml para THC-A en el caso de una maceración durante 30 días.

Así mismo sólo encontramos cantidades cuantificables de los cannabinoides neutros luego de 15 días de maceración, siendo éstas significativamente menores que las encontradas luego de tiempos largos de maceración tales como $0,19 \pm 0,01$ mg/ml para CBD y $0,17 \pm 0,02$ mg/ml para THC después de 30 días de maceración a temperatura ambiente (**Tabla 5.1**). Nuestros resultados luego de 60 días de macerado muestran una tendencia a la disminución de los cannabinoides ácidos y al aumento de los cannabinoides neutros, probablemente mediada por procesos de descarboxilación naturales. La concentración total de cannabinoides presenta diferencias significativas entre los tiempos largos de maceración respecto de los tiempos cortos; siendo de $6,13 \pm 0,25$ mg/ml para 30 días de maceración respecto de valores cercanos a 5 mg/ml para los tiempos cortos de macerado a temperatura ambiente (1 a 15 días) (**Tabla 5**).

Muestra	mg/ml				
	CBD-A	THC-A	CBD	THC	Totales
Macerado 1 día	$2,92 \pm 0,15$	$2,11 \pm 0,24$	NC	NC	$5,02 \pm 0,40$
Macerado 5 días	$3,04 \pm 0,05$	$2,09 \pm 0,08$	NC	NC	$5,13 \pm 0,03$
Macerado 15 días	$2,84 \pm 0,01$	$2,11 \pm 0,13$	$0,16 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$5,23 \pm 0,16$
Macerado 30 días	$3,46 \pm 0,14^*$	$2,31 \pm 0,08^*$	$0,19 \pm 0,01^*$	$0,17 \pm 0,02^*$	$6,13 \pm 0,25^*$
Macerado 60 días	$3,37 \pm 0,01^*$	$2,00 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,01^*$	$0,24 \pm 0,03^*$	$5,83 \pm 0,10^*$

Tabla 5.1. Concentraciones (mg/ml) de CBD-A, THC-A, CBD, THC y Cannabinoides Totales en los aceites macerados a temperatura ambiente durante diferentes tiempos. (Media \pm SD) (N=3) (NC: no cuantificable). Los * representan diferencias significativas respecto de tiempos cortos de macerado (1 a 15 días).

Analizando las relaciones entre los cannabinoides presentes en estos aceites (**Tabla 6.1**) vemos que a tiempos muy cortos macerado (1 a 5 días) las relaciones CBD-A/THC-A y CBDtotal/THCtotal no se ven modificadas respecto de lo que se encontraba en las inflorescencias. Sin embargo, dado que en estos tiempos de maceración la extracción de

cannabinoides neutros es mínima haciendo imposible la cuantificación con el método empleado, no es posible establecer una relación Ácidos/Neutros. En el caso de la maceración a temperatura ambiente durante 15 y 30 días vemos que las relaciones no presentan modificaciones significativas ni entre ellas ni respecto de la observada en las inflorescencias de partida; encontrando una leve disminución en la relación Ácidos/Neutros en los aceites obtenidos luego de 60 días de macerado.

Mediante este procedimiento se obtuvo una recuperación de los cannabinoides presentes en las inflorescencias del 34% luego de 1 día de macerado, alcanzando un 41% luego de 15 días de contacto. En el caso de tiempos más largos de maceración se observó un aumento en el porcentaje de extracción respecto de las flores empleadas llegado a valores de 70% y 77% para 30 y 60 días respectivamente. Si bien hasta el primer mes se notó una tendencia a aumentar la eficiencia de extracción rápidamente, pasado este tiempo el aumento en la extracción no fue notablemente mayor, lo que se puede traducir en que nos estamos acercando al límite de extracción posible para este método.

Muestra	CBD-A/THC-A	CBD total/ THC total	Ácidos/ Neutros
Inflorescencias	1,4 : 1(SD: 0,1)	1,4 : 1(SD: 0,1)	36 : 1(SD: 8)
1 día	1,4 : 1(SD: 0,1)	1,4 : 1(SD: 0,2)	-
5 días	1,4: 1(SD: 0,1)	1,4 : 1(SD: 0,1)	-
15 días	1,4: 1(SD: 0,1)	1,4 : 1(SD: 0,1)	31 : 1(SD: 0,7)
30 días	1,5: 1(SD: 0,1)	1,5 : 1(SD: 0,1)	30 : 1(SD: 0,5)
60 días	1,7 :1(SD: 0,1)*	1,6 : 1(SD:0,1)*	25 : 1(SD: 0,8)*

Tabla 6.1. Relaciones entre CBD-A/THC-A, CBD total/ THC total y entre cannabinoides Ácidos/Neutros en macerados a temperatura ambiente. (Media; SD) (N=3). Los * indican diferencias significativas.

En el caso de los macerados a baño de María (**Figura 14.1 A, B y C**) vemos que se encuentran tanto cannabinoides ácidos como neutros en cantidades apreciables a los tres tiempos de maceración empleados: 1, 2 y 3 Hs; con una concentración de cannabinoides totales de unos 5,7 mg/ml no registrándose variaciones significativas en este valor en función del tiempo de calentamiento. Sin embargo, los niveles de cannabinoides ácidos CBD-A y THC-A fueron disminuyendo y los niveles de los cannabinoides neutros CBD y THC aumentando luego de 2 y 3 Hs de macerado con calentamiento (**Figura 15.1**).

En este sentido, luego de 1 Hs de macerado con calentamiento se observaron los siguientes niveles de cannabinoides en los aceites: $2,53 \pm 0,04$ mg CBD-A/ml, $1,55 \pm 0,08$ mg THC-A/ml, $0,85 \pm 0,14$ mg CBD/ml y $0,61 \pm 0,12$ mg THC/ml. Luego de 3 Hs de macerado con calentamiento las concentraciones de dichos cannabinoides presentaron las siguientes modificaciones: $2,24 \pm 0,01$ mg CBD-A/ml, $1,28 \pm 0,01$ mg THC-A/ml, $1,25 \pm 0,06$ mg CBD/ml y $0,90 \pm 0,05$ mg THC/ml

En la **Tabla 7.1** se presentan las relaciones entre los cannabinoides a distintos tiempos de calentamiento.

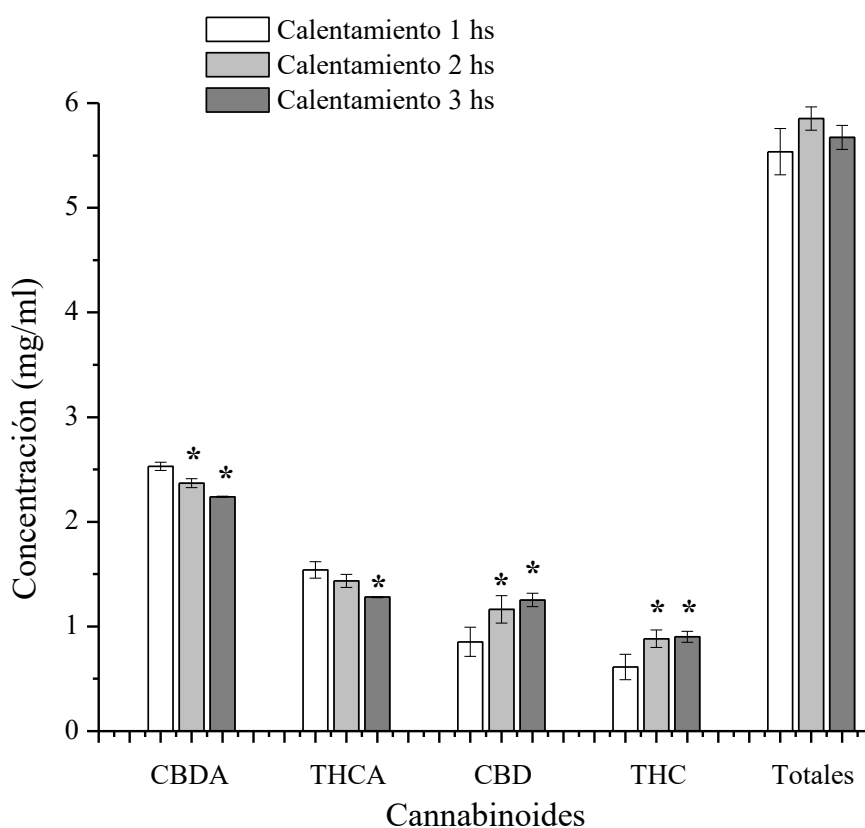


Figura 15.1. Concentración (mg/ml) de cannabinoides ácidos (CBD-A y THC-A), neutros (CBD y THC) y totales en macerados con calentamiento a baño de María durante 1 hs (barras blancas), 2 hs (barras gris claro) y 3 hs (barras gris oscuro). (Media \pm SD, N=3) Los * indican diferencias significativas.

En concordancia con los cambios descritos anteriormente vemos que la relación entre los cannabinoides ácidos y neutros fue menor que la observada en las inflorescencias; disminuyendo a su vez a medida que aumenta el tiempo de calentamiento lo cual es reflejo de la disminución de los cannabinoides ácidos y el aumento de los neutros; mientras que las otras relaciones no muestran cambios significativos indicando que no

existe pérdida neta de cannabinoides en el proceso ni una descarboxilación preferencial de CBD-A o THC-A durante el calentamiento..

Muestra	CBDA/THCA	CBD total/ THC total	Ácidos/ Neutros
Inflorescencias	1,4 : 1(SD: 0,1)	1,4 : 1(SD: 0,1)	36 : 1 (SD: 8)
1 hora	1,7: 1(SD: 0,2)	1,6: 1(SD: 0,1)	2,8: 1(SD: 0,5)*
2 horas	1,7: 1(SD: 0,2)	1,5: 1(SD: 0,1)	1,8: 1(SD: 0,3)*
3 horas	1,7: 1(SD: 0,2)	1,6: 1(SD: 0,1)	1,6: 1(SD: 0,1) *

Tabla 7.1. Relaciones entre CBD-A/THC-A, CBD total/ THC total y entre cannabinoides Ácidos/Neutros en flores y macerados con calentamiento a baño de María durante 1, 2 y 3 Hs. (Media, SD; N=3) Los * indican diferencias significativas.

Mediante esta técnica de preparación de aceites se observó una eficiencia de extracción de cannabinoides totales del 62% sin presentar variación entre los distintos tiempos de calentamiento.

Perfil de Terpenos:

Los aceites obtenidos por macerado a temperatura ambiente presentaron un perfil constituido por 8 terpenos (**Figura 16.1**) compuesto por cinco monoterpenos (α -Pino, β -Pino, β -Mirceno, δ -Limoneno y Linalool) y 3 sesquiterpenos (β -Cariofileno, α -Humuleno y Guaiol). A medida que el tiempo de macerado a temperatura ambiente avanzó el perfil de terpenos se mantuvo en cuanto a los terpenos componentes del mismo, presentando una eficiencia de extracción de terpenos que fue aumentando desde un 29% para 1 día de macerado al 63% para un mes de tratamiento, pasando por valores de 38% y 41% para macerados de 5 y 15 días respectivamente.

Estos aceites alcanzaron su nivel máximo de terpenos totales, 1374 ± 83 PPM, para un tiempo de maceración de 30 días a temperatura ambiente; siendo los terpenos mayoritarios el β -Mirceno y el β -Cariofileno representando entre ambos una abundancia relativa del 49 al 57% mientras que los demás terpenos presentes presentaron abundancias relativas menores al 10%. Luego de 60 días de maceración, si bien se mantiene el perfil de terpenos obtenido, vemos que los valores comienzan a presentar una tendencia a disminuir indicada un porcentaje de recuperación del 56% respecto de

los terpenos presentes en las inflorescencias y una concentración de terpenos totales del 1081 ± 100 PPM.

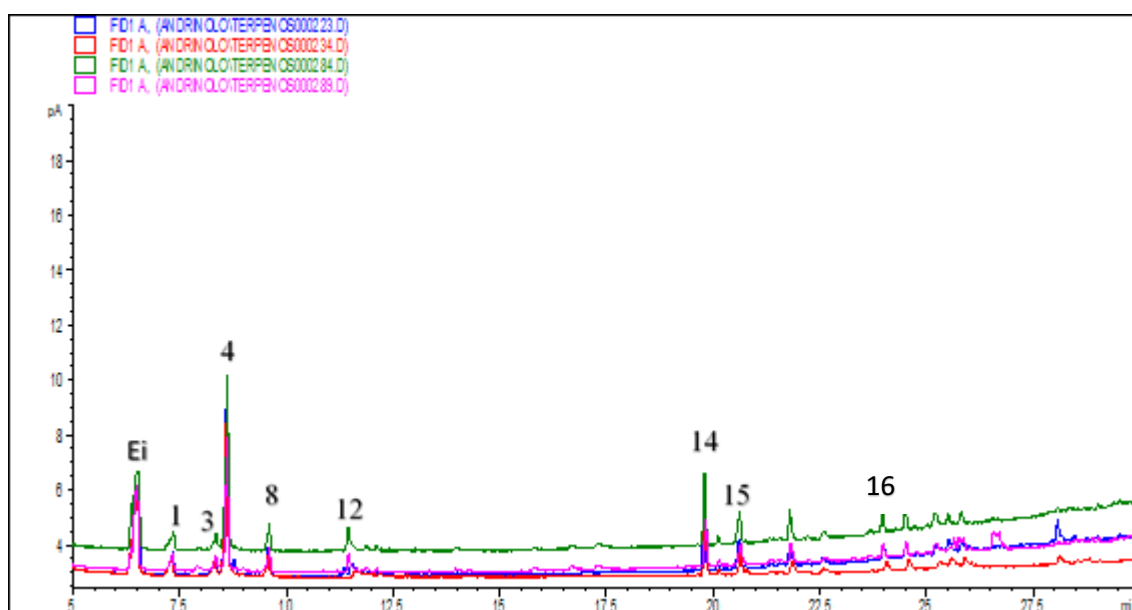


Figura 16.1. Cromatograma representativo del perfil de terpenos del aceite de cannabis obtenido por el método de macerado a temperatura ambiente luego de 1 día (línea azul), 15 días (línea roja), 30 días (línea verde) y 60 días (línea rosa) de maceración determinados por CG-FID. Ei: Estándar interno (Nonano), 1: α -Pinoeno, 3: β -Pinoeno, 4: β -Mirceno, 8: δ -Limoneno, 12: Linalool, 14: β -Cariofileno, 15: α -Humuleno, 16: Guaiol.

En el caso de los aceites obtenidos por macerado a baño de María, encontramos el mismo perfil de terpenos compuesto por los 8 terpenos citados anteriormente (**Figura 17.1**). Sin embargo, en este caso vemos que luego de 1 hs de maceración con calentamiento obtenemos una concentración de terpenos totales de 2191 ± 156 PPM que resulta mayor que la obtenida en el macerado a temperatura ambiente. Este valor representa una eficiencia de extracción del 86% respecto de los terpenos contenidos en las inflorescencias de CAT1.

En este caso también el β -Mirceno y el β -Cariofileno fueron los terpenos mayoritarios representando el 58% de los terpenos presentes en el perfil. En los macerados obtenidos luego de 2 y 3 hs de maceración a baño de María se observó un perfil integrado por los mismos terpenos, pero con una disminución en concentración de los mismos obteniéndose niveles de terpenos totales de 1698 ± 8 PPM y 1582 ± 8 PPM respectivamente.

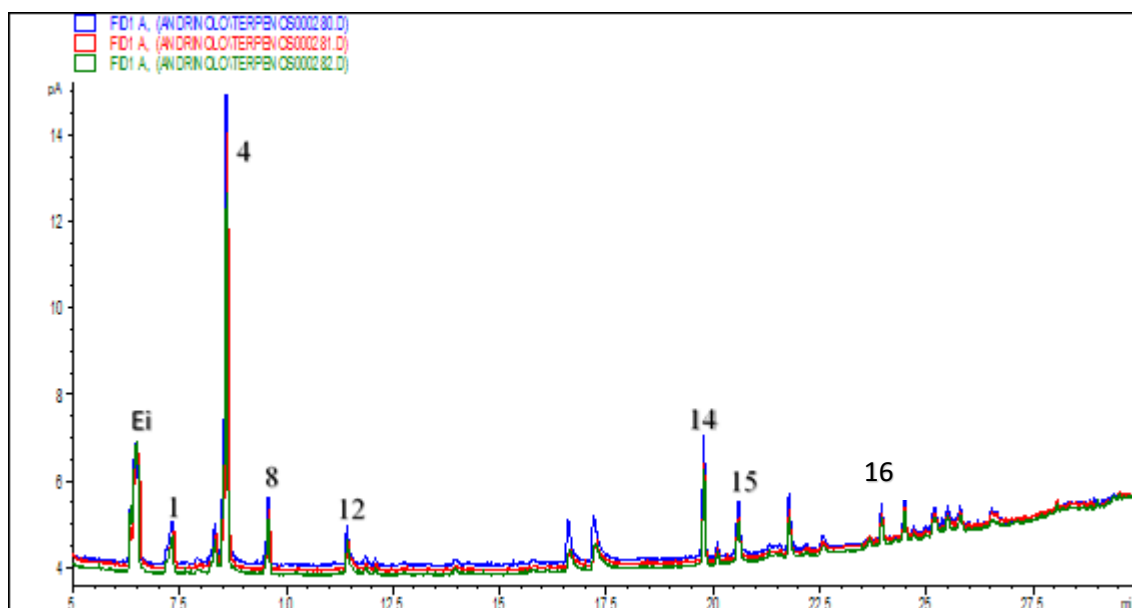


Figura 17.1. Cromatograma representativo del perfil de terpenos del aceite de cannabis obtenido por el método de macerado a baño de María durante 1 hora (línea azul), 2 horas (línea roja) y 3 horas (línea verde); obtenido mediante CG-FID. Ei: Estándar interno (Nonano), 1: α -Pineno, 3: β -Pineno, 4: β -Mirceno, 8: δ -Limoneno, 12: Linalol, 14: β -Cariofileno, 15: α -Humuleno, 16: Guaiol.

3. Estabilidad de los aceites obtenidos por extracción alcohólica y macerados

Con el fin de comenzar a estudiar la estabilidad de los aceites obtenidos mediante los métodos estudiados, hemos fraccionado los mismos y los hemos almacenado en las dos condiciones empleadas habitualmente por los usuarios: Temperatura ambiente (T amb) y en Heladera (4°C). En el caso de los cannabinoides hemos realizado un seguimiento mensual durante un tiempo de entre 8 y 10 meses. Los terpenos fueron determinados luego de 4 meses de almacenamiento en cada caso.

Los aceites obtenidos mediante el método de Extracción alcohólica, presentaron valores estables de cannabinoides durante los primeros dos meses de almacenamiento, sin mostrar diferencias significativas en relación a la temperatura de almacenamiento (**Figura 18.1 B**).

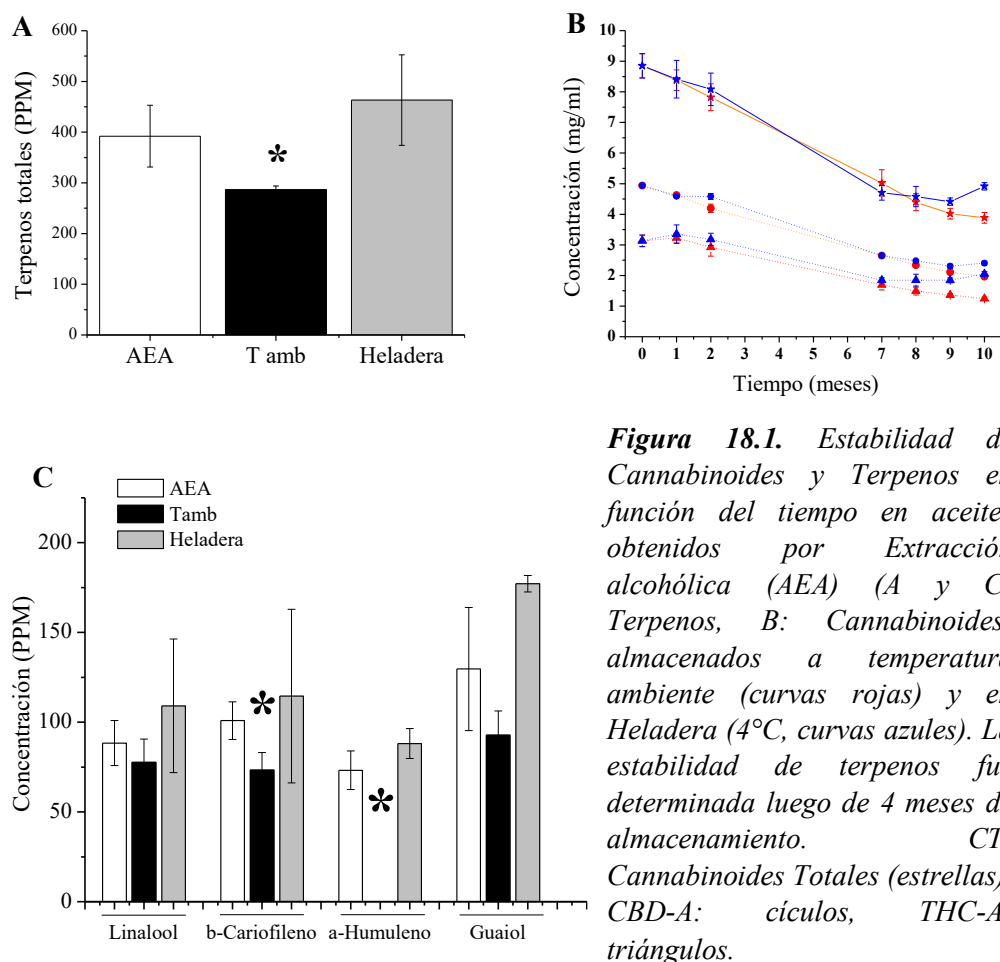


Figura 18.1. Estabilidad de Cannabinoides y Terpenos en función del tiempo en aceites obtenidos por Extracción alcohólica (AEA) (A y C: Terpenos, B: Cannabinoides) almacenados a temperatura ambiente (curvas rojas) y en Heladera (4°C, curvas azules). La estabilidad de terpenos fue determinada luego de 4 meses de almacenamiento. CT: Cannabinoides Totales (estrellas), CBD-A: círculos, THC-A: triángulos.

Sin embargo, en períodos más largos de almacenamiento vimos que la concentración de cannabinoides totales disminuye significativamente respecto de la determinada en el aceite al momento de la preparación y a lo observado durante los primeros meses de almacenamiento. En este caso al aumentar el tiempo de almacenamiento entre los 7 y los 10 meses vemos que esa disminución de concentración se acentúa un poco más al conservarlos a Temperatura ambiente respecto de los 4°C de la heladera. La disminución observada se debe fundamentalmente a la pérdida de cannabinoides ácidos CBD-A y THC-A (**Figura 18.1 B**).

En estos aceites se observó también, luego de 4 meses de almacenamiento a Temperatura ambiente, una disminución de la concentración de terpenos totales (**Figura 18.1 A**) respecto de los contenidos en el aceite recién preparado; mientras que en el almacenamiento en heladera no se registraron diferencias significativas.

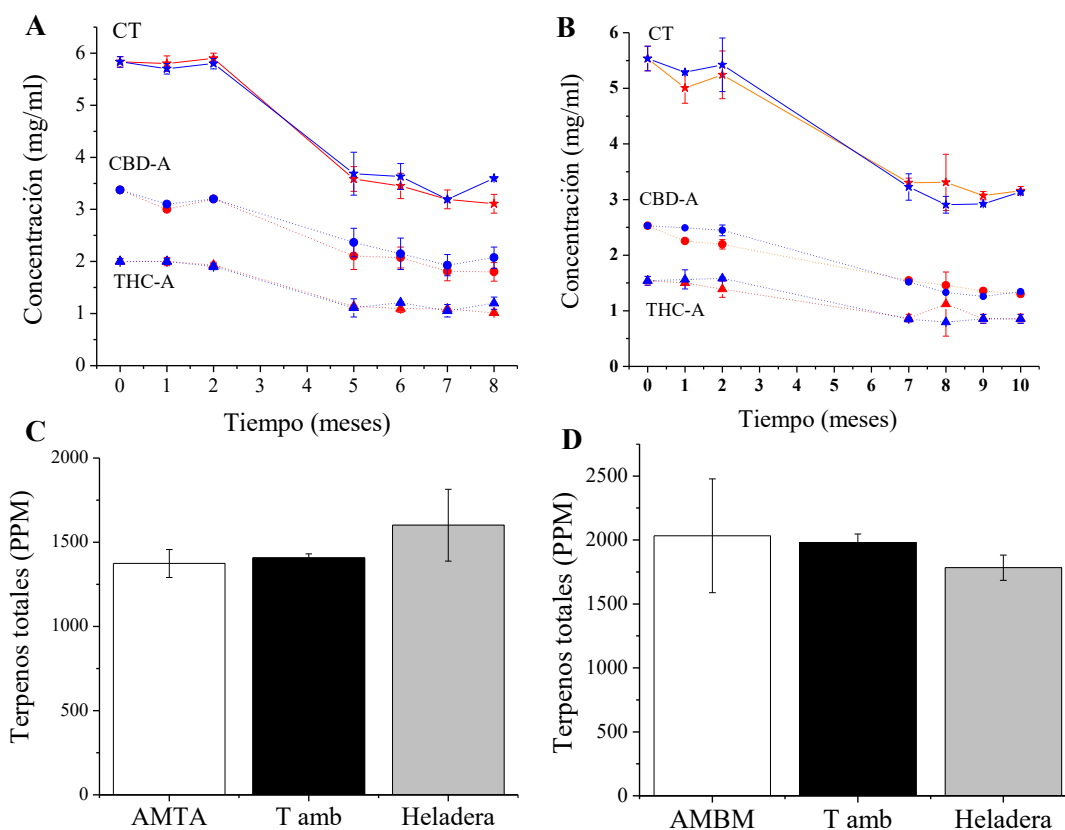


Figura 19.1. Estabilidad de Cannabinoides y Terpenos en función del tiempo en aceites obtenidos por Macerado a temperatura ambiente (AMTA) (A: Cannabinoides, C: Terpenos totales) y Macerado con calentamiento a baño de María (AMBM) (B: Cannabinoides, D: Terpenos totales) almacenados a temperatura ambiente (curvas rojas) y en Heladera (4°C, curvas azules). La estabilidad de terpenos fue determinada luego de 4 meses de almacenamiento. CT: Cannabinoides Totales (estrellas), CBD-A: círculos, THC-A: triángulos.

La disminución de la concentración de terpenos totales deriva de una disminución significativa del β -Cariofileno y del α -Humuleno, siendo este último no detectable en los aceites almacenados a Temperatura ambiente durante 4 meses (**Figura 18.1 C**).

En el caso de los aceites obtenidos mediante el método de macerado, ya sea a Temperatura ambiente durante 30 días o con calentamiento durante 1 hs, no se observaron diferencias significativas en el contenido de cannabinoides durante los primeros dos meses de almacenamiento en las dos condiciones estudiadas; registrándose disminuciones significativas a tiempos largos de almacenamiento (ente los 5 y 10 meses) similares a los observados en el aceite obtenido por extracción alcohólica (**Figura 19.1 A y B**). Sin embargo, luego de 4 meses de almacenamiento de estos

aceites no se observaron disminuciones significativas de los terpenos contenidos en estos aceites (**Figura 19.1 C y D**).

Discusión

En este capítulo hemos determinado las características químicas en cuanto a sus componentes mayoritarios, cannabinoides y terpenos, de aceites de cannabis obtenidos en base a los dos métodos más ampliamente empleados por la comunidad de usuarios terapéuticos de cannabis. Para ello hemos inicialmente caracterizado el contenido de cannabinoides y terpenos en la variedad CAT1. En coincidencia con lo determinado por Vaccarini (2020) y por Giovanonni (2021) hemos determinado que el perfil de cannabinoides de esta variedad está compuesto por CBD-A, THC-A, CBD y THC; y el perfil de terpenos está compuesto por los monoterpenos α -Pinoeno, β -Pinoeno, β -Mirceno, δ -Limoneno y Linalol; y los sesquiterpenos β -Cariofileno, α -Humuleno y Guaiol. Los métodos de obtención estudiados se diferencian en cuanto al solvente o medio extractante, siendo en un caso etanol y en los otros el aceite de girasol directamente; y también en cuanto al tiempo de maceración y temperaturas empleadas. Todos estos detalles de procedimiento generarán productos de diferentes características ya que los distintos medios de extracción, tiempos y temperaturas de contacto ofrecerán condiciones que sean más o menos favorecedoras para la extracción de los principios activos de la variedad de *Cannabis sativa*, CAT1, empleada. (Pattnaik et al, 2022)

El aceite a base de cannabis obtenido mediante una extracción alcohólica inicial de las inflorescencias de CAT1, seguida de la evaporación del etanol a baja temperatura y la posterior resuspensión de la resina obtenida en aceite comestible; fue el que presentó la mayor concentración de cannabinoides totales, registrando un valor de $8,85 \pm 0,39$ mg/ml respecto del $6,13 \pm 0,25$ mg/ml para los macerados a temperatura ambiente (concentración para 30 días de tratamiento) y $5,69 \pm 0,19$ mg/ml en el caso de los macerados con calentamiento a baño de María.

Los aceites obtenidos por el método de extracción alcohólica, si bien mostraron una presencia mayoritaria de los cannabinoides ácidos, CBD-A y THC-A, también presentaron una concentración apreciable de los respectivos cannabinoides neutros, CBD y THC; lo cual indica que, en el proceso de obtención, aun cuando no se emplean

temperaturas demasiado elevadas, puede ocurrir descarboxilación de los cannabinoides ácidos los cuales se transforman en neutros durante el mismo. Así mismo, dado que la conversión de cannabinoides ácidos en neutros no resulta cuantitativa, es posible que existan otros procesos acompañantes como isomerización de cannabinoides en otros compuestos como el Δ^8 -THC, el cual no es posible determinar en este análisis. Sin embargo, no se detectó la presencia de CBN, lo cual indica que el tratamiento realizado no generó condiciones oxidantes que permitan la degradación de cannabinoides (Hazekamp et al., 2004; Ramirez et al., 2018).

Nuestros resultados indican que mediante este método de obtención de aceite de cannabis conseguimos un producto que contiene no sólo los cannabinoides ácidos presentes en la inflorescencia de partida, sino también cannabinoides neutros. Si bien la relación CBDtotal/THCtotal, empleada clásicamente para clasificar productos derivados de cannabis en relación con su empleo terapéutico, no cambia significativamente se observa una disminución significativa de la relación entre cannabinoides ácidos y neutros (Ácidos/Neutros) de 36:1 en la solución alcohólica de partida a 11:1 en el aceite final, debido al incremento de los cannabinoides neutros durante el proceso. Es necesario tener en cuenta este parámetro a la hora de clasificar productos derivados de cannabis de uso terapéutico, ya que los cannabinoides ácidos también tienen propiedades terapéuticas reconocidas, pueden derivar en el organismo en cannabinoides neutros y metabolitos activos mediante las reacciones fisiológicas de biotransformación y aportar de esta forma al efecto séquito característico de los aceites. (Verhoeckx et al., 2006)

En cuanto al perfil de terpenos encontrado en los aceites obtenidos por este método, vemos que sólo contiene 4 terpenos cuantificables con la técnica empleada (1 monoterpeno y 3 sesquiterpenos) de los 8 terpenos encontrados en el extracto alcohólico inicial. Así mismo, el perfil de terpenos de estos aceites no sólo es menos rico en cuanto a la variedad de los terpenos presentes sino también en cuanto a la cantidad de los mismos, ya que los terpenos contenidos en el aceite representan sólo el 12% de los contenidos en el extracto alcohólico inicial. Teniendo en cuenta que los terpenos presentan una gran volatilidad, especialmente los monoterpenos quienes presentan mayores presiones de vapor que los sesquiterpenos y por lo tanto una mayor facilidad para volatilizarse a una temperatura determinada, es que podemos vincular esta

característica fisicoquímica con el perfil de terpenos resultante en estos preparados. Así, en concordancia con lo observado por Pegoraro et al. (2019), la mayor proporción de terpenos se pierde durante el proceso de calentamiento para eliminar el etanol, afectando fuertemente a los monoterpenos presentes en el extracto inicial, dando como resultado que un monoterpeno característico de las variedades de Cannabis como el β -Mirceno sólo sea detectable y un perfil de terpenos caracterizado por sesquiterpenos.

Con respecto a este método de preparación de aceites siempre ha existido una preocupación en cuanto a la eliminación exhaustiva del etanol o a los niveles de etanol que pudieran estar presentes en la resina y finalmente en el aceite generado por dilución de las mismas. Especialmente, dado que en general se emplean temperaturas bajas para este proceso con el fin de evitar una descarboxilación excesiva de los cannabinoides y la degradación de los mismos generando CBN o productos indeseables que generen alteraciones en las características organolépticas del aceite (amargor, picor). (Romano & Hazekamp, 2013). Para abordar este aspecto hemos determinado la presencia de etanol en los aceites obtenidos mediante extracción alcohólica, utilizando la técnica de Microdifusión en Cámara de Conway, obteniendo un valor de $0,39 \pm 0,59$ gr EtOH_{eq}/L de aceite que corresponde a una graduación alcohólica de 0,05° o 0,05%v/v.

En nuestro país, la reglamentación de ANMAT (Disposición 1206/2002) para el caso de especialidades medicinales de venta libre cuya forma farmacéutica sea líquida destinada a la administración oral, indica los límites máximos permisibles en la concentración de etanol de acuerdo al grupo etario de la siguiente manera: 0,5 g% para niños menores de 6 años; 5 g% para niños comprendidos entre 6 y 12 años; y 10 g% para adultos y niños mayores de 12 años. Por otro lado, para la Federación de Alimentos y Medicamentos (FDA), en especialidades como un jarabe para la tos, el límite en concentración de etanol se encuentra entre el 0,5% y el 10%.

Existen productos farmacéuticos autorizados de venta en farmacias tales como los siguientes jarabes para la tos: Romilar (Bayer AG) que informa una concentración de 0,925 mg de etanol anhidro en 5 ml de jarabe lo cual equivale a un 0,02% v/v y Codelasa (Andrómaco) que informa cada 100 ml de jarabe un contenido de 8,2 gr de Alcohol Etilico equivalente a un 10,4% v/v. Usualmente la posología recomendada para el empleo de estos productos en el tratamiento de la tos involucra esquemas de administración con volúmenes y tiempos entre tomas que difieren dependiendo de la

edad del paciente, recomendando también un tratamiento inicial durante 1 semana. En este contexto, la posología recomendada en el prospecto de Romilar jarabe corresponde a una ingesta de jarabe diaria de entre 15 y 20 ml para niños y entre 30 y 40 ml para adultos repartidos en 3 a 4 tomas. En el caso del jarabe Codelasa se recomiendan 20 a 60 ml diarios para niños y 60 ml diarios para adultos repartidos en 4 tomas (cada 6 hs). De esta forma, durante un tratamiento con el jarabe Romilar, la ingesta semanal estimada de etanol en niños estaría entre 16 y 22 mg y en adultos entre 33 y 44 mg; mientras que en el caso del tratamiento con Codelasa sería de 2,9 a 8,5 g en niños y 11,5 a 34,3 g en adultos.

En comparación con esta situación hemos estimado la ingesta semanal al emplear el aceite a base de cannabis obtenidos mediante el método de extracción alcohólica, teniendo en cuenta que se emplean de 5 a 10 gotas diarias lo cual corresponde a 0,25 a 0,5 ml de aceite diarios. De acuerdo a los valores de etanol obtenidos en este aceite, una persona en tratamiento tendría una ingesta estimada de etanol de entre 0,69 y 1,33 mg semanales. En este sentido, el etanol contenido en el aceite cumpliría con lo establecido en las directrices de ANMAT y FDA; y la ingesta semanal estimada se encontraría entre 10 y 10.000 veces por debajo de lo estimado para los jarabes para la tos citados.

Por otro lado, los aceites a base de cannabis obtenidos mediante métodos de maceración en aceite de girasol mostraron diferencias en cuanto a su perfil de cannabinoides y terpenos respecto no sólo de aquellos obtenidos mediante el método de extracción alcohólica; sino también respecto del tiempo y la temperatura de maceración.

En este sentido, en el caso de los aceites obtenidos por macerado a temperatura ambiente podemos establecer dos categorías en cuanto al tiempo de macerado: tiempos cortos considerando menos de 30 días de maceración y tiempos largos de macerado considerando 30 o 60 días de macerado. Cuando hablamos de macerados durante tiempos cortos, vemos que durante 1 y 5 días de macerado obtenemos aceites que presentan en forma cuantificable sólo los cannabinoides ácidos contenidos en CAT1; pasando a encontrarse también cannabinoides neutros luego de 15 días de macerado, manteniendo en este caso las relaciones entre cannabinoides sin diferencias respecto de las inflorescencias. En el caso de los macerados a tiempos largos vemos que luego de 30 días de contacto obtenemos aceites que tienen un contenido de cannabinoides totales ($6,13 \pm 0,25$ mg/ml) menor que el obtenido por el método de extracción alcohólica y

mayor que el obtenido en la maceración a tiempos cortos. Estos aceites presentaron cannabinoides ácidos y neutros, manteniendo la misma relación entre ellos que en las inflorescencias. Al aumentar el tiempo de maceración a 60 días vemos una tendencia a la disminución del contenido de cannabinoides totales y un aumento de la proporción de neutros respecto de los ácidos, lo cual genera una disminución significativa de la relación Ácidos/Neutros a 25:1. En este sentido hemos encontrado la mayor proporción de extracción de cannabinoides (70-77%) a tiempos largos de maceración.

En el caso de los aceites obtenidos por maceración con calentamiento a baño de María vemos que, si bien no se encuentran variaciones en cuanto al contenido total de cannabinoides respecto de lo observado en aceites macerados durante tiempos largos a temperatura ambiente, se presentaron diferencias en las proporciones entre los cannabinoides ácidos y los neutros presentando por lo tanto relaciones Ácidos/Neutros menores que en las inflorescencias.

Así mismo, a medida que aumentó el tiempo de calentamiento a baño de María, se observaron cambios como la coloración del material vegetal debido a la degradación de la clorofila a feofitinas (Ahmed et al., 2002) y en cuanto al contenido de cannabinoides se observó un aumento en la proporción de los cannabinoides neutros debido a una mayor descarboxilación favorecida por la temperatura, lo que generó los aceites con la menor relación Ácidos/Neutros (1,6:1) de entre los métodos estudiados. Estos resultados fueron coincidentes con lo observado por Casiraghi et al., (2017).

Los aceites obtenidos mediante las técnicas de macerado presentaron los 8 terpenos presentes en la variedad CAT1, lo cual muestra un perfil de terpenos más rico que el de los aceites obtenidos por extracción alcohólica. Así mismo, la proporción de los terpenos extraídos aumenta del 63% para 30 días de macerado a temperatura ambiente y del 83% para 1 hs de macerado a baño de María.

En concordancia con lo observado por Brighenti et al., (2017), nuestros resultados indican que el etanol, debido a su polaridad, es el solvente que favorece más la extracción de cannabinoides desde la variedad vegetal permitiendo obtener aceites más concentrados en cannabinoides totales. Sin embargo, debido al proceso de evaporación aun cuando las temperaturas empleadas sean bajas, se genera una variación en la relación entre cannabinoides ácidos y neutros y una pérdida importante de los terpenos. Así mismo, nuestros resultados muestran que, si ponemos el foco en el contenido de

terpenos de los aceites, el mejor solvente o medio de extracción resulta ser el aceite. Esto se puede fundamentar en que el aceite vegetal tiene como características ser altamente no polar y a la vez no volátil, lo cual puede generar una buena solubilización de los terpenos al mismo tiempo que se limita su pérdida por evaporación (Romano & Hazekamp, 2013). Dado que el aceite minimiza la pérdida de terpenos por evaporación es que podemos emplear temperaturas como las del baño de María para favorecer la extracción de los mismos si tener una pérdida considerable de ellos; tal como ocurre en los macerados con calentamiento durante 1 hs.

Es interesante tener presente estas características ya que en muchos casos puede resultar deseable la presencia en el aceite obtenido de cannabinoides ácidos y compuestos volátiles como los terpenos. Estas situaciones pueden resultar en un valor agregado en el producto ya que se han establecido los efectos benéficos para la salud humana de los cannabinoides ácidos y los terpenos (Ternelli et al., 2020) y además los aceites que podemos encontrar a la venta, en internet por ejemplo, usualmente sólo contienen cannabinoides neutros y su perfil de terpenos es pobre (Sedan et al., 2021).

En lo que respecta a la estabilidad de los aceites durante su almacenamiento podemos dividir los resultados en dos categorías: tiempos cortos de almacenamiento (2 meses) y tiempos largos (más de 7 meses). En coincidencia con lo observado por Politi et al (2008) nuestros resultados indican que dentro de los tiempos cortos la variación en la concentración de cannabinoides no es significativa frente a los aceites elaborados el día cero, independientemente de la temperatura a la cual fueron almacenados. Sin embargo, con el paso del tiempo, posterior a los 7 meses, se visualizó una leve tendencia a una mejor conservación de los cannabinoides a 4°C. Por otro lado, la estabilidad de los terpenos se vio más afectada en el caso de los aceites obtenidos por extracción alcohólica, disminuyendo significativamente luego de 4 meses almacenados a temperatura ambiente fundamentalmente por la pérdida de α -Humuleno y la disminución de β -Cariofileno. En este sentido el almacenamiento en heladera resultó más eficiente para la conservación de los terpenos contenidos en este aceite.

Conclusiones particulares:

Por lo descripto anteriormente, vemos que los distintos métodos generan productos diversos, algunos que tienen perfiles de terpenos y cannabinoides más parecidos a los de la variedad de Cannabis de partida y otros sensiblemente diferentes. En este sentido, si el objetivo es obtener un aceite que presente un perfil de cannabinoides similar a de la inflorescencia de partida con predominancia de cannabinoides ácidos y con un perfil moderadamente rico de terpenos emplearemos un procedimiento de macerado a temperatura ambiente durante 30 días; mientras que si el objetivo es obtener un aceite más equilibrado en cuanto al contenido de cannabinoides ácidos y neutros, manteniendo el perfil de terpenos emplearemos un método de obtención por maceración con calentamiento durante 1 hs; aportando como un beneficio que puede resultar interesante la reducción en el tiempo de procesamiento y obtención del aceite deseado. Finalmente, si el objetivo es obtener un aceite con un mayor contenido de cannabinoides emplearemos el método de obtención del aceite por extracción alcohólica. De esta forma, contaremos con un perfil de terpenos más pobre que en el caso de los macerados, pero tendremos incluso la posibilidad de obtener aceites de con un rango de concentraciones más amplio, regulando el volumen de aceite en el que se diluirá la resina o incluso empleando directamente la resina obtenida sin diluir. Esta situación puede ser de utilidad en casos de tratamiento de dolores intensos por ejemplo en situaciones de cuidados paliativos.

Capítulo 2

*Estudio de un método alternativo de obtención
de aceites de cannabis:*

Extracción por Afinidad

A partir de los resultados de la caracterización de los aceites obtenidos en base a los métodos empleados clásicamente por los usuarios terapéuticos, extracción alcohólica y macerado en aceite, descritos en el **Capítulo 1**; avanzamos en métodos alternativos de producción de aceites con el fin de poder obtener un aceite con un método que no involucre el empleo de temperaturas para evitar la conversión de cannabinoides ácidos en neutros y la pérdida sensible de terpenos, y que a la vez presente un tiempo relativamente corto de preparación. En este sentido, planteamos un método que combina en cierta forma los métodos de extracción citados previamente partiendo de una extracción alcohólica inicial que, en lugar de continuarse con una evaporación del solvente, se continúa con el establecimiento de un sistema heterogéneo al contactar la solución hidroalcohólica obtenida con el aceite de girasol. De esta forma, mediante una extracción líquido-líquido, se obtiene un aceite conteniendo los principios activos en base a la afinidad de los mismos por un medio de baja polaridad como el aceite. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de los aceites a base de CAT1 obtenidos mediante el método por Afinidad.

1. Método de obtención de aceites mediante Afinidad:

El aceite se obtuvo a partir de un extracto alcohólico clásico de inflorescencias de CAT1, al cual se le agregó un 50% de su volumen en agua para generar una solución hidroalcohólica que mantenga las características de polaridad suficiente para evitar la precipitación de los cannabinoides que resultan insolubles en agua. Seguidamente se colocaron 30 ml de aceite de girasol y se llevó adelante la extracción líquido-líquido según se describe en la sección **2.4** de **Materiales y Métodos**. A partir de este procedimiento obtuvimos diversos productos y sub-productos. Por un lado y como resultado de la separación de fases en la extracción líquido-líquido obtuvimos un primer aceite que denominamos “aceite crudo”, que estuvo en contacto con el extracto alcohólico de CAT1 diluido (65% de etanol), y una solución hidroalcohólica remanente que denominamos “aguas madres”. Por otro lado, con el fin de eliminar el etanol que pudieran haber quedado en el aceite crudo se realizaron lavados del mismo, luego de los cuales obtuvimos el que sería el producto final que denominamos “aceite lavado” y también recuperamos las “aguas de lavado” con el fin de determinar posibles pérdidas de principios activos.

1.1 Caracterización química del aceite resultante de la extracción por Afinidad.

🌿 Perfil de Cannabinoides.

Se llevó a cabo la determinación del perfil de cannabinoides presentes en los distintos productos y sub-productos. El aceite crudo mostró un perfil de cannabinoides con cannabinoides ácidos (CBD-A y THC-A) en cantidades mayoritarias respecto a los neutros (THC y CBD) (**Figura 1.2 A**). El aceite obtenido luego de los lavados no mostró diferencias significativas en el perfil de cannabinoides obtenidos, ni en presencia de los distintos cannabinoides ni en concentración de los mismos (**Figura 1.2 B, Tabla 1.2**).

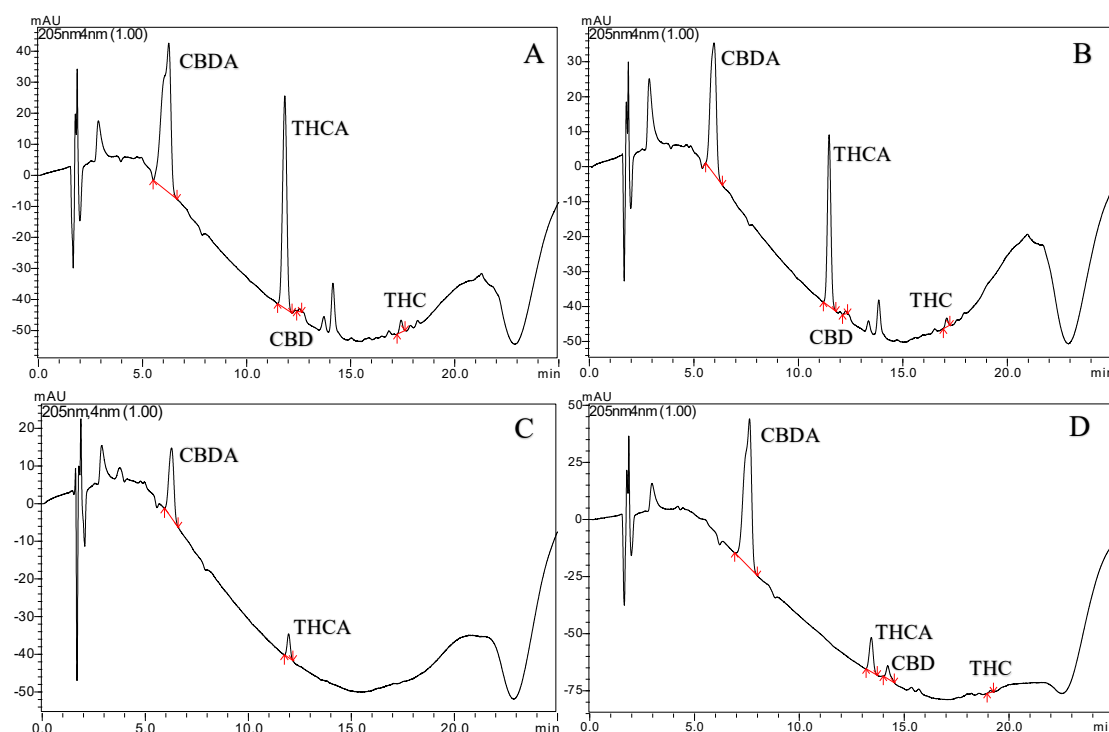


Figura 1.2. Cromatogramas representativos de los productos y sub-productos obtenidos mediante el método de extracción por afinidad. **A)** Aceite crudo, **B)** Aceite lavado, **C)** Aguas de lavado y **D)** Aguas madres.

En este sentido el producto final obtenido mediante el método por Afinidad presentó concentraciones de $2,06 \pm 0,19$ mg/ml para CBD-A, $2,72 \pm 0,17$ mg/ml para THC-A y $0,16 \pm 0,04$ mg/ml para THC, siendo el CBD detectable no cuantificable.

Este aceite presentó una concentración de cannabinoides totales de $5,05 \pm 0,20$ mg/ml correspondiendo a una eficiencia de extracción del 50 % respecto del extracto alcohólico inicial.

Muestra	Concentración (mg/ml)				
	CBD-A	THCA	CBD	THC	Totales
Aceite Crudo	1,95 ± 0,50	2,72 ± 0,44	NC	0,13 ± 0,02	4,80 ± 0,96
Aceite Lavado	2,06 ± 0,19	2,72 ± 0,17	NC	0,16 ± 0,04	5,05 ± 0,20
Aguas Madres	0,77 ± 0,13	0,21 ± 0,08	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,01	1,04 ± 0,22
Aguas Lavados	0,04 ± 0,02	0,01 ± 0,01	-	-	0,05 ± 0,02

Tabla 1.2. Concentraciones (mg/ml) de CBD-A, THC-A, CBD, THC y Cannabinoides Totales en los productos y sub-productos derivados de la extracción por afinidad de CAT1. (Media ± SD) (N = 3).

En las aguas madres se observó la presencia de CBD-A, THC-A, CBD y THC (**Figura 1.2 D**) con una concentración de $0,77 \pm 0,13$ mg/ml, $0,21 \pm 0,08$ mg/ml, $0,04 \pm 0,01$ mg/ml y $0,01 \pm 0,01$ mg/ml respectivamente, constituyendo entonces un nivel de cannabinoides totales de $1,04 \pm 0,22$ mg/ml (**Tabla 1.2**). Este valor indica que un 39% de los cannabinoides contenidos inicialmente quedaron remanentes en la solución hidroalcohólica. Así mismo, en las aguas de lavado sólo se detectaron cannabinoides ácidos, CBD-A y THC-A, en cantidades muy bajas que resultaron prácticamente despreciables (**Figura 1.2 C**).

Nuestros resultados indican que mediante el método de extracción por Afinidad obtenemos un aceite a base de cannabis con una concentración de cannabinoides totales similar al obtenido por los métodos de maceración directa en aceite de girasol, ya sea a temperatura ambiente o con calentamiento a baño de María. Así mismo presenta una concentración de cannabinoides totales significativamente menor que el obtenido mediante el método de extracción alcohólica (**Figura 2.2**).

Un aspecto que resulta interesante notar es la constitución del perfil de cannabinoides de los aceites y sub-productos obtenidos mediante el método de Afinidad. En el caso del aceite lavado vemos que el cannabinoide predominante es el THC-A, seguido por el CBD-A; mientras que en el caso de las aguas madres se observó una predominancia del CBD-A seguido por el THC-A mucho más similar a lo observado en las inflorescencias de CAT1. Esto se refleja en las variaciones observadas en las relaciones entre cannabinoides para estos productos (**Tabla 2.2**).

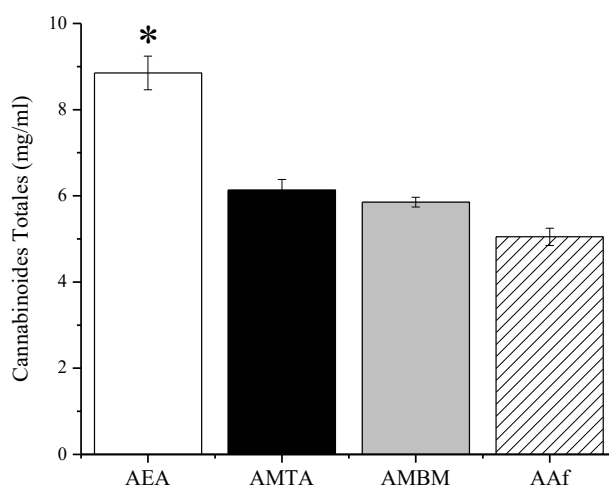


Figura 2.2. Concentración de Cannabinoides totales (mg/ml) para los aceites a base de cannabis obtenidos por los distintos métodos estudiados. AEA: Aceite por Extracción Alcohólica, AMTA: Aceite por Macerado a Temperatura ambiente (30 días), AMBM: Aceite por Macerado a baño de María y AAF: Aceite por Afinidad. El * indica diferencias significativas.

En este sentido observamos que la relación CBD-A/THC-A y la relación CBDtotal/THCtotal se invierten en el aceite respecto de lo observado para la solución alcohólica obtenida de las inflorescencias de CAT1 de la cual se partió, debido a la mayor presencia relativa de THC-A fundamentalmente.

	CBDA/THCA	CBD total/ THC total	Ácidos/ Neutros
Solución Alcohólica	1,4: 1 (SD: 0,1)	1,4: 1(SD: 0,1)	36: 1(SD: 8)
Aceite Lavado	1: 1,3 (SD: 0,1)*	1: 1,4(SD: 0,1)*	30: 1(SD: 1)
Aguas Madres	3,8: 1 (SD: 0,82)*	3,8: 1(SD: 0,84)*	20: 1(SD: 3)*

Tabla 2.2. Relaciones CBDA/THCA, CBD total/ THC total, y entre cannabinoides Ácidos/Neutros para la solución alcohólica de partida, el aceite lavado y las aguas madres. Los * indican diferencias significativas.

Las aguas madres presentan un incremento en las relaciones CBD-A/THC-A y CBDtotal/THCtotal respecto de la solución alcohólica y del aceite lavado, producto de la diferencia en la extracción de estos cannabinoides.

Al comparar las relaciones entre los cannabinoides en los distintos aceites obtenidos, vemos que el aceite producido por el método de extracción por Afinidad es el único de los aceites de cannabis estudiados que presenta variaciones entre las relaciones de los cannabinoides ácidos entre si y en la relación CBDtotal/THCtotal (**Tabla 3.2**).

	CBDA/THCA	CBD total/ THC total	Ácidos/ Neutros
Solución Alcohólica	1,4: 1 (SD: 0,1)	1,4: 1(SD: 0,1)	36: 1(SD: 8)
Aceite Ext. Alcohólica	1,6: 1(SD: 0,1)	1,5: 1(SD: 0,1)	11: 1(SD: 2)*
Aceite Macerado T. amb. (30 días)	1,5: 1(SD: 0,1)	1,5 : 1(SD: 0,1)	30 : 1(SD: 0,5)
Aceite Macerado calentamiento	1,7: 1(SD: 0,1)	1,6: 1(SD: 0,1)	2,8: 1(SD: 0,5) *
Aceite Afinidad	1: 1,3 (SD: 0,1)*	1: 1,3(SD: 0,1)*	30: 1(SD: 1)

Tabla 3.2. Relaciones CBDA/THCA, CBD total/ THC total, y entre cannabinoides Ácidos/Neutros para los aceites obtenidos por los distintos métodos estudiados y para la solución alcohólica de las inflorescencias de CAT1. Los * indican diferencias significativas.

Aun cuando la relación entre cannabinoides ácidos y neutros no se modifica significativamente en este aceite respecto de lo observado en CAT1, debemos tener presente que los cannabinoides ácidos están un poco más enriquecidos en THC-A y que como cannabinoides neutros cuantificables solo encontramos THC.

Así mismo, resulta evidente que la relación cuantitativa entre cannabinoides ácidos y neutros sólo resulta alterada cuando en el proceso de obtención del aceite se emplean etapas de calentamiento, tal como es el caso del método por extracción alcohólica tradicional y el método por macerado a baño de María (**Tabla 3.2**).

Perfil de Terpenos:

En la **Figura 3.2**. se presentan los cromatogramas representativos del aceite lavado obtenido en este procedimiento y las aguas madres remanentes. Estos aceites presentaron un perfil de terpenos compuesto por los 8 terpenos que se encontraban presentes en el extracto alcohólico inicial: α -Pino, β -Pino, β -Mirreno, δ -Limoneno, Linalool, β -Cariofileno, α -Humuleno y Guaiol.

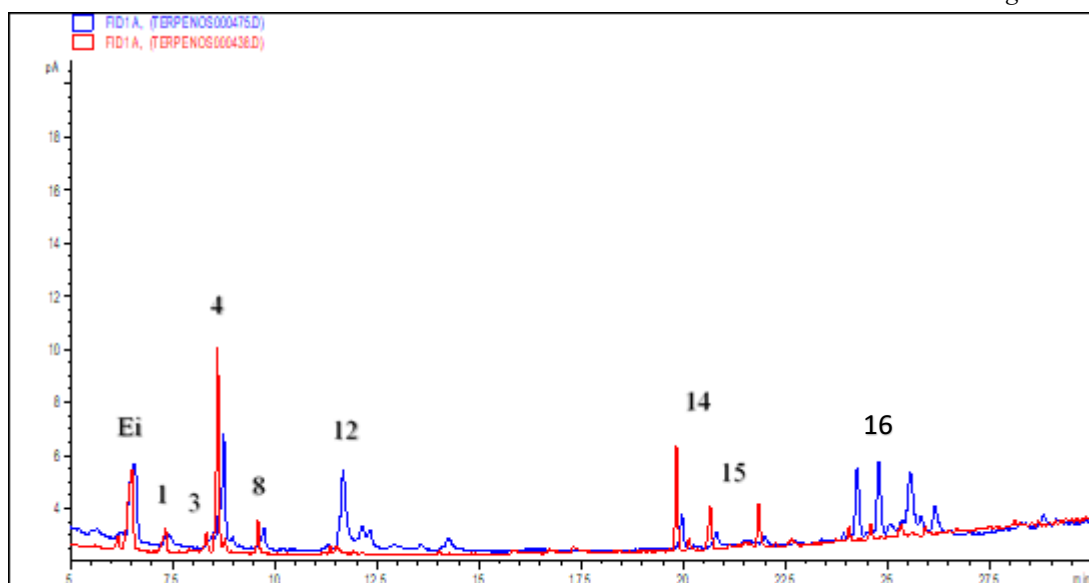


Figura 3.2. Cromatograma correspondiente al perfil de terpenos del aceite lavado (rojo) y aguas madres (azul), donde los números indican los terpenos identificados mediante GC-FID: Ei) Nonano 1) α -Pinoeno 3) β -Pinoeno 4) β -Mirceno 8) δ -Limoneno 12) Linalool 14) β -Cariofileno 15) α -Humuleno 16) Guaiol.

El contenido total de terpenos en el aceite lavado fue de 1750 ± 13 PPM; lo cual representa una eficiencia en la extracción de 51% respecto del extracto alcohólico inicial. En este producto los terpenos mayoritarios encontrados fueron el β -Mirceno, β -Cariofileno y α -Humuleno, constituyendo en conjunto el 70% de la abundancia relativa; y alcanzando concentraciones de 682 ± 51 PPM para el β -Mirceno y de 345 ± 31 PPM para el β -Cariofileno (**Tabla 4.2**).

Terpeno	Concentración (PPM)	Abundancia Relativa %
α -Pinoeno	144 ± 12	8
β -Pinoeno	82 ± 16	5
β -Mirceno	682 ± 51	39
δ -Limoneno	109 ± 9	6
Linalool	84 ± 8	5
β -Cariofileno	345 ± 31	20
α -Humuleno	190 ± 37	11
Guaiol	$113,3 \pm 0,3$	6

Tabla 4.2. Concentración (PPM) y abundancias relativas (%) del perfil de terpenos determinados por CG-FID en el aceite lavado obtenido mediante el método de afinidad.

El resto de los terpenos presentaron un rango de abundancias de entre el 8 y el 3% con concentraciones de 144 ± 12 PPM para el α -Pino, 82 ± 16 PPM para el β -Pino, 109 ± 9 PPM para el δ -Limoneno, 84 ± 8 PPM para el Linalool, 190 ± 37 PPM para el α -Humuleno y $113,3 \pm 0,3$ PPM para el Guaiol (**Tabla 4.2**).

Terpeno	Abundancia Relativa (%)			
	AEA	AMTA	AMBM	AAf
α -Pino	ND	8	9	8
β -Pino	ND	3	5	5
β -Mirceno	NC	37	47	39
δ -Limoneno	ND	6	7	6
Linalool	23	12	7	5
β -Cariofileno	26	15	12	20
α -Humuleno	19	9	6	11
Guaiol	33	11	6	6

Tabla 5.2. Abundancias relativas (%) del perfil de terpenos para los aceites obtenidos por los distintos métodos estudiados. AEA: Aceite por Extracción Alcohólica, AMTA: Aceite por Macerado a Temperatura ambiente (30 días), AMBM: Aceite por Macerado a baño de María y AAf: Aceite por Afinidad. En negrita se indican los terpenos con abundancias relativas mayores del 10%

Las aguas madres remanentes presentaron un contenido total de terpenos de 78 ± 20 PPM compuesto por los mismos 8 terpenos presentes en el extracto alcohólico y en el aceite obtenidos por este método. Sin embargo, en el caso de las aguas madres este perfil se caracteriza por tener en cantidades mayoritarias al Linalool, Guaiol y al β -Mirceno representando en conjunto el 84% de las abundancias relativas; mientras que los otros terpenos presentan una abundancia relativa de entre el 4 y el 2 %. Por otro lado, en las aguas de lavado no se detectaron terpenos mediante la técnica de análisis empleada.

Así mismo se observó que el perfil de terpenos obtenido mediante este método presentaba, al igual que los aceites obtenidos por las técnicas de macerado, al β -Mirceno como el terpeno más abundante del perfil, seguido por el β -Cariofileno. Sin embargo, se diferencia de esos perfiles en la presencia con más del 10% de abundancia relativa del α -Humuleno; el cual resulta un integrante de los terpenos mayoritarios en los aceites obtenidos por extracción alcohólica, mientras que se presenta en cantidades menores en el caso de los aceites por macerados (**Tabla 5.2**).

Así mismo, los aceites obtenidos por procesos de macerado, ya sea con calentamiento o a temperatura ambiente, y los aceites obtenidos por el método de afinidad presentan 8 terpenos, siendo 3 o 4 los mayoritarios y el resto en una proporción sensiblemente menor respecto de los anteriores (menos del 10% de abundancia relativa). En cambio, los aceites obtenidos por el método de extracción alcohólica presentan cuatro terpenos cuantificables, con una distribución de abundancias relativas bastante más parejo entre estos cuatro terpenos; encontrándose por encima del 10% los valores de sus abundancias relativas (*Tabla 5.2*).

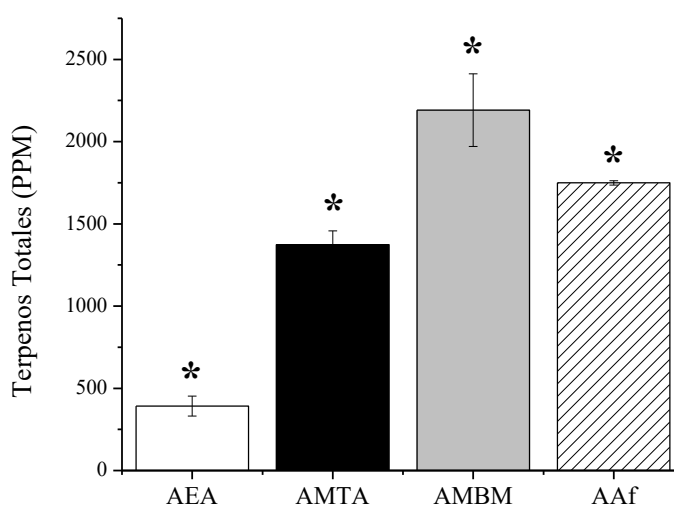


Figura 4.2. Concentración (PPM) de terpenos totales para los aceites obtenidos por los distintos métodos estudiados. (Media \pm SD, N=3) AEA: Aceite por Extracción Alcohólica, AMTA: Aceite por Macerado a Temperatura ambiente (30 días), AMBM: Aceite por Macerado a baño de María y AAF: Aceite por Afinidad. Los * indican diferencias significativas.

Además de las características cualitativas del perfil en cuanto a los terpenos presentes en los aceites obtenidos por los distintos métodos, vemos que el aceite derivado del método por afinidad presentó un nivel de terpenos menor que el obtenido por el método de macerado con calentamiento a baño de María y mayor que el contenido en los aceites obtenidos por macerados a temperatura ambiente y por el método de extracción alcohólica (*Figura 4.2*).

🌿 Etanol Residual

Dado que, al igual que en la extracción alcohólica, en este método partimos de una solución hidroalcohólica inicial, determinamos mediante microdifusión en Cámara de Conway el etanol presente en el aceite crudo y en el aceite lavado (**Figura 5.2**).

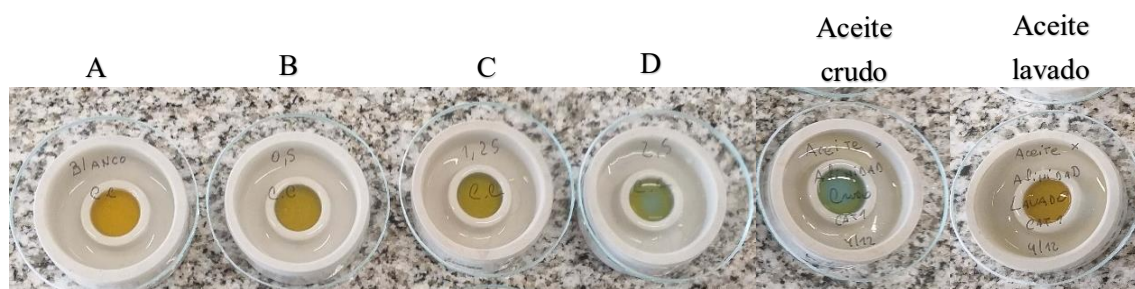


Figura 5.2. Determinación de etanol mediante Microdifusión en cámara de Conway en los aceites obtenidos mediante el método de afinidad: Aceite crudo y Aceite lavado. Curva de Calibración realizada con etanol de las siguientes concentraciones: Blanco (A), 0,5 gr/l (B), 1,25 gr/l (C) y 2,5 gr/l (D).

En este caso la concentración determinada para el aceite crudo fue de $2,33 \pm 0,03$ gr EtOH eq/l que correspondería a una graduación alcohólica de $0,3^\circ$ o un $0,3\%$ v/v. Luego de los tres lavados con agua realizados, el aceite lavado presentó una concentración de $0,22 \pm 0,06$ g EtOH eq/l, es decir una graduación alcohólica de $0,02^\circ$ o un $0,02\%$ v/v. El aceite lavado presenta menores niveles de etanol residual que el observado en el caso del aceite obtenido por extracción alcohólica directa.

2. Estabilidad de los aceites obtenidos por el método de Afinidad:

Al igual que con los aceites obtenidos por los métodos descritos en el **Capítulo 1**, hemos realizado la determinación de cannabinoides y terpenos en aceites obtenidos mediante el método de Afinidad almacenados a temperatura ambiente y en heladera (4°C) (**Figura 6.2**).

En este caso observamos que a tiempos relativamente cortos de almacenamiento (1 a 3 meses) los niveles de cannabinoides se mantienen estables; mientras que a tiempos más largos de almacenamiento (de 7 a 10 meses) la concentración de los cannabinoides totales disminuye fundamentalmente vinculada a la pérdida de cannabinoides ácidos (**Figura 6.2 B**).

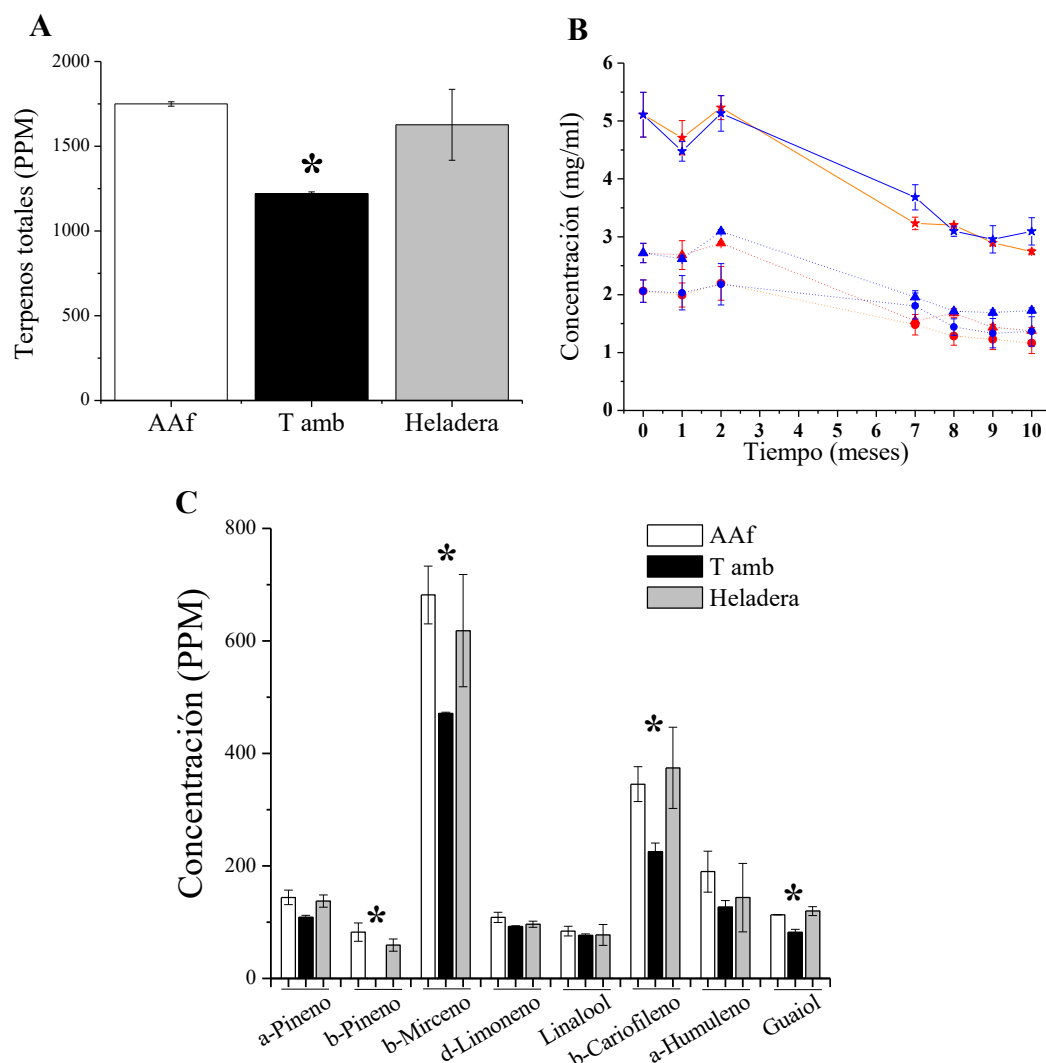


Figura 6.2. Estabilidad de Cannabinoides (B) y Terpenos (A y C) en función del tiempo en aceites obtenidos por el método de Afinidad (AAf) almacenados a temperatura ambiente (curvas rojas) y en Heladera (4°C, curvas azules). La estabilidad de terpenos fue determinada luego de 4 meses de almacenamiento en las mismas condiciones. CT: Cannabinoides Totales (estrellas), CBD-A: círculos, THC-A: triángulos. (Media \pm SD, N=3) Los * indican diferencias significativas.

Así mismo, hemos observado que luego de 4 meses de almacenamiento la concentración de terpenos totales disminuye en los aceites conservados a temperatura ambiente; mientras que no se registran diferencias significativas en este valor en los aceites conservados en refrigeración (**Figura 6.2 A**). Esta disminución de terpenos totales se debe fundamentalmente a la disminución significativa de los terpenos β -Mirceno, β -Cariofileno, Guaiol y β -Pineno; resultando éste último no detectable mediante el método por GC-FID empleado (**Figura 6.2 C**).

Discusión

En este Capítulo hemos abordado el estudio de un método alternativo de preparación de aceites a base de cannabis, donde el mismo se lleva a cabo combinando una extracción inicial de los principios activos de la variedad CAT1 por contacto con etanol apto uso alimentario (96°) y una posterior re-extracción de los mismos de esa solución hidroalcohólica inicial empleando un proceso de extracción líquido-líquido utilizando como fase extractante e inmiscible con la anterior al aceite. De esta manera obtuvimos un aceite sin emplear un paso de evaporación por calentamiento del etanol y con un tiempo de elaboración relativamente corto ya que el tiempo promedio de preparación del aceite, incluido el lavado final del aceite crudo, fue de dos días.

El contenido de cannabinoides totales en estos aceites fue del orden de lo observado en los aceites obtenidos por los métodos de macerados ya sea a temperatura ambiente o con calentamiento a baño de María; presentando a su vez una disminución del 43% en la concentración de cannabinoides totales respecto de lo observado en los aceites obtenidos por extracción alcohólica.

En cuanto al contenido de los cannabinoides ácidos y neutros presentes en este aceite es de destacar que mediante este método de obtención se observó un mayor contenido de THC-A que de CBD-A; aspecto destacable ya que las inflorescencias de partida (CAT1) presentan mayor contenido de CBD-A que de THC-A. En este sentido se observó una inversión en la relación de estos cannabinoides ácidos, presentando una relación CBD-A/THC-A de 1:1,3 respecto de la observada en el extracto alcohólico de CAT 1 (CBD-A/THC-A: 1,4:1). Esta diferencia en la extracción también se observó en los cannabinoides neutros que se encuentran en menor proporción, siendo el CBD detectable no cuantificable. Por otro lado, la relación Ácidos/Neutros no se vio afectada respecto de la encontrada en las inflorescencias o de los aceites obtenidos por maceración a temperatura ambiente. Sin embargo, que la relación Ácidos/Neutros no varíe no significa que el contenido de cannabinoides ácidos y de cannabinoides neutros sea el mismo en todos los sentidos; ya que si bien cuantitativamente no se diferencian sí lo hacen cualitativamente dado que en el caso del aceite obtenido por maceración a temperatura ambiente el cannabinoide mayoritario es el CBD-A mientras que en el aceite obtenido por afinidad el cannabinoide mayoritario es el THC-A; característica a la que debe prestarse atención.

Producto	Origen/Farmacéutica	Cannabinoides totales	CBDt/THCt	Ácidos/ Neutros
Roffo	Autocultivo/Cultivo solidario	3.2 mg/ml	1:22,2	1,1: 1 ± (SD: 0,2)
Extracción por Afinidad	CIM – CAT1	5,1 mg/ml	1:1,3	30: 1(SD: 1)
Macerado con calentamiento	CIM – CAT1	5,7 mg/ml	1,6:1	2,8: 1(SD: 0,5)
Macerado Temperatura ambiente	CIM – CAT1	6,1 mg/ml	1,5:1	30 : 1(SD: 0,5)
Charlotte’s Web CBD Oil	Stanley Brothers	7 mg/ml	Sólo informa CBD	
RSHO: Green, Blue and Gold Label	Hemp Meds	8,5 mg/ml	Sólo informa CBD	
Extracción Alcohólica	CIM – CAT1	8,9 mg/ml	1,5:1	11: 1(SD: 2)
Generales	Autocultivo/Cultivo solidario	11,1 mg/ml	1:21,7	1,1:1 (SD: 0,1)
Charlotte’s Web CBD Oil	Stanley Brothers	17 mg/ml	Sólo informa CBD	
THC 20:1 – Oil (Formely Champlain)	Aphria	21,3 mg/ml	1:20	
THC:CBD 10:13 –Oil (Formely Capilano)	Aphria	21,5 mg/ml	13:10	
CBD 25:1 – Oil (Formely Ridean)	Aphria	25,2 mg/ml	25:1	
ACUFALP	Autocultivo/Cultivo solidario	42,7 mg/ml	1:14,1	0,4: 1 (SD: 0,2)
Charlotte’s Web CBD Oil	Stanley Brothers	50 mg/ml	Sólo informa CBD	
Sativex	GW Pharmaceutical	52 mg/ml	1:1	
Charlotte’s Web CBD Oil	Stanley Brothers	60 mg/ml	Sólo informa CBD	
Epidiolex*	GW Pharmaceutical	100 mg/ml	Sólo informa CBD	
RSHO Green Label 3G Pure CBD Oil	Hemp Meds	120 mg/gr	Sólo informa CBD	
RSHO Blue Label 3G Pure CBD Oil	Hemp Meds	170 mg/gr	Sólo informa CBD	
RSHO Gold Label 3G Pure CBD Oil	Hemp Meds	240 mg/gr	Sólo informa CBD	

Tabla 6.2. Cannabinoides totales, relación THCt/CBDt y Ácidos/Neutros en los distintos productos obtenidos mediante los métodos estudiados en esta tesina en comparación con los ofrecidos en el mercado internacional y los producidos por ONGs o cultivadores solidarios. (Tomado y modificado de Sedan et al, 2021).

Esta situación pone de relevancia que, para una adecuada caracterización de los derivados de cannabis a emplearse con fines terapéuticos, aceites en este caso, deben tenerse en cuenta la combinación de las relaciones CBDtotal/THCtotal y Ácidos/Neutros con el fin de establecer una mejor orientación sobre la aplicación terapéutica de los aceites obtenidos. En la **Tabla 6.2**, modificada de Sedan et al. (2021), se puede observar una comparación de estos valores entre distintos aceites comerciales, aceites caseros producidos por ONGs o cultivadores solidarios y los aceites obtenidos por los distintos métodos de producción estudiados en este trabajo. Los aceites estudiados en esta tesina se encuentran en rangos de concentración medios a bajos respecto de otras presentaciones comerciales. La principal característica de los aceites producidos por los métodos estudiados es la presencia de cannabinoides ácidos, ausentes en los preparados comerciales.

La extracción diferencial de los cannabinoides observada experimentalmente en el método de obtención por afinidad podría fundamentarse en una polaridad relativa mayor del CBD-A respecto del THC-A teniendo en cuenta que el paso fundamental de este método de obtención está constituido por una extracción líquido-líquido entre dos fases de polaridades diferentes e inmiscibles entre sí (Martínez-Grau & Csáky, 1998). En este sentido, el CBD-A presenta un Log Kow menor, un mayor número de hidrógenos donores disponibles para formar puentes de hidrogeno y una mayor superficie de área polar que las observadas para el THC-A (ChemSrc, 2022), parámetros que fundamentan la mayor polaridad relativa del CBD-A. Por lo tanto, CBD-A presentará una mayor afinidad por la solución hidroalcohólica frente al aceite, viendo así menos favorecido su paso a la fase aceite respecto de lo que ocurre con el THC-A.

De esta forma éste método de extracción ofrece una alternativa interesante de elaboración ya que nos permite obtener un producto más rico en THC-A frente al CBD-A, partiendo de una variedad de cannabis que es rica en CBD-A; con lo cual brinda la posibilidad de diversificar productos.

En cuanto al contenido de terpenos presentes en este aceite se observó un perfil rico en terpenos presentando los 8 terpenos contenidos en las inflorescencias de CAT1 y alcanzando una concentración de terpenos relativamente alta, encontrándose en un nivel intermedio de concentración entre lo observado para la obtención por macerado a temperatura ambiente y macerado con calentamiento a baño de María. Así mismo, este aceite expresa en cuanto a los terpenos mayoritarios una combinación entre uno de los

terpenos mayoritarios de los aceites obtenidos por el método de macerado como el β -Mirceno y otro presente entre los mayoritarios para los aceites obtenidos por el método de extracción alcohólica como el α -Humuleno.

En cuanto al contenido remanente de etanol en el producto final que denominamos aceite lavado, vimos que el proceso de lavado del aceite con agua fue efectivo ya que consiguió disminuir el etanol presente en el aceite crudo de un 0,3% v/v a un 0,02% v/v siendo este último valor menor que el observado en el aceite obtenido por extracción alcohólica (0,05%v/v). Por lo tanto, la ingesta estimada de etanol semanal resultó menor que la estimada en el caso del aceite obtenido por extracción alcohólica; siendo en este caso de entre 0,28 mg y 0,56 mg respecto de los 0,69 a 1,4 mg semanales estimados en los aceites obtenidos por extracción alcohólica.

Así mismo, si consideramos el aceite crudo obtenido por el método de afinidad, con un nivel de etanol del 0,3%, vemos que aun cuando el contenido de etanol remanente es mayor que en el aceite lavado igualmente cumple con los límites establecidos por la ANMAT (Disposición 1206/2002) y la FDA (0,5% a 10%); y presenta una ingesta semanal estimada de entre 4 a 8 mg de etanol. En este sentido debemos notar que las ingestas estimadas de etanol por semana resultan menores, tanto en el caso del aceite crudo como en el caso del aceite lavado, respecto de las estimadas para los dos jarabes para la tos de venta en farmacias establecidas en el **Capítulo 1** (Romilar: 16 – 22 mg en niños, 33 – 44 mg en adultos; Codelasa: 2,9 – 8,5 g en niños y 11,5 – 34,3 g en adultos).

En relación a la estabilidad del aceite lavado, como producto final, al ser almacenado en dos condiciones de temperatura durante varios meses hemos visto que al igual que lo que ocurría con los aceites obtenidos por los otros métodos estudiados los niveles de los cannabinoides presentes en el aceite no varían significativamente en tiempos de almacenamiento relativamente cortos (2 a 3 meses) independientemente de la temperatura a la que se haya almacenado. Mientras que al ser almacenados durante tiempos más largos (7 a 10 meses) se observó una disminución de la concentración de cannabinoides totales y de los cannabinoides mayoritarios (THC-A y CBD-A) respecto del contenido en el aceite recién preparado, mostrando una conservación levemente mejor en heladera. Estos resultados coinciden con lo informado por Politi et al., (2008) y se contraponen con los estudios llevados a cabo por Citti et al., (2016), quién indica descensos en los niveles de cannabinoides a tiempos muy cortos (10 días); lo cual haría

que los aceites de cannabis no fueran productos que pudieran emplearse en tratamientos terapéuticos ya que empezarían a perder su potencia prácticamente de forma inmediata luego de la preparación.

Así mismo, estos aceites presentan una disminución del nivel de terpenos luego de 4 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, no observándose esta disminución al ser conservados en heladera.

Las presentaciones de aceites a base de cannabis preparadas por los usuarios terapéuticos o cultivadores usualmente consisten en goteros con 10 a 30 ml de aceite. Dependiendo del esquema terapéutico empleado estos productos se consumen en su totalidad entre los 30 y 45 días. En este sentido, nuestros resultados indican que en esos tiempos la estabilidad de cannabinoides y terpenos estaría garantizada para cualquiera de los métodos de preparación ya que estamos hablando de tiempos cortos de almacenamiento; siendo deseable su almacenamiento en heladera. Sin embargo, deben tenerse precauciones para aquellos casos donde los aceites fueron preparados de manera casera y guardados por más tiempo (más de 7 meses) antes de consumirlos ya que las concentraciones de los principios activos podrían ser diferentes. Cabe recordar que en este caso estamos hablando de preparaciones caseras donde no se han agregado ningún tipo de estabilizantes o conservantes. En estos casos de producción casera por cualquiera de los métodos resultaría mejor conservar adecuadamente las inflorescencias y realizar la preparación de los aceites, siguiendo siempre el mismo protocolo para el método de elección, a medida que se va consumiendo con el fin de obtener preparados de la misma calidad.

Conclusiones particulares

En este capítulo hemos presentado los resultados de la caracterización de un aceite obtenido con un método diferente de preparación, propuesto por nuestro grupo de trabajo, con el fin de evitar los pasos de evaporación del alcohol con calentamiento y la posibilidad de generar un producto en un tiempo relativamente corto (2 días de procesamiento).

Este proceso nos permitió generar un aceite con un perfil de cannabinoides de concentración cercana a la de los aceites obtenidos por maceración, pero con una

dominancia de cannabinoides diferente a la obtenida en los aceites generados por métodos tradicionalmente empleados. Así mismo, el perfil de terpenos obtenido presentó un buen nivel de concentración; siendo a su vez un perfil rico en los mismos ya que contenía en diferentes proporciones los terpenos contenidos en CAT1.

De esta forma, conseguimos obtener a partir de CAT1 un aceite con niveles y características de los perfiles de cannabinoides y terpenos adecuadas para el uso medicinal con el plus de presentar distinta dominancia en cannabinoides y terpenos respecto de los obtenidos a partir de la misma variedad de cannabis con los métodos tradicionales: extracción alcohólica o macerados. Así mismo, no fue necesario un paso de evaporación o el uso de altas temperaturas para su elaboración, con lo cual se evita el favorecimiento de reacciones de descarboxilación o degradación de los cannabinoides, así como pérdidas por volatilización de los terpenos.

Conclusiones



CONCLUSIONES

La presente tesina es la primera que aborda el estudio y caracterización de los procesos de obtención casera de aceites a base de Cannabis en la Universidad Nacional de La Plata. El uso terapéutico del Cannabis ha avanzado mucho en nuestro país y en el mundo. En Argentina, la sanción en el año 2017 de la Ley 27.350 de Investigación Médica y Científica en Cannabis Medicinal ha proporcionado un escenario donde la investigación científica comenzó a avanzar en diversos aspectos vinculados al Cannabis terapéutico/medicinal. A través de sus decretos reglamentarios se ha llegado a establecer el Registro del Programa Cannabis (REPROCANN). Este es un registro nacional de personas autorizadas al cultivo controlado con fines medicinales y/o terapéuticos. En este sentido, los usuarios, cultivadores y ONGs continúan produciendo derivados de cannabis, tales como aceites, para ser empleados en tratamientos de diversas afecciones y patologías; ya que entre otras cosas, si bien existen algunos productos autorizados para la venta, el mercado farmacéutico no ofrece aun alternativas diversas en cuanto a las características de los derivados de cannabis, que sean de fácil acceso y económicas para la población. Por ello adquiere relevancia el estudio de los diversos métodos de obtención de aceites a base de cannabis empleados tradicionalmente por las ONGs, usuarios y cultivadores; así como el estudio de otros métodos de obtención que pudieran emplearse y la caracterización química de los productos resultantes de dichos procesos.

En este sentido esta tesina parte de la incorporación de los conocimientos y procesos generados o empleados en las organizaciones sociales, para protocolizarlos y profundizarlos con el aporte de conocimiento científico como puntapié inicial de los procesos que lleven a la generación de redes de acceso seguro al cannabis terapéutico/medicinal. De esta manera se aportan herramientas a la sociedad que pueden ser de utilidad para mejorar las prácticas de los usuarios y que pueden llevar a un mejor conocimiento del producto con el que se realizan las terapéuticas que los profesionales médicos acompañantes controlan.

A través del trabajo realizado hemos cumplido los objetivos planteados, aportando datos y desarrollando procesos que colaboran en el avance y desarrollo del Cannabis Terapéutico. Las tareas y determinaciones realizadas me han permitido adquirir experiencia en el diseño experimental, desarrollo de técnicas analíticas, manejo de

material y equipos de laboratorio, escritura de trabajos científicos y trabajo en grupo. En este trabajo hemos avanzado en caracterizar químicamente aceites producidos a través de los métodos habitualmente empleados por las ONGs (extracción alcohólica y macerados en aceite); así como en la propuesta de un método de obtención diferente a éstos y su correspondiente caracterización química. Aprovechando las capacidades analíticas de nuestro grupo de trabajo hemos determinado las similitudes y diferencias en los perfiles de cannabinoides y terpenos presentes en cada uno de los aceites estudiados, así como la determinación de la presencia de etanol cuando fue pertinente y la estimación del consumo semanal al que podría estar expuesto un usuario de cannabis terapéutico. Estos aportes resultan interesantes ya que posibilitan el conocimiento de las clases de productos que se obtienen por uno u otro método, permitiendo así seleccionar la forma de producción más adecuada en función del tipo de aceite que se desea obtener. Así mismo, el método propuesto en esta tesina aporta versatilidad a la producción de aceites a base de cannabis ya que a partir de una misma variedad se pueden obtener aceites de distinta dominancia en cannabinoides y terpenos, dependiendo del método empleado. Este aspecto resulta de impacto también en la sustentabilidad de los cultivos de *Cannabis* sp. con fines medicinales o terapéuticos, ya que podría acotarse el número de variedades diferentes a mantener en cultivo e igualmente conseguir diversidad de productos; con lo cual se reducen los costos de mantenimiento y cuidado de las mismas. Otro aporte fundamental de esta tesina apunta a la estabilidad de los principios activos de estos aceites y a las formas de conservación que pueden resultar adecuadas. La información contenida en este trabajo podrá ser empleada en otros estudios de ciencia básica y/o aplicada que se realicen a futuro por nuestro grupo de investigación u otros grupos.

Finalmente, la caracterización de la presencia de cannabinoides ácidos y terpenos en los distintos preparados aportan datos de corte científico que colaboran en la interpretación del conocimiento empírico de los usuarios y/o cultivadores sobre la mayor o menor efectividad de un aceite preparado por un método determinado para el tratamiento o alivio de una sintomatología o patología en particular. En este sentido debemos recordar que en el cannabis terapéutico el concepto de “efecto séquito” resulta fundamental, y éste está mediado por la cantidad y variedad de principios activos contenidos en los derivados de cannabis.

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

- ✿ Bugvila, C.; Vaccarini, C.; Salas, D.; Malaissi, L.; Ronco, N.; Andrinolo, D.; Sedan, D. Determinación del contenido de fitocannabinoides en aceites producidos de manera casera: Extracción alcohólica vs Macerado en Aceite. Congreso de Cannabis 2021. 2do Congreso Argentino de Cannabis y Salud, 3er Encuentro Americano de Profesionales Expertos en Fitocannabinoides. Chilecito, La Rioja, Argentina. 30 de septiembre al 2 de octubre de 2021.
- ✿ Bugvila, C.; Malaissi, L.; Vaccarini, C.; Salas, D.; Ronco, N.; Andrinolo, D.; Sedan, D. Extracción alcohólica vs Macerado en Aceite, comparación en el contenido de fitocannabinoides. Segunda Expo Cannabis Argentina. CABA. 15 al 17 de octubre de 2021.
- ✿ Vaccarini, C.; Bugvila, C.; Salas, D.; Malaissi, L.; Andrinolo, D. Estudio sobre la velocidad de crecimiento, producción de biomasa seca y de cannabinoides en una variedad de Cannabis sp. utilizando distintas fuentes de luz y determinación de su consumo energético. Primer Encuentro Virtual de Jóvenes Investigadores de AUGM "Proyectando el futuro de la Investigación" Santiago de Chile, Chile, octubre de 2020.
- ✿ Vaccarini, C.A.; Mercado, M.I.; Ponessa, G.I.; Sedan, D.; Andrinolo, D.; Bugvila, C.; Salas, D.; Ronco, N.; Malaissi, L. Histoquímica foliar de tres cepas Argentinas terapéuticas de Cannabis. Contenido de principales cannabinoides en tricomas glandulares. XXXVIII Jornadas Argentinas de Botánica. Entre Ríos, Argentina. Septiembre 2021.
- ✿ Ronco, N.; Bugvila, C.; Vaccarini, C.; Gagliardi, L.; Andrinolo, D. Desarrollo de un Diseño Central Compuesto para la extracción etanólica de cannabinoides en diferentes condiciones experimentales. XI Congreso Argentino de Química Analítica. Corrientes, Argentina. 30 de noviembre al 3 de diciembre del 2021.

Bibliografía

- Ahmed, S. A., Ross, S. A., Slade, D., Radwan, M. M., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2015). *Minor oxygenated cannabinoids from high potency Cannabis sativa L. Phytochemistry*, 117, 194–199.
- ANMAT Disposición 1206/2002. *ESPECIALIDADES MEDICINALES*. Disponible en : http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Disposicion_1206-2002.pdf. Última visita 8/8/2022.
- Brighenti, V., Pellati, F., Steinbach, M., Maran, D., & Benvenuti, S. (2017). *Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type Cannabis sativa L. (hemp)*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 143, 228–236.
- Calvi, L., Pentimalli, D., Panseri, S., Giupponi, L., Gelmini, F., Beretta, G., ... Giorgi, A. (2018). *Comprehensive quality evaluation of medical Cannabis sativa L. inflorescence and macerated oils based on HS-SPME coupled to GC-MS and LC-HRMS (q-exactive orbitrap®) approach*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 150, 208–219.
- Casiraghi, A., Roda, G., Casagni, E., Cristina, C., Musazzi, U., Franzè, S., ... Gambaro, V. (2017). *Extraction Method and Analysis of Cannabinoids in Cannabis Olive Oil Preparations*. *Planta Medica*, 84(04), 242–249.
- ChemSrc, Chem Search Engine. Disponible en: <https://www.chemsrc.com/en/> . Última visita 12/8/2022.
- Citti, C., Ciccarella, G., Braghiroli, D., Parenti, C., Vandelli, M. A., & 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.
- Dawson, D., & Roggen, M. (2021). *Cannabinoid Chemistry of Cannabis*. In *Recent Advances in the Science of Cannabis* (pp. 1-23). CRC Press.
- De Petrocellis L., Di Marzo V. (2009) An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. PhD
- Deidda, R., Avohou, H. T., Baronti, R., Davolio, P. L., Pasquini, B., Del Bubba, M., ... Furlanetto, S. (2019). *Analytical quality by design: development and control strategy for a LC method to evaluate the cannabinoids content in cannabis olive oil extracts*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Devane, W. A., Dysarz, F. 3., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. *Molecular pharmacology*, 34(5), 605-613.

Di Marzo, V. and Piscitelli, F. (2015). *The endocannabinoid system and its modulation by Phytocannabinoids*. *Neurotherapeutics* 12.

Farmacopea Herbal Americana (2014), *Cannabis Inflorescence Quality Control Monograph*. Roy Upton RH: Scotts Valley, California; 2014.

FDA, Food and Drug Administration, Disponible en: [CHAPTER I--FOOD AND DRUG ADMINISTRATION DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, SUBCHAPTER D - DRUGS FOR HUMAN USE, PART 328 OVER-THE-COUNTER DRUG PRODUCTS INTENDED FOR ORAL INGESTION THAT CONTAIN ALCOHOL](#). Último acceso 4/8/2022.

Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). *Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish*. *Journal of the American chemical society*, 86(8), 1646-1647.

Giese, M. W., Lewis, M. A., Giese, L., & Smith, K. M. (2015). *Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis*. *Journal of AOAC International*, 98(6), 1503–1522.

Giovannoni, S. (2021). *Desarrollo de métodos de análisis de terpenos y compuestos terpenoides por cromatografía. Comparación crítica de resultados obtenidos mediante CG y HPLC*. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/118511>. Última visita: 8/8/2022.

Greydanus, D. E., Hawver, E. K., Greydanus, M. M. and Merrick, J. (2013). *Marijuana: current concepts*. *Frontiers in Public Health*. 1-17.

Gross, P. M. (1933). *The "Salting out" of Non-electrolytes from Aqueous Solutions*. *Chemical Reviews*, 13(1), 91-101.

Grotenhermen, F., ElSohly, M., Russo, E., (2002). *Chemical constituents of cannabis. Cannabis and cannabinoids. Pharmacology, toxicology, and therapeutic potential*. Binghamton/New York: Haworth Press. p. 27-36.

Hazekamp, A., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2004). *Quantitative Analysis of Cannabinoids from Cannabis sativa Using 1H-NMR*. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 52(6), 718–721.

Hazekamp, A., Simons, R., Peltenburg-Looman, A., Sengers, M., van Zweden, R., & Verpoorte, R. (2004). *Preparative Isolation of Cannabinoids from Cannabis sativa by Centrifugal Partition Chromatography*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27(15), 2421–2439.

Hazekamp, A., Tejkalová, K., & Papadimitriou, S. (2016). *Cannabis: From Cultivar to Chemovar II—A Metabolomics Approach to Cannabis Classification*. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 202–215. doi:10.1089/can.2016.0017

MacCallum, C. A., & Russo, E. B. (2018). *Practical considerations in medical cannabis administration and dosing*. *European Journal of Internal Medicine*, 49, 12–19.

- McPartland, J. M., & Russo, E. B. (2001). *Cannabis and Cannabis Extracts*. *Journal of Cannabis Therapeutics*, 1(3-4), 103–132.
- Martínez-Grau, M. A., & Csáky, A. G. (1998). *Técnicas experimentales en Síntesis Orgánica*. Ed. Síntesis. Madrid.
- Mechoulam, R., & Ben-Shabat, S. (1999). *From gan-zi-gun-nu to anandamide and 2-arachidonoylglycerol: the ongoing story of cannabis*. *Natural Product Reports*, 16(2), 131–143.
- Mechoulam, R., 1982. *Chemistry of Cannabis*. *Handb. Exp. Pharmacol.* 55, 119–134
- Mechoulam, R. (2016). *Cannabis – the Israeli perspective*. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 27(3).
- Namdar, D., Mazuz, M., Ion, A., & Koltai, H. (2018). *Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in Cannabis sativa derived from inflorescence position along the stem and extraction methods*. *Industrial Crops and Products*, 113, 376–382
- Pacifici, R., Marchei, E., Salvatore, F., Guandalini, L., Busardò, F. P., & Pichini, S. (2018). *Stability of cannabinoids in cannabis FM1 flowering tops and oil preparation evaluated by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 0(0).
- 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*, 160(2), 231–240.
- Pattnaik, F., Nanda, S., Mohanty, S., Dalai, A., Kumar, V., Ponnusamy, S. and Naik, S., 2022. *Cannabis: Chemistry, extraction and therapeutic applications*.
- Pegoraro, C. N., Nutter, D., Thevenon, M., & Ramirez, C. L. (2019). *Chemical profiles of cannabis sativa medicinal oil using different extraction and concentration methods*. *Natural Product Research*, 1–4.
- Pertwee, R.G. (2014). *Handbook of Cannabis*, Oxford: Oxford University Press.
- Politi, M., Peschel, W., Wilson, N., Zloh, M., Prieto, J. M., & Heinrich, M. (2008). *Direct NMR analysis of cannabis water extracts and tinctures and semi-quantitative data on Δ^9 -THC and Δ^9 -THC-acid*. *Phytochemistry*, 69(2), 562–570.
- Ramirez, C. L., Fanovich, M. A., & Churio, M. S. (2018). *Cannabinoids: Extraction Methods, Analysis, and Physicochemical Characterization*. *Studies in Natural Products Chemistry*, 143–173.
- Romano, L.L. & Hazekamp, Arno. (2013). *Cannabis oil: Chemical evaluation of an upcoming cannabis- based medicine*. *Cannabinoids*. 1. 1-11.

- Russo, E. B. (2011). *Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects*. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1344–1364.
- Sedan, D., Vaccarini, C., Demetrio, P., Morante, M., Montiel, R., Saurí, A., & Andrinolo, D. (2021). *Cannabinoid Content in Cannabis Flowers and Homemade Cannabis-Based Products Used for Therapeutic Purposes in Argentina*. *Cannabis and Cannabinoid Research*.
- 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.
- Small, E. (2015). *Evolution and Classification of Cannabis sativa (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization*. *The Botanical Review*, 81(3), 189–294.
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2009). *Phytocannabinoids in Cannabis sativa: recent studies on biosynthetic enzymes*. *Cannabinoids in nature and medicine*. Wiley-VHCA AG, 51-65.
- Ternelli, M., Brighenti, V., Anceschi, L., Poto, M., Bertelli, D., Licata, M., & Pellati, F. (2020). *Innovative methods for the preparation of medical Cannabis oils with a high content in both cannabinoids and terpenes*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113296.
- Vaccarini C. (2020) *Determinación de cannabinoides en distintas estructuras de la planta de Cannabis sativa sp. y derivados de la misma mediante HPLC/UV-DAD*. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/101151>. Última visita: 8/8/2022.
- Verhoeckx, K. C. M., Korthout, H. A. A. J., van Meeteren-Kreikamp, A. P., Ehlert, K. A., Wang, M., van der Greef, J., ... Witkamp, R. F. (2006). *Unheated Cannabis sativa extracts and its major compound THC-acid have potential immuno-modulating properties not mediated by CB1 and CB2 receptor coupled pathways*. *International Immunopharmacology*, 6(4), 656–665.
- Zekič, J., & Križman, M. (2020). *Development of Gas-Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Cannabinoids and Terpenes in Hemp*. *Molecules*, 25(24), 5872.
- Zuardi, A. W., Crippa, J. A. S., Hallak, J. E. C., Moreira, F. A., & Guimarães, F. S. (2006). *Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(4), 421–429.