

Perfil de fitocannabinoides en muestras derivadas al Laboratorio de control de calidad de la ENyS

Phytocannabinoid profile in samples sent to the ENyS quality control laboratory

Autores

Enrique Martins 1,2
Jorge E. Colman Lerner 3,4,5,6
Lautaro Burgueño 1,2,6
Liliana Bayarres 1,2,6
Silvia Kochen 1,2,5,6

¹Estudios en Neurociencias y Sistemas Complejos, ²Hospital El Cruce, ³Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas "Dr. Jorge J. Ronco", ⁴Universidad Nacional de La Plata, ⁵Universidad Nacional Arturo Jauretche, ⁶CONICET.

Resumen

Las plantas de cannabis se clasifican en quimiotipos, según las concentraciones relativas de tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD). El quimiotipo I tiene alto contenido de THC (sativa dominante); el quimiotipo II tiene un contenido aproximado 1:1 de THC:CBD (híbrida) y el quimiotipo III con CBD como constituyente predominante (indica dominante). El objetivo fue clasificar las muestras recibidas en el Laboratorio de control de calidad de la ENyS según su quimiotipo. El análisis de cannabinoides se realizó mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas y se calculó la razón THC/CBD. Se analizaron 121 muestras de tejido vegetal, que tuvieron un fuerte predominio de quimiotipo I (75%) y 139 muestras de aceite, con 41% de quimiotipo I, 40% de quimiotipo II y 19% de quimiotipo III.

Palabras claves: Cannabis, Marihuana medicinal, Control de calidad.

Abstract

Cannabis plants are classified into chemotypes, based on the relative concentrations of tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). Chemotype I has high THC content (sativa dominant); chemotype II has an approximate 1:1 content of THC:CBD (hybrid) and chemotype III has CBD as the predominant constituent (indica dominant). Our aim was to classify the samples received at the ENyS Quality Control Laboratory according to their chemotype. Cannabinoid analysis was performed using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry and the THC/CBD ratio was calculated. 121 plant tissue samples were analyzed, which had a strong predominance of chemotype I (75%) as well as 139 oil samples, which rendered 41% chemotype I, 40% chemotype II and 19% chemotype III.

Keywords: Cannabis, Medical marijuana, Quality control.

Contacto:

Enrique Martins
enriqueftmartins@gmail.com

1 Introducción

En la actualidad, cerca de 50 países han legalizado el uso medicinal del cannabis. En Argentina, la [Ley 27.350](#) establece un marco regulatorio para la investigación médica y científica del uso medicinal, terapéutico y/o paliativo de la planta de cannabis y sus derivados así como la [Ley 27.699](#) establece el marco regulatorio para el desarrollo de la industria del cannabis medicinal y el cáñamo industrial (1).

El cannabis es conocido por sus metabolitos secundarios, incluidos los cannabinoides y los terpenos. Los cannabinoides pueden interactuar con el sistema endocannabinoide y muchos tienen propiedades medicinales y/o psicoactivas (2). Dos de los más conocidos son el ácido Δ -9-tetrahidrocannabinol (THCA) y el ácido cannabidiólico (CBDA), que se convierten en las formas neutras THC y CBD al ser expuestos a temperaturas superiores a 150°C (3). La gran variabilidad de sus características quimiotípicas, inspiró la división del cannabis en grupos reconocidos (o quimiotipos) dentro del género, dependiendo de las diferentes concentraciones de los principales cannabinoides (THC y CBD), a saber, tipo I: las plantas con un alto contenido de THC (sativa dominante); tipo II: cannabis medicinal con un contenido aproximado 1:1 de THC:CBD (híbrida) y tipo III: con CBD como constituyente predominante (indica dominante) (4).

Los productos medicinales basados en cannabis (PMBC) existen en forma purificada o en forma de complejas mezclas de cientos de moléculas, en múltiples formulaciones como aceites, tinturas, cápsulas, cremas, y otras, y además con múltiples formas de administración. Esta heterogeneidad es una de las causas de la dificultad para el estudio de la eficacia de los tratamientos con estos productos, debido a las diferencias en su farmacodinamia y su farmacocinética (5). Sin embargo, existe fuerte evidencia de la eficacia PMBC con quimiotipos definidos, para el tratamiento de condiciones definidas como dolor crónico o neuropático, dolor relacionado a neoplasias, epilepsia refractaria, esclerosis múltiple y náusea relacionada a la quimioterapia (5-8). Además, hay gran cantidad de evidencia de buenos resultados reportados en diferentes publicaciones a partir de la respuesta en estudios observacionales de pacientes, en condiciones que padecen millones de personas, como ansiedad, depresión, alteraciones del sueño y artritis (5). En la actualidad se desarrollan diferentes investigaciones a través de estudios aleatorizados y controlados para refrendar o refutar la evidencia del mundo real (9-10).

El Hospital El Cruce, en asociación con la Universidad Arturo Jauretche (UNAJ) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), lanzó en 2020 el Servicio Tecnológico de Alto Nivel (STAN), para realizar el control de calidad de PMBC. Una parte mayoritaria de este servicio se realiza en el Centro de Medicina Traslacional (CEMET) y usa la tecnología de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem para la cuantificación de la concentración de 5 fitocannabinoides en muestras de aceites, resinas, tinturas y tejido vegetal, entre otras. Además, se ofrecen análisis que se realizan en otros centros de la UNAJ, otras Universidades Nacionales o del CONICET, como el perfil de terpenos o el estudio de contaminantes tales como metales pesados, solventes y pesticidas. Las muestras recibidas son derivadas por productores o usuarios de PMBC que solicitan la cuantificación de fitocannabinoides.

El objetivo de esta comunicación es caracterizar, mediante su agrupación en quimiotipos, el perfil de fitocannabinoides de las muestras derivadas al STAN entre febrero de 2021 y agosto de 2023.

2 Materiales y métodos

Todas las muestras derivadas al STAN fueron extraídas con metanol en frío, diluidas y analizadas por cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC MSMS) con un equipo Thermo Fisher Vanquish focused- TSQ Quantum Access MAX, columna C-18 100 mm, 2,1 mm, 2,6 μ m.

Los resultados se expresan como CBD total y THC total en mg por gramo de muestra (mg/g), que representan, respectivamente, la suma de concentraciones de cannabidiol (CBD) y ácido cannabidiólico (CBDA) y la suma de tetrahidrocannabinol (THC) y ácido tetrahidrocannabinólico (THCA). Se calculó la razón THC/CBD con la fórmula 1 y para simplificar el análisis se dividió el universo de resultados en quimiotipos I: razón THC/CBD > 2, II (sativa dominante): razón THC/CBD 0,5 - 2 (híbrida) y III: razón THC/CBD < 0,5 (indica dominante) (11). Cuando alguno de los fitocannabinoides tuvo un valor menor a su límite de cuantificación, se asignó un valor de concentración obtenido con la fórmula 2.

Fórmula 1. Razón THC/CBD = $([THC] + [THCA \cdot 0,877]) / ([CBD] + [CBDA \cdot 0,877])$

Formula 2. Concentración asignada = $\sqrt{LC/2}$ donde LC es el límite de cuantificación del fitocannabinoide.

Los datos se recolectaron desde febrero de 2021, cuando estuvo disponible el análisis de los fitocannabinoides ácidos (THCA y CBDA). Se incluyeron en el análisis solo muestras de aceite y de tejido vegetal, ya que los otros tipos de muestras representan menos del 1% del total.

3 Resultados

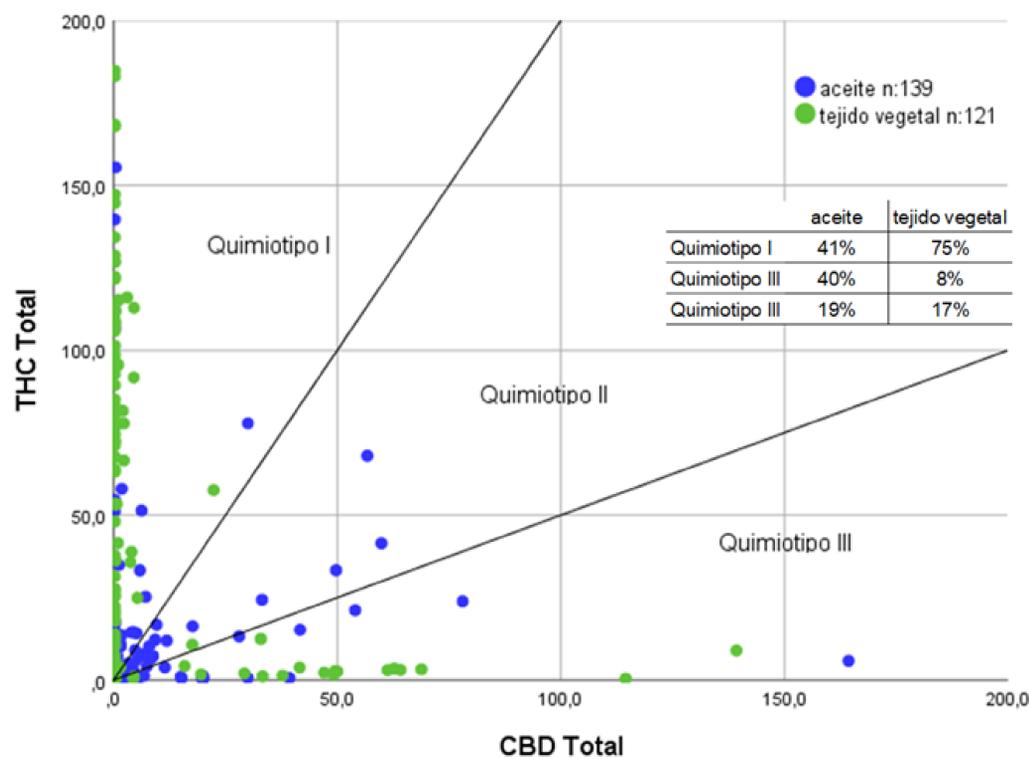
Se analizaron 260 muestras, 121 de tejido vegetal y 139 de aceites. En la tabla 1 se muestran, junto a otros parámetros, la mediana y cuartiles de THC total, CBD total y la razón THC/CBD, para muestras de aceite y de tejido vegetal. El porcentaje de muestras de aceites con CBD total por debajo del límite de cuantificación (LC) fue de 36,7%, y 49,3% tuvieron valores menores a 1 mg/g. En el caso de THC total, el porcentaje de muestras de aceite por debajo del LC fue de 20,1% y con valores menores a 1 mg/g fue de 33,8%. En 15,9% de los aceites analizados, la suma de fitocannabinoides no superó la concentración de 1 mg/g.

El gráfico 1 muestra una dispersión de puntos entre CBD total y THC total para muestras de aceite y tejido vegetal, en el que se puede inferir la razón THC/CBD para cada muestra, además contiene una tabla anidada en la que se muestra la distribución de quimiotipos.

Tabla 1. Estadística descriptiva de la concentración de cannabinoides en aceite y tejido vegetal.						
Material	Aceite (n: 139)			Material vegetal (n: 121)		
Analito/razón	THC total	CBD total	Razón THC/CBD	THC total	CBD total	Razón THC/CBD
Media	14,3	7,4	30,5	62,9	12,6	161,1
DE	34,8	18,7	116,6	73,8	47,4	183,3
Mínimo	0,4	0,3	0,02	0,4	0,3	0,004
Máximo	294,9	164,3	1064,8	589,7	471,4	660,8
Primer cuartil	0,6	0,3	0,7	3,9	0,3	2,0
Mediana	2,6	0,9	1,5	48,1	0,3	71,9
Tercer cuartil	11,9	5,2	7,5	100,0	3,0	312,6

THC: tetrahidrocannabinol, CBD: cannabidiol.

Gráfico 1. Dispersión de puntos entre THC total y CBD total para muestras de aceite y de tejido vegetal, que incluye una tabla anidada con el porcentaje de muestras de cada quimiotipo, para cada tipo de muestra.



THC: tetrahidrocannabinol, CBD: cannabidiol.

4 Discusión

Los valores medios de concentración de fitocannabinoides en los aceites analizados son bajos si se comparan con productos farmacéuticos industriales como Epidiolex (CBD purificado 100 mg/ml) o Dronabinol (análogo sintético de THC en cápsulas de 2,5 mg, 5 mg y 10 mg), sin embargo, son comparables a los publicados en estudios realizados sobre muestras de origen análogo en Rosario, La Plata y Córdoba (12-14). Por otro lado, es importante destacar que varios estudios preclínicos y clínicos en diferentes áreas de enfermedades, han mostrado una mayor eficacia de extractos full spectrum (espectro completo) contrastado con THC o CBD solos (15), y aunque todavía se esperan resultados de estudios aleatorizados y controlados que den un mayor respaldo a estos resultados, existe un gran cuerpo de evidencia de estudios observacionales, resultados reportados por pacientes y evidencia del mundo real que demuestra que el cannabis tiene numerosos efectos terapéuticos y gran potencial para aplicación en clínica además de ser altamente personalizable(5). En el reporte de Rosario los autores destacan que casi 45% de las muestras de aceites tenían valores menores a 1 mg/g, mientras que, en la presente comunicación, la mediana de concentración es baja aun cuando una proporción menor (casi 16%) de los aceites no superan esa marca. En el estudio platense, también concluyeron que la mayoría de las muestras tenía concentraciones bajas a medias de fitocannabinoides, pero a diferencia del presente trabajo donde se encontró una proporción más repartida de quimiotipos, los autores reportaron un predominio amplio de quimiotipo I. La diferencia entre las proporciones de quimiotipos entre las muestras de tejido vegetal y aceites podrían indicar que, para la preparación de aceites, se seleccionan plantas con mayor contenido de CBD, o también que se obtengan aceites a través de la mezcla de extractos, favoreciendo la presencia de CBD en el producto final.

5 Conclusión

En las muestras de tejido vegetal recibidas se encontró un fuerte predominio de quimiotipo tipo I, mientras que en las muestras de aceite hubo resultados más balanceados entre los quimiotipos I y II, y una proporción menor, pero no despreciable de quimiotipo III. Estos resultados permiten obtener una caracterización inicial del perfil de fitocannabinoides en las muestras recibidas, aunque todavía es insuficiente ya que no incluye quimiotipos con mayor predominancia de otros fitocannabinoides además de THC y CBD. En ese sentido, en el STAN ya se está trabajando para ampliar el espectro de análisis de fitocannabinoides para ofrecer en un futuro cercano, una caracterización más completa del perfil de las muestras recibidas.

6 Bibliografía

1. Cannabis Conicet ¿por qué una empresa de Cannabis? [Internet] Conicet [citado 12 octubre 2023] Disponible en: <https://www.conicet.gov.ar/cannabis/por-que-esta-empresa/>
2. ElSohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life sciences*. 2005; 78(5):539–48. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.011>
3. Smith CJ, Vergara D, Keegan B, Jikomes N (2022) The phytochemical diversity of commercial Cannabis in the United States. *PLoS ONE* 17(5): e0267498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267498>
4. Salamone S, Waltl L, Pompignan A, Grassi G, Chianese G, Koeberle A, Pollastro F. Phytochemical Characterization of Cannabis sativa L. Chemotype V Reveals Three New Dihydrophenanthrenoids That Favorably Reprogram Lipid Mediator Biosynthesis in Macrophages. *Plants (Basel)*. 2022 Aug 16;11(16):2130. doi: 10.3390/plants11162130. PMID: 36015434; PMCID: PMC9414986.
5. Schlag AK, O'Sullivan SE, Zafar RR, Nutt DJ. Current controversies in medical cannabis: Recent developments in human clinical applications and potential therapeutics. *Neuropharmacology*. 2021 Jun 15;191:108586. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108586. Epub 2021 May 1. PMID: 33940011.
6. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Population Health and Public Health Practice; Committee on the Health Effects of Marijuana: An Evidence Review and Research Agenda. *The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The Current State of Evidence and Recommendations for Research*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2017 Jan 12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK423845/> doi: 10.17226/24625
7. National Institute for Health and Care Excellence. Cannabis-based medicinal products [Internet]. [London]: NICE; 2019 [updated 2021 Mar; cited 2023 oct 12]. (NICE guideline [NG144]). Disponible en: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng144>
8. Kochen S, Villanueva M, Bayarres L, Daza-Restrepo A, Gonzalez Martinez S, Oddo S. Cannabidiol as an adjuvant treatment in adults with drug-resistant focal epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2023 Jul;144:109210. doi: 10.1016/j.yebeh.2023.109210. Epub 2023 May 15. PMID: 37196452.
9. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 29 Mar 2021. Identifier NCT04827992, Evaluation of Medical Cannabis and Prescription Opioid Taper Support for Reduction of Pain and Opioid Dose in Patients With Chronic Non-Cancer Pain; 15 Dic 2022 [citado 12 oct 2023]; [cerca de 6 pantallas]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04827992?intr=Medical%20Cannabis&page=1&viewType=Table&limit=100&rank=19>
10. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 03 Mar 2019. Identifier NCT03944447, Outcomes Mandate National Integration With Cannabis as Medicine (OMNI-Can); 02 Jun 2022 [citado 12 oct 2023]; [cerca de 6 pantallas]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03944447?intr=Medical%20Cannabis&page=1&viewType=Table&limit=100&rank=23>
11. Pacifico, D., Miselli, F., Carboni, A. et al. Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of Cannabis sativa L. *Euphytica* 160, 231–240 (2008). Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9543-y>
12. Esteban Serra Aceites medicinales de Cannabis que circulan en nuestro país. Desafíos de una situación compleja [Internet] Argentina.gob.ar. [citado 12 octubre 2023] Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_cannb_esteban_serra.pdf
13. Sedan D, Vaccarini C, Demetrio P, Morante M, Montiel R, Saurí A, Andrinolo D. Cannabinoid Content in Cannabis Flowers and Homemade Cannabis-Based Products Used for Therapeutic Purposes in Argentina. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2023 Feb;8(1):197–206. doi: 10.1089/can.2020.0117. Epub 2021 Mar 26. PMID: 33998894.
14. Manzo PG, Martín SE, Uema SA, Charles G, Montero Bruni F, et al. Caracterización de la problemática del uso terapéutico del aceite de Cannabis en Córdoba, Argentina; Universidad Nacional Córdoba; Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba; 79; 2; 6-7-2022; 123-131
15. Christensen C, Rose M, Cornett C, Allesø M. Decoding the Postulated Entourage Effect of Medicinal Cannabis: What It Is and What It Isn't. *Biomedicines*. 2023 Aug 21;11(8):2323. doi: 10.3390/biomedicines11082323. PMID: 37626819; PMCID: PMC10452568.