

Desde la legalización del uso y la investigación del Cannabis con fines medicinales se ha incrementado notablemente la investigación científica y clínica de la planta y de sus derivados. También ha aumentado la oferta de aceites y otros extractos de Cannabis que deben ser analizados para verificar si su composición se corresponde a la indicada por el médico. Principalmente, porque las plantas son organismos que responden a los cambios ambientales y las condiciones del cultivo, modificando su composición química. Esto es relevante en Cannabis porque contienen más de 500 compuestos y el contenido de algunos de ellos, como el CBD y el THC, impactan en sus propiedades medicinales. En el caso de los aceites, su olor característico está dado por compuestos denominados terpenos. El aceite de Cannabis tiene unos 200 terpenos, muchos con actividad farmacológica conocida y otros en investigación. Debido a la composición compleja de los aceites de Cannabis, es necesario conocer su contenido mediante análisis químicos rigurosos para asegurar un uso adecuado. Aquí describimos dos métodos para analizar los terpenos en estos aceites, que pueden ser de gran utilidad a otros laboratorios.

CONCEPTOS CLAVES:

Qué se sabe sobre el tema

- La planta de Cannabis contiene más de 500 fitoquímicos, incluyendo cannabinoides, flavonoides y terpenos
- Los terpenos son ampliamente investigados por su actividad farmacológica per se y por ser los constituyentes volátiles mayoritarios de los aceites de Cannabis
- Conocer el perfil de terpenos de los aceites de Cannabis es fundamental para controles de calidad y para las investigaciones científicas y clínicas de sus propiedades medicinales

Qué aporta este trabajo

- Hay numerosos métodos para el análisis de terpenos. Sin embargo, no hay una recomendación oficial, aunque se acepta que la cromatografía gaseosa (GC) es el método más usado en todo el mundo por su sensibilidad y reproducibilidad. En este artículo se presentan los detalles de dos métodos optimizados para lograr la identificación y cuantificación de terpenos del aceite de Cannabis por GC.

Recibido: 2022-12-01 Aceptado: 2023-04-15

DOI: <http://dx.doi.org/10.31053/1853.0605.v80.n2.39593>



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

© Universidad Nacional de Córdoba

Métodos cromatográficos optimizados para la identificación y cuantificación de terpenos en aceite de Cannabis sativa de uso medicinal

Leonardo Bajda¹, María Marcela Amaro¹, Guillermina Bongiovanni^{1,2}.

1- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN). Universidad Nacional del Comahue; Neuquén Capital; Argentina

2- Universidad Nacional del Comahue. Facultad de Ciencias Agrarias: Río Negro; Argentina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7877-2586>. Correo de contacto: guillermina.bongiovanni@probien.gob.ar

RESUMEN

Introducción: Cannabis sativa es una planta con gran número de principios activos, por lo que la lista de sus usos terapéuticos se está ampliando. En este sentido, son numerosas las investigaciones científicas y clínicas de sus derivados. Entre ellos, los terpenos son los compuestos volátiles mayoritarios de los aceites y su participación en las propiedades medicinales del Cannabis también está siendo estudiada. Así, a medida que más países contemplan la legalización y autorización del cannabis medicinal, el número de laboratorios de extracción y análisis de cannabis y sus derivados aumenta para satisfacer la demanda, requiriéndose herramientas analíticas adecuadas. **Metodología:** En respuesta a numerosas consultas de médicos, investigadores y de laboratorios de análisis y de peritajes, el laboratorio de cromatografía del PROBIEN ha optimizado dos métodos para el análisis de terpenos en aceite de Cannabis por la técnica de cromatografía gaseosa (GC-FID). Se describen los métodos usando las columnas HP-5 e Innowax. Se empleó el método del estándar externo para la determinación cuantitativa de β -Pinenol, Myrceno, p-Cimeno, Limoneno, Linalool, α -Terpineol, Nerol y Geraniol. **Resultados:** se observó una buena separación de picos y reproducibilidad, apropiadas para la identificación y cuantificación de los principales terpenos en extractos de Cannabis. La relación área/concentración fue lineal en el rango de 0,0005 a 2,0 mg/ml. **Conclusión principal:** los métodos descritos permiten la identificación y cuantificación de los terpenos mayoritarios en aceite de Cannabis para un control de calidad adecuado.

Palabras claves: terpenos; cromatografía gaseosa; control de calidad; cannabis sativa.

Optimized chromatographic methods for the identification and quantification of terpenes in Cannabis sativa oil for medicinal use

ABSTRACT

Introduction: Cannabis sativa is a plant species with numerous active principles, so the list of its therapeutic uses is expanding. In this regard, there are numerous scientific and clinical investigations of its derivatives. Among them, terpenes are the major volatile compounds of the oils and their participation in the medicinal properties of Cannabis is also being studied. Thus, as more countries contemplate the legalization and authorization of medical cannabis, the number of cannabis extraction and analysis laboratories is increasing to meet the demand, requiring adequate analytical tools. **Methodology:** In response to numerous inquiries from physicians, researchers, and analytical and forensic laboratories, the PROBIEN's chromatography laboratory has optimized two methods for the analysis of terpenes in Cannabis oil by gas chromatography technique (GC-FID). The methods are described using HP-5 and Innowax columns. The external standard method was used for the quantitative determination of β -Pinenol, Myrcene, p-Cymene, Limonene, Linalool, α -Terpineol, Nerol and Geraniol. **Results:** good peak separation and reproducibility were observed, appropriate for the identification and quantification of the main terpenes in Cannabis extracts. The area/concentration ratio was linear in the range of 0.0005 to 2.0 mg/ml. **Main conclusion:** The described methods allow the identification and quantification of the major terpenes in Cannabis oil for an adequate quality control.

Keywords: terpenes; gas chromatography; quality control; cannabis sativa.

Métodos cromatográficos optimizado para a identificação e quantificação de terpenos em óleo de *Cannabis sativa* para uso médico

RESUMO

Introdução: A *Cannabis sativa* é uma planta com um grande número de princípios ativos, por isso a lista de seus usos terapêuticos está se expandindo. A este respeito, existem numerosas investigações científicas e clínicas de seus derivados. Entre eles, os terpenos são os principais compostos voláteis dos óleos e seu envolvimento nas propriedades medicinais da *Cannabis* também está sendo estudado. Assim, à medida que mais países contemplam a legalização e autorização da *cannabis* medicinal, o número de laboratórios de extração e teste de *cannabis* está aumentando para atender à demanda, exigindo ferramentas analíticas apropriadas. **Metodologia:** Em resposta a numerosas consultas de médicos, pesquisadores e laboratórios analíticos e especializados, o laboratório de cromatografia PROBIEN otimizou dois métodos para a análise de terpenos em óleo de *Cannabis* pela técnica de cromatografia de gás (GC-FID). Os métodos são descritos usando as colunas HP-5 e Innnowax. O método padrão externo foi utilizado para a determinação quantitativa de β -Pinene, Myrcene, p-Cymene, Limonene, Linalool, α -Terpineol, Nerol e Geraniol. **Resultados:** Foram observados bons picos de separação e reprodutibilidade, adequados para a identificação e quantificação dos principais terpenos em extratos de *cannabis*. A relação área/concentração foi linear na faixa de 0,0005 a 2,0 mg/ml. **Conclusão principal:** Os métodos descritos permitem a identificação e quantificação dos principais terpenos no óleo de *Cannabis* para um controle de qualidade certo.

Palavras-chave: terpenos; cromatografia de gás; calidad; controle de qualidade.

INTRODUCCIÓN

La especie *Cannabis sativa* L. pertenece a la familia de plantas Cannabaceae, incluyendo al menos tres subespecies: *Sativa*, *Indica* y *Ruderalis*. El *cannabis* es una de las plantas medicinales más antiguas del mundo⁽¹⁾ pero, por su asociación con Marihuana (como se conoce comúnmente a las variedades de *Cannabis* con alto contenido de delta-9-tetrahidrocannabinol o THC, con efecto psicotrópico y de uso ilegal en muchos países), la investigación científica y clínica se ha profundizado recién después de su legalización como planta para usos medicinales. Estas investigaciones han puesto de manifiesto que el *Cannabis* y sus derivados tienen actividades biológicas con potenciales aplicaciones terapéuticas para tratar la epilepsia, la ansiedad, la depresión, los tumores, el cáncer, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, entre muchas otras^(2,3). En coherencia con toda esta evidencia, cada vez son más las jurisdicciones de todo el mundo que legalizan el acceso de los pacientes al *Cannabis* con fines medicinales. Esta tendencia comenzó con la legalización del consumo de *Cannabis* medicinal por votación popular en California en 1996, y con una decisión judicial en Canadá en 2000, que decía que las leyes que negaban a los pacientes el acceso al *Cannabis* para uso médico violaban sus derechos humanos. En diciembre de 2020, la Comisión de Estupefacientes de las Naciones Unidas (CND), órgano encargado de la política de drogas de la ONU, volvió a clasificar el *Cannabis* y la resina de *Cannabis* en una lista internacional que reconoce su valor médico⁽⁴⁾. Bajo este nuevo marco legal, las investigaciones científicas y clínicas están aportando gran cantidad de datos que convalidan su uso etnomedicinal, así como evidencias de

nuevas bioactividades. Pero también surgen evidencias de interacciones con otros fármacos y de sus efectos secundarios. Esto pone en relieve, la importancia de profundizar los estudios de las propiedades de la planta y de sus derivados. Es por esto que, tras ensayos clínicos exhaustivos y evaluaciones su seguridad, eficacia y efectos adversos, recién en 2010 se aprobó el primer fármaco con THC (delta-9-tetrahidrocannabinol) y CBD (cannabidiol) obtenidos de la planta de *Cannabis* por un laboratorio británico. En 2018 fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, USA) un fármaco con CBD altamente purificado para el tratamiento de trastornos convulsivos raros como los Síndromes de Lennox-Gastautde y de Dravet⁽⁵⁾.

Argentina dictó la Ley N° 27350 (aprobada en 2017 y reglamentada en 2020) para permitir la "Investigación médica y científica del uso medicinal de la planta de *Cannabis* y sus derivados": Esta Ley creó el "Programa nacional para el estudio y la investigación del uso medicinal de la planta de *Cannabis*, sus derivados y tratamientos no convencionales" y el "Registro del Programa de *Cannabis* (REPROCANN)"⁽⁶⁾, para que los y las pacientes con indicación médica para el uso de derivados de la planta de *Cannabis* accedan, a través del cultivo controlado, a la planta de *Cannabis* y sus derivados. Así, la Ley 27350⁽⁷⁾, varias Resoluciones y Disposiciones y la reciente Ley 27669⁽⁸⁾ (aún no reglamentada), no solo impulsaron la investigación básica y clínica de la genética, botánica, metabolómica, bioactividades y toxicología de *Cannabis sativa*, sino también el autocultivo de plantas de *Cannabis* para la obtención de sus derivados por parte de quienes estuvieran inscriptos en REPROCANN. Lamentablemente, el incremento en el número de autocultivadores trae aparejado el uso de extractos

de *Cannabis* extraídos por ellos mismos (no siempre capacitados) y sin controles de calidad, excepto que acudan a un laboratorio habilitado, como el del PROBIEN para su análisis. Esto se asocia a otra problemática que repercute fuertemente en términos de salud pública. Porque, aunque exista una patología para la cual, de acuerdo a la evidencia científica y clínica, el médico indique un tratamiento con un determinado contenido de THC/CBD, sin un análisis adecuado, el paciente no tiene la certeza de haber obtenido un aceite con la dosis que le fue indicada por su médico. Incluso, ha sido constatado en nuestro laboratorio y en otros del país, que algunos derivados de *Cannabis* (generalmente aceites obtenidos por terceros) no muestran cantidades detectables de CBD⁽⁹⁾. Debido a que el REPROCANN solo habilita el uso, no hace controles ni seguimientos, los efectos terapéuticos buscados, no siempre son encontrados porque la prescripción médica solo indica las cantidades de THC y CBD, sin tener en cuenta otros componentes del aceite, que podrían modificar los efectos terapéuticos o interferir con otros fármacos. El problema se magnifica cuando no media una indicación y vigilancia médica (automedicación) en el uso de estos aceites de *Cannabis*. Este hecho se pone de manifiesto en los resultados de una encuesta publicada en agosto de 2022, con más de 64000 participantes, el 17,2% de los encuestados responde que utiliza *Cannabis* con fines medicinales⁽¹⁰⁾. Entre esta población, el 25,2% de los/as usuarios/as reportan que acceden al *Cannabis* a través del cultivo por cuenta propia, el resto lo adquiere de terceros. A pesar de que la salud es el motivo que principalmente orienta el uso medicinal, solo el 18,1% de estos/as usuarios/as reciben acompañamiento médico en su tratamiento con *Cannabis*. Por otro lado, esta encuesta no indaga respecto del conocimiento, o la

necesidad de saber la composición del extracto cannábico que estos consumidores utilizan. La importancia de este conocimiento radica en el hecho de que, aunque los efectos terapéuticos y la seguridad del CBD como droga pura han sido aceptadas para el tratamiento de algunas formas raras de epilepsia, el Cannabis contiene más de 500 compuestos, tales como cannabinoides, terpenos y flavonoides⁽¹¹⁾ y aún no hay suficientes evidencias científicas y clínicas que muestren la eficacia farmacológica de los mismos por separado o en combinación y es escasa la información sobre interacciones farmacológicas y el riesgo de efectos adversos que pueden limitar su uso en determinadas poblaciones de pacientes^(12,13).

Además, por tratarse de una planta, la proporción de los metabolitos bioactivos en los extractos puede modificarse por numerosas variables. Entre ellas, genética de la planta, variedad adaptada a un ambiente, uso de plaguicidas, método de secado (y otras postcosechas), método de extracción (incluyendo calidad de los solventes y capacidades instrumentales y del personal), solvente de dilución, estado de conservación, etc. Esto lleva a la posibilidad de numerosos "extractos de Cannabis" que tendrían diferentes efectos terapéuticos, diferentes interacciones con otros fármacos y diferentes perfiles de efectos secundarios⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Por ejemplo, aunque no hay evidencias claras al respecto, algunos estudios sugieren que los compuestos no-cannabinoides como los terpenos del Cannabis, además de sus propiedades aromáticas, antioxidantes, antiinflamatorias, antidepresivas, analgésicas⁽¹⁷⁾, podrían modular la eficacia terapéutica de los cannabinoides.

En conclusión, las bases científicas y estudios clínicos de las propiedades medicinales del Cannabis han sido largamente demoradas por la prohibición de su uso. Desde su legalización reciente, numerosas evidencias sugieren que el Cannabis y sus derivados puros o en combinación podrían tener numerosas aplicaciones terapéuticas. Aunque la Ley argentina y de otros países permite el autocultivo para la obtención de plantas y derivados del Cannabis bajo prescripción médica, son numerosos los casos de automedicación y usos de aceites de Cannabis de composición desconocida. Para lograr un verdadero avance en el conocimiento de las propiedades medicinales del Cannabis, se requieren ensayos clínicos exhaustivos y evaluaciones de su seguridad, eficacia y efectos adversos. Como pieza fundamental de estos ensayos y para proteger la salud de sus usuarios, es menester estandarizar los procesos de cultivo, de extracción y contar con métodos analíticos rigurosos que determinen los constituyentes del derivado cannábico que se esté ensayando o consumiendo, siempre bajo un estricto control médico. En este sentido, numerosas evidencias sugieren que el conocimiento del perfil de terpenos es fundamental en la perspectiva de una terapia determinada, para realizar estudios que permitan evaluar objetivamente los beneficios del tratamiento, así como el impacto en la calidad de vida⁽¹⁶⁾.

En el Laboratorio de Cromatografía del PROBIEN (Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas, CONICET-Universidad Nacional del Comahue) funciona un Servicio Técnico de Alto Nivel (STAN ST4856 "Análisis cuantitativo de cannabinoides y terpenos en aceites; tinturas y extractos de Cannabis") que ha adquirido una gran experiencia en el tema, en los últimos años. Con base en esa experiencia y a partir del requerimiento de otros laboratorios de control de calidad de extractos de Cannabis, así como de laboratorios que pretenden brindar este servicio, se detectó la necesidad de contar con un método para el análisis de terpenos. El objetivo de este trabajo es detallar dos métodos optimizados para la identificación y cuantificación de terpenos del Cannabis por cromatografía gaseosa, para hacerlos disponibles a otros laboratorios analíticos.

MATERIALES Y METODOLOGÍAS

Las muestras de aceite de Cannabis analizadas durante la optimización de estos métodos fueron obtenidas por donaciones de asociaciones de cannabicultores.

Identificación y cuantificación de terpenos por GC-FID:

En este estudio se utilizó un Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama Agilent (GC-FID 7890B), usando las columnas HP-5 e Innnowax para la optimización del método analítico para la identificación y cuantificación de terpenos presentes en aceites de Cannabis. Se ensayaron numerosas condiciones, de acuerdo a lo descrito en la bibliografía existente para elaborar dos métodos analíticos apropiados para las características de las columnas utilizadas⁽¹⁸⁻²⁵⁾. Para seleccionar estos métodos, también se consideraron los tiempos de retención de estándares disponibles comercialmente, tiempo que demanda el análisis completo de la muestra, resolución de los picos del cromatograma, linealidad de las curvas de calibración y reproducibilidad. Se empleó el método del estándar externo para la determinación cuantitativa. Para las curvas de calibración, se prepararon soluciones de los estándares empleando metanol grado HPLC como diluyente, en un rango de 0,0005 a 2,0 mg/ml. Este rango fue seleccionado teniendo en cuenta la sensibilidad del equipo (límite de detección y lecturas por debajo de la saturación del detector), la concentración de los terpenos en las muestras de aceites de Cannabis que fueron analizadas para optimizar los métodos de análisis en nuestro laboratorio y las concentraciones reportadas en la bibliografía^(16,18). En este sentido, las muestras de aceites fueron diluidas 20 veces para quedar comprendidas en este rango de concentraciones. Todas las muestras fueron filtradas con filtros de jeringa con membrana de nylon (25 mm de diámetro; 0,2 µm de poro), para su inmediato análisis cromatográfico. De acuerdo a la bibliografía y la experiencia en nuestro Laboratorio, por su abundancia en aceites de Cannabis y su relevancia farmacológica, se seleccionaron los siguientes terpenos como estándares: β-Pineno, Myrceno, p-

Cymeno, Limoneno, Linalool, α-Terpineol, Nerol y Geraniol^(16,26). Los mismos se identificaron y cuantificaron con métodos diferentes, mediante la inyección de las soluciones de cada estándar preparadas para la calibración y el registro de los tiempos de retención. Finalmente, se seleccionaron los siguientes métodos para el análisis de terpenos: un método para la columna no polar llamada HP-5 (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm, Agilent) (de aquí en adelante M1) y un método para la columna polar llamada INNOWAX (30 m × 0,25 mm × 0,50 µm, Agilent) (de aquí en adelante M2). En ambos métodos, se usó nitrógeno como gas de arrastre (flujos de 1,2 y 1,0 ml.min⁻¹ para M1 y M2, respectivamente). La temperatura de inyección fue de 250 °C. El módulo del detector se configuró a 280 °C, con flujos de 15, 30 y 400 ml.min⁻¹ de nitrógeno, hidrógeno y aire, respectivamente. La inyección fue directa, con un volumen de 2 µl. En M1, la temperatura del horno se configuró en gradiente, comenzando con 60 °C; aumentando a razón de 3 °C.min⁻¹. El tiempo del análisis cromatográfico para M1 fue de 18 minutos, con 3 minutos de post-análisis cromatográfico a 250 °C para una limpieza térmica. En M2, la temperatura del horno se configuró en gradiente, comenzando con 40 °C; aumentando a razón de 1 °C.min⁻¹ hasta los 56 °C, luego a razón de 5 °C.min⁻¹ hasta los 200 °C, manteniendo 7 minutos, luego a razón de 15 °C.min⁻¹ hasta los 240 °C. El tiempo del análisis cromatográfico para el M2 fue de 45 minutos, con 3 minutos de post-análisis cromatográfico a 245 °C para una limpieza térmica.

RESULTADOS

Identificación y cuantificación de terpenos por GC-FID:

Los terpenos presentan un amplio rango de polaridad, permitiendo una mayor versatilidad en el uso del equipamiento disponible. Se muestran dos métodos óptimos de identificación y cuantificación de los terpenos mayoritarios en aceite de Cannabis β-Pineno, Myrceno, p-Cymeno, Limoneno, Linalool, α-Terpineol, Nerol y Geraniol, para la columna no polar HP-5 (M1) y para la columna polar INNOWAX (M2). A los fines comparativos del trabajo (M1 vs. M2), los estándares de p-Cymeno, Nerol y Geraniol no fueron analizados con el M2 porque como se verá más adelante, el M2 no es el método recomendado para análisis de rutina. En este sentido, por tratarse de terpenos presentes normalmente a muy bajas concentraciones en las muestras de aceite de Cannabis, fueron considerados no relevantes para la comparación de las propiedades resolutivas de ambos métodos. Se observó que el tiempo requerido para el análisis de los terpenos seleccionados como representativos del aceite de Cannabis fue menor para el M1 que para M2 (21 y 48 minutos, respectivamente). Los métodos descritos aquí, fueron seleccionados porque permitieron una buena separación de picos (Figura 1), buena reproducibilidad (error estándar <2,5%), con diferencias en los tiempos de retención apropiadas para la identificación y cuantificación de los principales terpenos en extractos de Cannabis (Tabla 1).

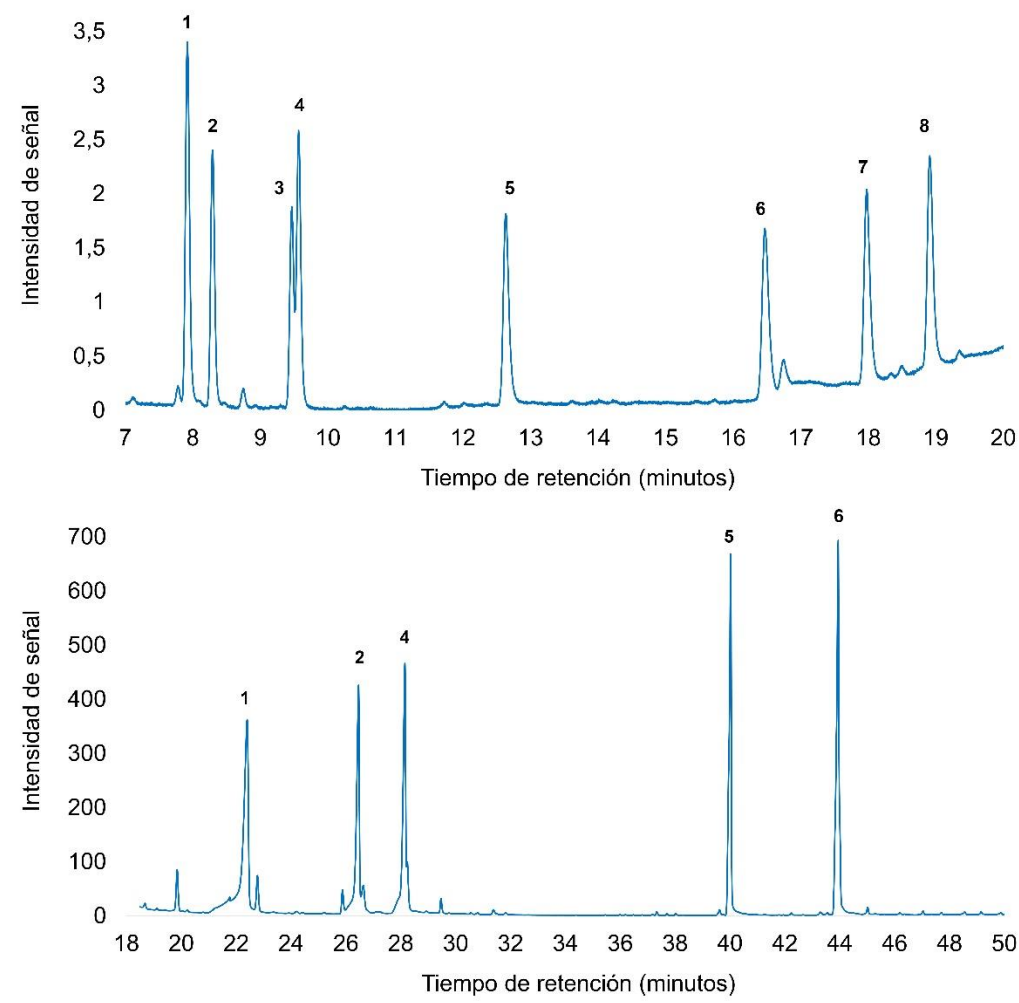


Figura N° 1. Cromatograma representativo de los resultados obtenidos por CG-FID para una mezcla de estándares aplicando los métodos M1 y M2. Se indican los picos de los terpenos analizados: 1: β -Pinoeno; 2: Myrceno; 3: p-Cimeno; 4: Limoneno; 5: Linalool; 6: α -Terpineol; 7: Nerol; 8: Geraniol.

Tabla N° 1: tiempos de retención de los materiales de referencia

Método	β -Pinoeno	Myrceno	p-Cimeno	Limoneno	Linalool	α -Terpineol	Nerol	Geraniol
M1	7,90	8,30	9,40	9,60	12,20	16,00	17,80	18,70
M2	22,06	26,09	NA	27,82	39,84	43,76	NA	NA

Los valores se expresan en minutos y corresponden a un promedio de 7 determinaciones. NA: no analizado usando el M2. Todos los resultados presentan errores estándares menores al 2,5%

Todas las ecuaciones de las curvas de calibración obtenidas para los estándares de β -Pinoeno, Myrceno, p-Cimeno, Limoneno, Linalool, α -Terpineol, Nerol y Geraniol arrojan valores de coeficientes de determinación R^2 superiores a 0,92

(casi todos mayores a 0,99; Tabla 2). Estos resultados indican que la relación área/concentración es lineal para ambos métodos haciéndolos apropiados para determinaciones cuantitativas en el rango de 0,0005 a 2,0 mg/ml de

β -Pinoeno, Myrceno, p-Cimeno, Limoneno, Linalool, α -Terpineol, Nerol y Geraniol.

Tabla N° 2: Curvas de calibración obtenidas con M1 y M2 para cada uno de los terpenos analizados

Compuesto	Método	
	M1	M2
β- Pineno	A= 1779,3* conc + 2,8241 (R2= 0,9998)	A= 55015* conc - 2,3901 (R2= 0,921)
Myrceno	A= 1230* conc + 1,8802 (R2= 0,9999)	A= 38284* conc + 1,7521 (R2= 0,991)
p- Cymeno	A= 1347,2* conc - 2,144 (R2= 0,9997)	NA
Limoneno	A= 1197,6* conc + 4,4669 (R2= 0,9997)	A= 44782* conc + 13,013 (R2= 0,997)
Linalool	A= 1231,9* conc + 2,6493 (R2= 0,9993)	A= 44240* conc + 11,207 (R2= 0,998)
α- Terpineol	A= 1347,6* conc + 2,5221 (R2= 0,9993)	A= 55091* conc + 1,3099 (R2= 0,982)
Nerol	A= 1803,4* conc - 2,6464 (R2= 0,9995)	NA
Geraniol	A= 1946,6* conc - 3,3314 (R2= 0,9995)	NA

Se muestran las ecuaciones de las curvas obtenidas por los dos métodos optimizados para GC. A: área del pico. conc. = concentración del terpeno (mg/ml). Entre paréntesis se muestra el valor de R².

El M1 fue validado con análisis de aceites ingresados al servicio de STAN ST4856. La Figura 2 muestra un cromatograma representativo aplicando M1, correspondiente al análisis de terpenos en aceite de Cannabis obtenido de la

variedad S.A.D. (Sweet Afgani Delicious). Los resultados muestran que el M1 permitió la identificación y cuantificación de los terpenos mayoritarios de esta muestra de aceite (Tabla 3). Todos los terpenos usados como referencia fueron

identificados y cuantificados en esta muestra, excepto Nerol, para el que no podemos descartar una presencia por debajo del límite de detección.

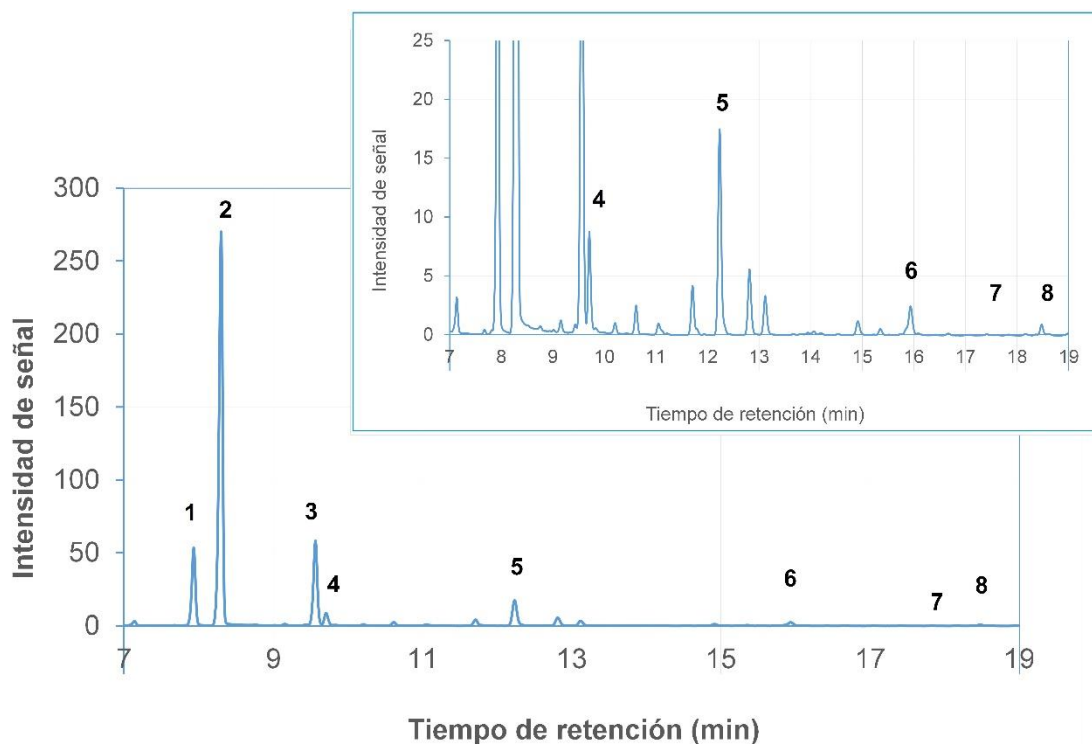


Figura N° 2. Cromatograma de una muestra típica de aceite de Cannabis obtenido de la variedad S.A.D. (Sweet Afgani Delicious), analizada con el M1. La muestra fue diluida en metanol (1/20) en el laboratorio, para su análisis por GC-FID. Se indican los picos de los terpenos identificados con estándares: 1: β-Pineno; 2: Myrceno; 3: p-Cymeno; 4: Limoneno; 5: Linalool; 6: α-Terpineol; 7: Nerol (no fue detectado en esta muestra); 8: Geraniol. El inserto, superior derecho, muestra el detalle de picos minoritarios con una escala de intensidad ampliada

Tabla N° 3: Concentración de los terpenos identificados en aceite de Cannabis (mg/ml)

β -Pino	Myrceno	p-Cimeno	Limoneno	Linalool	α -Terpineol	Nerol	Geraniol
1,351	9,693	0,016	2,222	0,674	0,098	ND	0,005

Los datos corresponden al resultado analítico del aceite de Cannabis mostrado en la Figura 2, usando el M1. Los valores de la tabla corresponden a la concentración de terpenos en la muestra original y se expresan en mg/ml. ND: no detectado en la muestra.

DISCUSIÓN

El uso medicinal del *Cannabis sativa* tiene una historia milenaria. Sin embargo, el uso farmacológico de sus principios activos es más reciente. Entre los cannabinoides ya aprobados para uso medicinal, podemos citar el tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD)⁽²⁷⁾. Cabe aclarar que estos u otros principios activos obtenidos de Cannabis, o sus análogos sintéticos, son altamente purificados para formar parte de un medicamento, aprobado o en vías de aprobación y han sido validados por ensayos clínicos exhaustivos y evaluaciones de seguridad, eficacia y efectos adversos. Mientras que los beneficios a la salud o los efectos adversos de los extractos del Cannabis, entre ellos el aceite, aún están en etapa de evaluación científica y clínica^(13,28). Esto podría estar relacionado a que el aceite de Cannabis es una mezcla de fitoquímicos, muchos de los cuales poseen actividad biológica. Entre los compuestos no cannabinoides, los terpenos y terpenoides representan el grupo más numeroso (unas 200 moléculas diferentes) y son el 90% de los componentes volátiles detectados en los aceites⁽²⁶⁾. Aunque la sinergia entre diferentes cannabinoides y terpenos es un tema que aún se discute, sí hay numerosa evidencia científica que muestra que los terpenos y terpenoides poseen *per se* una amplia gama de actividades biológicas como anticancerígenas, antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y antialérgicas^(16,29,30). De esta complejidad, desde el punto de vista fitoquímico, surge la necesidad de una caracterización química exhaustiva de la composición del aceite de Cannabis, que incluya no solo la cuantificación de CBD y THC, sino también de los principales terpenos para asegurar la reproducibilidad de un ensayo científico o clínico. Por otro lado, muchas variables ambientales hacen que el perfil de terpenos y terpenoides no sea igual en todas las variedades de Cannabis, por lo que su caracterización podría ser una herramienta útil a la trazabilidad de muestras en investigaciones forenses.

La cromatografía gaseosa es considerada una técnica analítica de referencia para la investigación de la composición del aceite de Cannabis, capaz de caracterizar el quimiotipo de la planta y la calidad de sus derivados, así como de controlar la calidad de los preparados farmacéuticos de Cannabis.

En respuesta a numerosas consultas de médicos, investigadores, laboratorios de análisis químico y abogados relacionados al tema, aquí se muestran los detalles experimentales de dos métodos optimizados para la determinación de terpenos del

Cannabis por la técnica de cromatografía gaseosa. La aplicación de ambos métodos arroja resultados con muy buena reproducibilidad, la separación entre picos permite una identificación adecuada y las curvas de calibración permiten la cuantificación de los terpenos identificados en los aceites. A partir de los resultados obtenidos, se recomienda el M1 para análisis rutinario, si lo que se busca es una caracterización rápida y confiable de los terpenos en muestras de aceite de Cannabis, debido a que se resuelve en menor tiempo (21 vs. 48 min). Esto también es una ventaja para los equipos con inyección automática de muestras, ya que los análisis pueden proseguir en ausencia de personal, aumentando la eficiencia del laboratorio. Gracias a la reproducibilidad de este método, hemos observado que una curva de calibración obtenida con los terpenos mostrados en la Figura 1, puede ser utilizada sin efectos cuantitativamente significantes para analizar unas 100 muestras con lavados térmicos de la columna después de cada 10 muestras. Para realizar análisis de rutina se utilizan los estándares correspondientes a los terpenos mayoritarios en las variedades de Cannabis, como los mostrados en este trabajo. En el mercado existen estos y otros estándares y también mezclas de terpenos recomendados para análisis más exhaustivos del perfil de terpenos del Cannabis u otras especies. En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que los proveedores requerirán la habilitación del laboratorio que pretende analizar derivados de cannabis (de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, ANMAT, en Argentina) para dar curso al pedido de estándares. Ya contando con los estándares, es importante señalar que cada laboratorio debe construir sus curvas de calibración y que el tiempo y/o cantidad de análisis confiables dependerá del lavado correcto de la columna para prevenir su deterioro con el tiempo o con muestras muy contaminadas; principalmente con metales pesados. Se recomienda fuertemente inyectar un estándar, en una concentración conocida, antes de iniciar el análisis de un lote de aceites, para descartar deterioro o verificar la correcta capacidad analítica de la columna. El M1 ha sido ensayado en numerosas muestras y pudieron determinarse los perfiles de terpenos de diferentes variedades de Cannabis, como así también efectos de las condiciones de cultivo y de los métodos de extracción utilizados. Es decir, que cada muestra proporcionó un cromatograma diferente característico y este método ha demostrado ser eficiente para identificar y cuantificar terpenos en muestras de aceites de Cannabis de diferentes productores. Con respecto a esto, hemos observado que el método de extracción es fundamental a la hora de retener los terpenos en el

extracto. Pudimos apreciar que las muestras provenientes de extracciones alcohólicas y evaporación con calor tienden a tener concentraciones de terpenos mucho menores que las maceraciones o resinas obtenidas por prensado. También observamos que las muestras de hidrolatos de cannabis no son factibles de ser analizadas mediante inyección directa ya que el agua presenta un volumen de expansión mayor al resto de los solventes. Para estas muestras recomendamos la adsorción de los terpenos en una fibra, por microextracción en fase sólida (SPME), seguida de desorción en el puerto de inyección en modo splitless (SPME-GC-FID). Por otro lado, el M2, aunque demanda más tiempo, podría aplicarse en el análisis de muestras diluidas, que no pudieron cuantificarse por M1. Principalmente porque proporciona una mayor relación área/concentración (ver ecuaciones en Tabla 2). Además, hemos observado que los cannabinoides como CBD, THC, CBN son detectables por los métodos M1 y M2. Sin embargo, el método de extracción de aceite no es eficiente para estos cannabinoides y su concentración es baja. Así, debido a que estos metabolitos aparecen en los últimos minutos del análisis y sus picos tienen áreas pequeñas usando las columnas HP-5 e INNOWAX (no se muestran en la Figura 2; solo picos hasta 20 min en M1 y hasta 45 min en M2, respectivamente), no se recomienda usar este método para una caracterización de cannabinoides. Los análisis cuali/cuantitativos de las formas ácidas y neutras de los cannabinoides son efectuados en nuestro laboratorio, preferentemente por HPLC-PDA.

CONCLUSIÓN

Considerando que las investigaciones del uso médico de la planta de Cannabis y de sus derivados están en pleno desarrollo y que el aceite de Cannabis es una mezcla mucho más compleja que %THC, %CBD, los análisis de sus compuestos volátiles mayoritarios terpenos, son de vital importancia para lograr un verdadero avance en estas investigaciones. A partir de la experiencia de nuestro laboratorio, en parte mostrada en este trabajo, ofrecemos dos métodos para lograr estos análisis. Concluimos que el M1 resulta ser eficiente para análisis de rutina de aceites de Cannabis porque demanda poco tiempo, tiene buena capacidad analítica y es muy reproducible. Este trabajo, además de otorgar una herramienta de análisis fundamental para el control de calidad de aceites medicinales de Cannabis, también brinda un método para determinar el perfil "aromático" de las variedades de Cannabis contribuyendo a su

trazabilidad en investigaciones científicas, ensayos clínicos o pericias legales. Además, permitiría valorizar posibles pérdidas que se generen durante la preparación o almacenamiento de los mismos, haciendo análisis en diferentes etapas o a diferentes tiempos de guardado. Así mismos, se espera que también sea aplicable a otros aceites ricos en terpenos, utilizando los estándares adecuados.

BIBLIOGRAFÍA

- Araujo dos Santos N, Romão W. Cannabis – A state of the art about the millenary plant: Part I. Forensic Chemistry 2023;32:100470. doi: 10.1016/j.forc.2023.100470.
- Safakish R, Ko G, Salimpour V, Hendin B, Sohanpal I, Loheswaran G, Yoon SYR. Medical Cannabis for the Management of Pain and Quality of Life in Chronic Pain Patients: A Prospective Observational Study. Pain Med. 2020 Nov 1;21(11):3073-3086. doi: 10.1093/pm/pnaa163.
- Purcell JM, Passley TM, Leheste JR. The cannabidiol and marijuana research expansion act: Promotion of scientific knowledge to prevent a national health crisis. Lancet Reg Health Am. 2022 Jul 13;14:100325. doi: 10.1016/j.lana.2022.100325. Purcell JM, Passley TM, Leheste JR. The cannabidiol and marijuana research expansion act: Promotion of scientific knowledge to prevent a national health crisis. Lancet Reg Health Am. 2022;14:100325. doi: 10.1016/j.lana.2022.100325
- Comisión de Estupefacientes de las Naciones Unidas. 2020, December) Press Statement. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/commissions/CND/CND_Sessions/CND_63Reconvened/Press_statement_CND_2_December.pdf
- O'Connor SM, Lietzan E. The Surprising Reach of FDA Regulation of Cannabis, Even After Descheduling. Am Univ Law Rev. 2019;68(3):823-925.
- Ley N° 27350 "Investigación médica y científica del uso medicinal de la planta de cannabis y sus derivados. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ministerio de Justicia y Derechos Humanos; 2019. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/justicia/derechofacil/leysi/mple/cannabis-medicinal>
- Ley N° 27669 "Marco regulatorio para el desarrollo de la industria del cannabis medicinal y el cáñamo industrial". Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Senado y Cámara de Diputados de la Nación Argentina; 2022. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-27669-365303/texto>.
- Manzo PG, Martín S, Uema S, Charles G, Montero Bruni F, Núñez Montoya S, Bertotto ME, Eynard M, Armando P, Bustos Fierro C. Caracterización de la problemática del uso terapéutico del Aceite de Cannabis en Córdoba, Argentina [Characterization of the problem of the therapeutic use of Cannabis Oil in Córdoba, Argentina]. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba. 2022 Jun 6;79(2):123-131. Spanish. doi: 10.31053/1853.0605.v79.n2.30922.
- Flores E. Cannabis y Sociedad. Resultados de la 1ra Encuesta Nacional de personas que usan Cannabis en Argentina (EPC 2020). 2022 Agosto. Disponible en: <https://encuestacannabis.ar/>
- Radwan MM, Chandra S, Gul S, ElSohly MA. Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. Molecules. 2021 May 8;26(9):2774. doi: 10.3390/molecules26092774.
- Burnett GM, Gorelick DA, Hill KP. Policy Ahead of the Science: Medical Cannabis Laws Versus Scientific Evidence. Psychiatr Clin North Am. 2022 Sep;45(3):347-373. doi: 10.1016/j.psc.2022.05.002.
- Reddy DS. Therapeutic and clinical foundations of cannabidiol therapy for difficult-to-treat seizures in children and adults with refractory epilepsies. Exp Neurol. 2023 Jan;359:114237. doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114237.
- Cuestas E. Cannabis para el dolor neuropático crónico [Cannabis for chronic neuropathic pain.]. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba. 2019 Mar 11;76(1):1-2. Spanish. doi: 10.31053/1853.0605.v76.n1.23669.
- Das PC, Vista AR, Tabil LG, Baik OD. Postharvest Operations of Cannabis and Their Effect on Cannabinoid Content: A Review. Bioengineering (Basel). 2022 Aug 3;9(8):364. doi: 10.3390/bioengineering9080364.
- Desaulniers Brousseau V, Wu BS, MacPherson S, Morello V, Lefsrud M. Cannabinoids and Terpenes: How Production of Photo-Protectants Can Be Manipulated to Enhance Cannabis sativa L. Phytochemistry. Front Plant Sci. 2021 May 31;12:620021. doi: 10.3389/fpls.2021.620021.
- Chacon FT, Raup-Konsavage WM, Vrana KE, Kellogg JJ. Secondary Terpenes in Cannabis sativa L.: Synthesis and Synergy. Biomedicines. 2022 Dec 6;10(12):3142. doi: 10.3390/biomedicines10123142.
- Datta S, Ramamurthy PC, Anand U, Singh S, Singh A, Dhanjal DS, Dhaka V, Kumar S, Kapoor D, Nandy S, Kumar M, Koshy EP, Dey A, Proćków J, Singh J. Wonder or evil?: Multifaceted health hazards and health benefits of Cannabis sativa and its phytochemicals. Saudi J Biol Sci. 2021 Dec;28(12):7290-7313. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.08.036.
- Fischedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic fingerprinting of Cannabis sativa L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. Phytochemistry. 2010 Dec;71(17-18):2058-73. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.10.001.
- Ciolino LA, Ranieri TL, Taylor AM. Commercial cannabis consumer products part 1: GC-MS qualitative analysis of cannabis cannabinoids. Forensic Sci Int. 2018 Aug;289:429-437. doi: 10.1016/j.forsciint.2018.05.032.
- Sarma ND, Wayne A, ElSohly MA, Brown PN, Elzinga S, Johnson HE, Marles RJ, Melanson JE, Russo E, Deyton L, Hudalla C, Vrdoljak GA, Wurzer JH, Khan IA, Kim NC, Giancaspro GI. Cannabis Inflorescence for Medical Purposes: USP Considerations for Quality Attributes. J Nat Prod. 2020 Apr 24;83(4):1334-1351. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01200
- Nahar L, Guo M, Sarker SD. Gas chromatographic analysis of naturally occurring cannabinoids: A review of literature published during the past decade. Phytochem Anal. 2020 Mar;31(2):135-146. doi: 10.1002/pca.2886.
- Bakro F, Jedryczka M, Wielgusz K, Sgorbini B, Inchingolo R, Cardenia V. Simultaneous determination of terpenes and cannabidiol in hemp (Cannabis sativa L.) by fast gas chromatography with flame ionization detection. J Sep Sci. 2020 Jul;43(14):2817-2826. doi: 10.1002/jssc.201900822.
- Iseppi R, Brighenti V, Licata M, Lambertini A, Sabia C, Messi P, Pellati F, Benvenuti S. Chemical Characterization and Evaluation of the Antibacterial Activity of Essential Oils from Fibre-Type Cannabis sativa L. (Hemp). Molecules. 2019 Jun 21;24(12):2302. doi: 10.3390/molecules24122302.
- Ibrahim EA, Wang M, Radwan MM, Wanas AS, Majumdar CG, Avula B, Wang YH, Khan IA, Chandra S, Lata H, Hadad GM, Abdel Salam RA, Ibrahim AK, Ahmed SA, ElSohly MA. Analysis of Terpenes in Cannabis sativa L. Using GC/MS: Method Development, Validation, and Application. Planta Med. 2019 Mar;85(5):431-438. doi: 10.1055/a-0828-8387.
- Ternelli M, Brighenti V, Anceschi L, Poto M, Bertelli D, Licata M, Pellati F. Innovative methods for the preparation of medical Cannabis oils with a high content of both cannabinoids and terpenes. J Pharm Biomed Anal. 2020 Jul 15;186:113296. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113296.
- Calvi L, Pentimalli D, Panteri S, Giupponi L, Gelmini F, Beretta G, Vitali D, Bruno M, Zilio E, Pavlovic R, Giorgi A. 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. J Pharm Biomed Anal. 2018 Feb 20;150:208-219. doi: 10.1016/j.jpba.2017.11.073.
- Hajjar ER, Lungen JM, Worster BK. Therapeutic Benefits of Medical Cannabis. Physician Assistant Clinics. 2023;8(2):281-291, doi: 10.1016/j.cpha.2022.10.008.
- Campos DA, Mendivil EJ, Romano M, García M, Martínez ME. A Systematic Review of Medical Cannabinoids Dosing in Human. Clin Ther. 2022 Dec;44(12):e39-e58. doi: 10.1016/j.clinthera.2022.10.003.
- Masyita A, Mustika Sari R, Dwi Astuti A, Yasir B, Rahma Rumata N, Emran TB, Nainu F, Simal-Gandara J. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. Food Chem X. 2022 Jan 19;13:100217. doi: 10.1016/j.fochx.2022.100217.
- Meenu M, Padhan B, Patel M, Patel R, Xu B. Antibacterial activity of essential oils from different parts of plants against Salmonella and Listeria spp. Food Chem. 2023 Mar 15;404(Pt B):134723. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134723.

Agradecimientos:

PROBIEN, CONICET, Universidad Nacional del Comahue, Sr. Horacio Riaseco, Lic. Lucas Cavaliere, Asociación Civil Ciencia Sativa (número de personería jurídica 3.541) y la Asociación Civil Cannabis Medicinal Río Negro (número de personería jurídica 3.496).

Limitaciones de responsabilidad:

Este trabajo presenta los resultados obtenidos por el Laboratorio de Cromatografía del PROBIEN, en el marco del Servicio Técnico de Alto Nivel, STAN ST4856 de CONICET "Análisis cuantitativo de cannabinoides y terpenos en aceites; tinturas y extractos de Cannabis" que brinda este Instituto. Los costos fueron cubiertos con los ingresos del servicio o adquiridos con fondos del PROBIEN, CONICET, Universidad Nacional del Comahue. La Asociación Civil Ciencia Sativa y la Asociación Civil Cannabis Medicinal Río Negro donaron algunos insumos y proporcionaron muestras para optimizar los métodos de análisis.

Conflicto de interés:

Ninguno.

Fuentes de apoyo:

La presente investigación contó con financiamiento de CONICET, la UNCo y recursos propios a través de servicios a terceros mediante el STAN ST4856. La Asociación Civil Ciencia Sativa y la Asociación Civil Cannabis Medicinal Río Negro donaron algunos insumos y proporcionaron muestras para optimizar los métodos de análisis.

Originalidad:

Este artículo es original y no ha sido enviado para su publicación a otro medio de difusión científica en forma completa ni parcialmente.

Cesión de derechos:

Quienes participaron en la elaboración de este artículo, ceden los derechos de autor a la Universidad Nacional de Córdoba para publicar en la Revista de la Facultad de Ciencias Médicas y realizar las traducciones necesarias al idioma inglés.

Contribución de los autores:

Quienes participaron en la elaboración de este artículo, han trabajado en la concepción del diseño, recolección de la información y elaboración del manuscrito, haciéndose públicamente responsables de su contenido y aprobando su versión final.