



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO QUIFAC

“Validación de un método analítico por cromatografía gaseosa para la cuantificación de cannabinoides”

Internado para optar al Título de Químico Farmacéutico

CONSTANZA GUERRA CALDERON

Director de Internado: Dr. Rodrigo Díaz Vicedo

2018

Para Emma, ojitos de uva, que las ansias por descubrir sea el motor de tu vida y la pureza de tu alma mi eterna inspiración.

Índice	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Historia de la especie <i>Cannabis sativa</i> L.	2
1.2 Botánica <i>Cannabis sativa</i> L.	2
1.3 Composición química <i>Cannabis sativa</i> L.	4
1.4 Sistema Endocannabinoide	8
1.5 Actualidad	11
1.6 Cromatografía de gases	13
1.7 Validación de un método analítico	15
1.8 Idoneidad del sistema analítico	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo general	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Materiales	22
3.2 Reactivos	22
3.3 Metodología	23
3.4 Validación del método analítico	23
3.4.1 Parámetros de linealidad	23
3.4.2 Parámetros de sensibilidad	24
3.4.3 Calculo de límites	24
3.4.4 Parámetros de precisión	24
3.4.5 Parámetros de exactitud	25
3.4.6 Aplicabilidad	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
4.1 idoneidad del sistema analítico	28
4.2 Validación del método analítico	28
4.2.1 Parámetros de linealidad	28
4.2.2 Parámetros de sensibilidad	29
4.2.3 Calculo de límites	30
4.2.4 Parámetros de precisión	30
4.2.5 Parámetros de exactitud	33
4.2.6 Aplicabilidad	36
5. CONCLUSIONES	39
6. BIBLIOGRAFÍA	41
7. ANEXOS	44

Abreviaturas

μ Vs: microvolts por segundo

AHP: American Herbal Pharmacopoeia

AMPC: adenosín monofosfato cíclico

CB1: receptor cannabinoide tipo 1

CB2: receptor cannabinoide tipo 2

CBD: cannabidiol

DS: desviación estándar

FID: detector de ionización de llama

GC: Cromatografía Gaseosa

ISPCh: Salud Pública de Chile

mV: milivolts

QUIFAC: laboratorio de control de calidad de la Universidad de Valparaíso

THC: Δ^9 -tetrahidrocannabinol

UNODC: Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito

USP: Farmacopea de los Estados Unidos

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

Resumen

Cannabis sativa L. es el nombre de una especie botánica que posee variados efectos farmacológicos, motivo por el cual existe un gran interés científico en investigar las propiedades de esta planta, y cada día la evidencia aumenta.

El escenario a nivel mundial da cuenta de varios países que han avanzado hacia la despenalización en su consumo y su regulación, y otros que solo se han abierto a su uso medicinal, como es el caso de nuestro país.

La reciente apertura de nuestro mercado farmacéutico a productos en base a *Cannabis sativa* L. y la posibilidad de una futura producción nacional, hacen necesario el aseguramiento de la calidad, seguridad y eficacia de este tipo de medicamentos, para lo cual se requiere de metodologías analíticas previamente validadas.

Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo se realizó, como primer objetivo, la validación de un método analítico estableciendo mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas, demostrando de esta forma que el método por cromatografía gaseosa es apto para cuantificar cannabinoides provenientes de diversas matrices y que por tanto puede replicarse.

Abstract

Cannabis sativa L. is the name of a botanical species that has varied pharmacological effects, which is why there is a great scientific interest in the investigation of its properties, and every day the evidence increases.

The world scenario shows several countries that have made progress towards the decriminalization of its consumption and its regulation. However there is some other countries that have allowed its use only as a medicinal treatment, as Chile.

The recent opening of our pharmaceutical market to products based on *Cannabis sativa* L., and a possible future national production, make necessary the guarantee of quality, safety and efficacy, for wich previously validated methodologies are required.

That is why in this project, as a first objective, the validation of an analytical method was carried out, establishing through laboratory studies that method performances meet the requirements for the planned analytical applications, demonstrating thereby, that the gas chromatography method it is able to quantify phytocannabinoids coming from different matrices and can therefore be replicated.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de la especie *Cannabis sativa* L.

La relación del hombre con la Cannabis, data probablemente desde hace unos 10.000 años, es decir, desde el descubrimiento de la agricultura del Viejo Mundo. En China se han conservado vestigios de la utilización de la planta que datan de 4.000 años a.C., en Turkeistán de casi 3.000 años a.C., y en Turquía desde el siglo VIII a.C. (Osorio & Tangarife, 2009).

Cannabis sativa L. es originaria de Asia y se puede aprovechar casi en su totalidad, pues proporciona fibras textiles, combustible, alimento y también es utilizada como fuente de medicamentos. De acuerdo al conocimiento popular, se le han atribuido propiedades analgésicas, relajantes musculares, antidepresivas, hipnóticas, inmunosupresoras, antiinflamatorias, ansiolíticas, broncodilatadoras, entre otras. Es también una de las plantas más antiguas que producen efectos psicotrópicos (Ángeles López, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

Se estudió por primera vez desde un punto de vista científico a finales del siglo XVIII en Francia, pero no fue hasta el año 1860 que se creó en Estados Unidos, el primer Comité de Médicos para estudiar sistemáticamente sus usos y propiedades; y fue sólo hasta 1964 cuando se aisló el componente activo Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y se dio formalmente a la investigación científica en esta área (Osorio & Tangarife, 2009).

En la actualidad la producción de la hierba de cannabis está muy extendida, prácticamente en todos los países del mundo y su cultivo ha sufrido algunas manipulaciones entre las que encontramos cruza de variedades, producción sin semilla (clonación) y obtención de hembras hermafroditas artificiales que tienen órganos reproductivos plenamente funcionales. (Oficina de las naciones unidas contra las drogas y el delito, 2010)

1.2 Botánica de *Cannabis sativa* L.

Cannabis sativa L. es el nombre científico de la especie botánica que desde el punto de vista taxonómico pertenece a la clase de las dicotiledóneas, orden 4°, urticales y a la familia cannabaceae; su género es Cannabis. De esta especie se han descrito 3 subespecies o variedades: sativa, indica y ruderalis, las cuales se distinguen por su anatomía, hábitos de crecimiento, variación de hojas y tipos de semilla, entre otras características (Fuentes, Álvarez, Rodríguez, Ramos, Propéro, Mesa & Zabicky, 2015).

Desde el punto de vista botánico, esta especie se caracteriza por ser una planta herbácea, anual, de tallo erguido, recto y rígido, con sección transversal cilíndrica, raíz pivotante, de aspecto áspero, color verde oscuro y con ramas cortas y frágiles. Siendo una planta dioica, el pie femenino es más fuerte y frondoso que el masculino, que es pequeño, delgado y se marchita rápidamente después de la floración. Las hojas de esta planta se diferencian según su ubicación; las hojas inferiores son opuestas, palmadas, presentando de cinco a siete hojillas lanceoladas, de bordes aserrados y enteros en los extremos; poseen un pecíolo muy largo con una estípula rectiforme en la base. Las hojas superiores, ubicadas en las proximidades de las inflorescencias son alternadas o aisladas y de morfología diferente. No presentan pecíolo y pueden ser simples y poseer dos o tres segmentos. Sus bordes son también dentados, pero no se desarrollan tanto como las inferiores. Las flores masculinas se agrupan en racimos, son más pequeñas que las femeninas, de color amarillo verdoso. El cáliz lo forman cinco sépalos que rodean a cinco estambres, episépalos, en disposición opuesta, con grandes antenas colgantes. Las flores femeninas forman racimos muy contraídos de cimas interpuestas con brácteas foliáceas. El perianto de las flores femeninas forma un cono por cuyo extremo asoman dos estigmas largos de color rosado rojizo. El cáliz es urceolado, ovario súpero sentado, bicarpelar y unilocular que contiene un óvulo campilotropo, el cual da lugar en la madurez a un aquenio blando globular, grisáceo, rodeado por una bráctea muy rica en glándulas secretoras de resina. La resina es segregada por los tricomas glandulares que se encuentran en toda la parte vegetativa, tanto en el pie femenino como en el masculino. El número de pelos y su grosor aumenta a medida que crece la planta, y están dispuestos principalmente en las hojas superiores y en las sumidades floridas. La resina, por tanto, la segrega el pie masculino como el femenino, aunque proporcionalmente el pie femenino segrega más por ser más frondoso (Fuentes, Álvarez, Rodríguez, Ramos, Propéro, Mesa & Zabicky, 2015).

El ciclo natural de *Cannabis sativa* L. comienza en la primavera con la germinación de las semillas. La etapa de crecimiento vegetativo se lleva a cabo en mediados del verano, hasta que las plantas comienzan a florecer. El desarrollo floral se mantiene durante dos o tres meses y, para la mayoría de las variedades, la cosecha óptima se da a principios del otoño (Ángeles López, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

El cultivo controlado permite mantener las condiciones óptimas para que las plantas puedan desarrollarse, por lo que, en las condiciones adecuadas la planta llega a crecer de tres a cuatro metros. Estas condiciones incluyen desde la selección de las semillas hasta factores ambientales como: temperatura (25-20 °C), humedad (60-70 %), fotoperiodo (de 16 h luz/ 8 h oscuridad a 12 h luz/ 12 h oscuridad) e intensidad luminosa (400-700 nm). Además, su crecimiento con una

solución nutritiva permite obtener mayores cantidades de THC. También es necesario realizar un control adecuado de plagas para asegurar su calidad (Ángeles López, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

Al término de la floración, se procede a la cosecha de las plantas. Para ello se cortan las ramas principales y se apartan los cogollos, tratándolos con mucho cuidado para evitar la pérdida de resina. También se apartan las hojas grandes. Finalmente, se lleva a cabo el proceso de secado, que debe realizarse a la sombra, en un lugar con buena ventilación y humedad regulada. Las fallas en este proceso pueden provocar que las hojas y cogollos se contaminen con hongos y que la concentración de THC disminuya (Ángeles López, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

En la actualidad dado el avance genético y biotecnológico, existen cientos de cultivares, los cuales en su mayoría son feminizadas, autoflorecientes y regulares, resultado de la cruce entre las variedades sativa e indica. En este contexto, se han obtenido estos tipos de cultivares con el fin de potenciar ciertas propiedades respecto a la planta de origen natural (Hazekamp, Fishedick, Llano, Lubbe, & Ruhaak, 2010).

1.3 Composición química de *Cannabis sativa* L.

La composición química de esta especie se ha estudiado ampliamente. Se han identificado aproximadamente 500 compuestos, entre los que se encuentran cannabinoides, terpenos, flavonoides, alcaloides, estilbenos, amidas fenólicas y lignanamidas (Ángeles López, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

Fitocannabinoides

Según las formalidades de la farmacología, los cannabinoides son definidos como todas aquellas sustancias químicas, independientemente de su origen o estructura, que se enlazan con proteínas receptoras específicas (CB1, CB2 y otras), las que están distribuidos por todo el organismo y ejercen un amplio espectro de acción sobre la actividad neuro-inmuno-endocrina (Pascual Simón & Fernández Rodríguez, 2017).

Desde el punto de vista de la farmacognosia, estas sustancias son clasificadas en 2 grupos: cannabinoides naturales y sintéticos. A los primeros corresponden los fitocannabinoides, componentes primordiales de la planta *Cannabis sativa* L (Pascual Simón & Fernández Rodríguez, 2017).

Otros autores señalan que estos compuestos son de naturaleza terpenofenólica y se concentran generalmente en la resina producida en los tricomas de la planta, sobre todo en las inflorescencias femeninas. Los cannabinoides son sintetizados y acumulados como ácidos cannabinoideos, y no es sino hasta el proceso de secado y almacenaje, que los ácidos se descarboxilan gradualmente hasta alcanzar su forma final, como por ejemplo el THC o el cannabidiol (CBD) (Ángeles López, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

Cabe destacar que los fitocannabinoides son los metabolitos más abundantes y exclusivos de esta especie. Se conocen alrededor de 70, siendo el THC el más abundante, más conocido y biológicamente más potente. A la fecha se han identificado varias subclases de fitocannabinoides, destacando 11 tipos, cada uno de ellos con un número variable de miembros: cannabigerol, cannabicromano, THC, Δ^9 -trans-tetrahidrocannabinol, Δ^8 -trans-tetrahidrocannabinol, cannabiciclol, cannabielsoin, cannabinal, CBD, cannabitrol, entre otros. Varios de estos fitocannabinoides, al igual que el THC, son psicoactivos, pero otros, como CBD, cannabigerol y cannabinal, no muestran esta actividad. Pero es importante considerar que se tienen registradas al menos 11 cultivares de la especie *Cannabis sativa* L., cuya concentración de cannabinoides varía de una subespecie a otra (Fuentes, Álvarez, Rodríguez, Ramos, Propéro, Mesa & Zabicky, 2015).

Los efectos farmacológicos de la cannabis se producen y explican entonces por la acción de estos compuestos sobre receptores específicos, los cuales están distribuidos en todo el organismo y por los cuales las estructuras cannabinoides tienen un alto grado de afinidad (Grotenhermen, 2006).

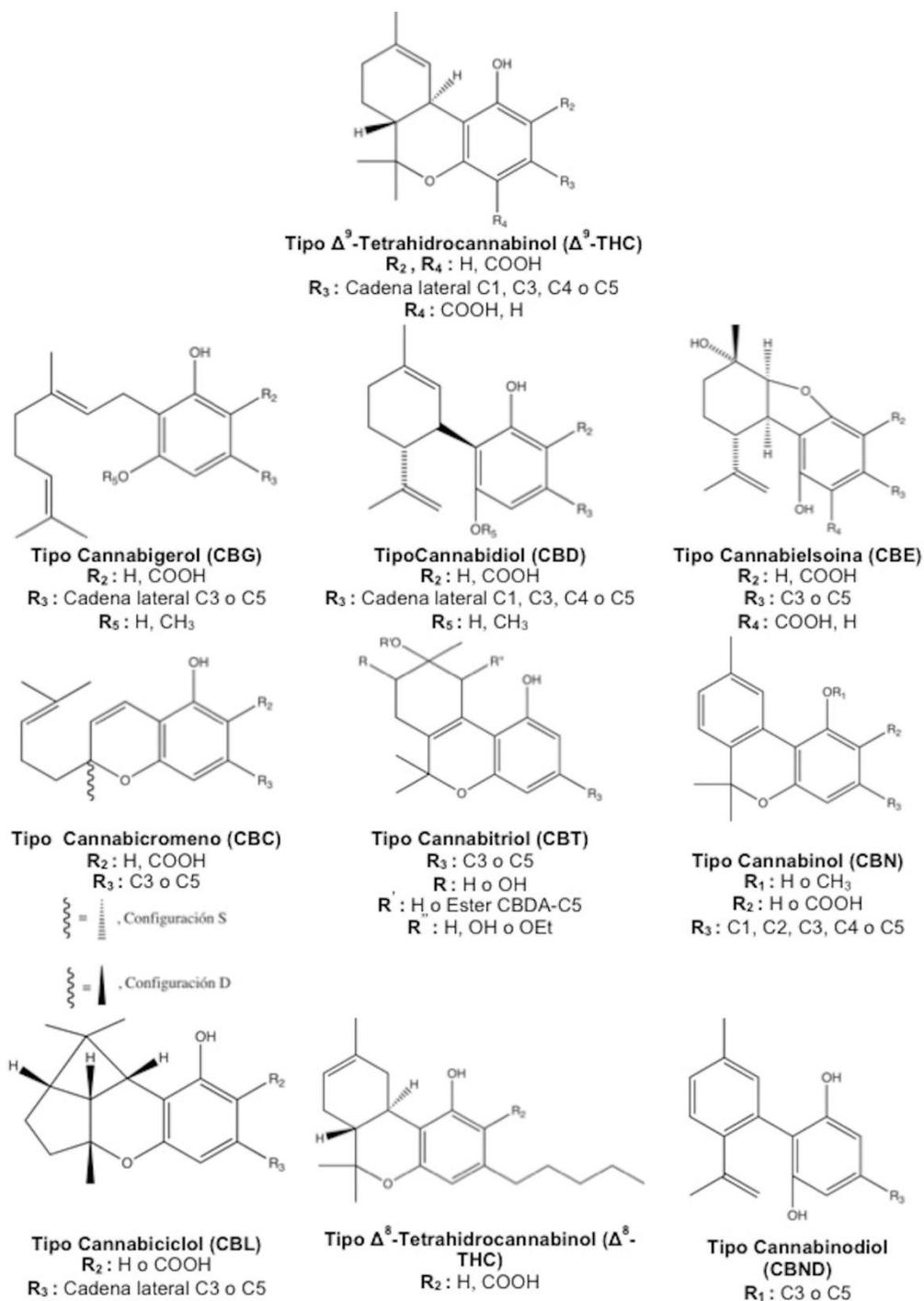


Figura 1. Estructura química de fitocannabinoides (Ángeles Lopéz, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

Otros compuestos

Además de los fitocannabinoides, esta especie produce aproximadamente 400 metabolitos químicos distintos: terpenos, carbohidratos, hidrocarburos, esteroides, flavonoides, compuestos nitrogenados y aminoácidos. Otros componentes químicos de la planta que se encuentran en menor proporción son estilbenos, lignamidas y amidas fenólicas. Algunos de estos compuestos son biológicamente activos y parecen tener ciertos efectos comunes con los cannabinoides, mientras que otros parecen participar activamente en los mecanismos de defensa de la planta (Fuentes, Álvarez, Rodríguez, Ramos, Propéro, Mesa & Zabicky, 2015).

De estos destaca la presencia de aproximadamente 120 terpenos en esta especie vegetal, que en su mayoría corresponden a monoterpenos y sesquiterpenos. Estos metabolitos son responsables del sabor de las diferentes variedades. El óxido de cariofileno, es el principal compuesto aromático y volátil que identifican los perros utilizados para la detección de narcóticos. Estos compuestos se extraen fácilmente a través de una destilación por arrastre de vapor, para obtener el aceite esencial. El rendimiento de ésta depende de cada variedad y cultivar; además de otras variables como si la planta se encuentra fresca o seca; o si son hojas, tallos o inflorescencias. Algunos de estos terpenos son farmacológicamente activos y podrían producir efectos sinérgicos con los cannabinoides (Ángeles López, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

Los flavonoides son compuestos aromáticos y se pueden encontrar en forma libre o conjugada con un glucósido. Se producen más de 20 de estos metabolitos que se encuentran principalmente en las hojas. La canflavina A y canflavina B, son dos flavonoides que han mostrado actividad farmacológica, inhibiendo la producción de prostaglandina E, mientras que otros estudios sugieren que modulan la acción de los cannabinoides (Ángeles López, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

Otros componentes químicos también presentes en la planta son los alcaloides, aunque se encuentran en menor proporción. Estos son compuestos nitrogenados que usualmente presentan una actividad biológica a dosis bajas y que pueden derivar de aminoácidos. Se han aislado e identificado por lo menos 10 de estos compuestos en las raíces, tallos, hojas, polen y/o semillas. Debido a la baja concentración de los alcaloides presentes en esta especie, su evaluación farmacológica se hace difícil (Ángeles López, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

Finalmente, también contiene estilbenoides, lignanamidas y amidas fenólicas. Los estilbenoides, son compuestos fenólicos cuya función principal en las plantas es

participar activamente en los mecanismos de defensa. Se han identificado alrededor de 19 y de algunos de ellos se presume cierta actividad farmacológica como antibacteriana y antifúngica, antiinflamatoria, antineoplásica, neuroprotectora, de protección cardiovascular y antioxidante (Ángeles López, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

De las lignanamidas y amidas fenólicas, se han identificado alrededor de 11 compuestos. Se han reportado que las amidas fenólicas tienen actividad citotóxica, antiinflamatoria, antineoplásica y analgésica, mientras que algunas lignanamidas han presentado actividad citotóxica (Ángeles López, Brindis, Cristians Niizawa, & Ventura Martínez, 2014).

1.4 Sistema Endocannabinoide

El primer paso importante para dilucidar la forma a través de la cual los cannabinoides ejercen sus efectos en el cerebro se produjo en 1964, cuando se determinó la estructura del THC, principal responsable de las propiedades psicoactivas de los cannabinoides. Una vez conocida la estructura del THC, era necesario identificar en qué zonas del cerebro actuaba para producir sus efectos y cuáles eran los mecanismos que los producían (Escobar Toledo, Berrouet Mejía, & González Ramírez, 2009).

En el caso de los cannabinoides, esta segunda etapa comenzó con la caracterización farmacológica de un receptor cuya distribución cerebral podía explicar las propiedades farmacológicas atribuidas a los cannabinoides, los cuales se denominaron CB1 y CB2, clonados en 1990 y 1993, respectivamente. Ambos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteína G (Escobar Toledo, Berrouet Mejía, & González Ramírez, 2009).

Los receptores cannabinoides CB1 se encuentran extensamente distribuidos en el cerebro, principalmente en neuronas, médula espinal y sistema nervioso periférico y su activación da lugar a los efectos psicoactivos del cannabis. También están presentes en menor cantidad en ciertos órganos y tejidos periféricos, como glándulas endocrinas y salivales, leucocitos, bazo, corazón y en determinadas zonas de los aparatos reproductor, urinario y gastrointestinal (Grotenhermen, 2006).

Los receptores CB2 se encuentran principalmente en el sistema inmune y hematopoyético y no causan efectos psicoactivos, razón por la cual el interés en las propiedades terapéuticas de sus ligandos se encuentra en aumento (Grotenhermen, 2006).

Ambos receptores están acoplados a proteínas Gi o Go, por lo tanto, inhiben la enzima adenilato ciclasa y disminuyen la producción de AMPc, que inhibe la actividad de la cinasa dependiente de AMPc. En algunos casos se ha visto que los agonistas endógenos del receptor de cannabinoides estimulan la formación de AMPc, posiblemente activando proteínas Gs (Escobar Toledo, Berrouet Mejía, & González Ramírez, 2009).

Se ha descrito que los receptores CB1 y CB2 inhiben la actividad de las adenilato ciclasas I, V, VI y VIII y estimulan las II, IV y VII. Dado que una de las funciones del AMPc es activar algunas cinasas, la disminución de sus concentraciones interfiere con la fosforilación de los sustratos de estas enzimas. Este es el caso de algunos canales de potasio, en los que la pérdida de actividad del AMPc conduce a una baja de su fosforilación y aumenta la conductancia. Esto, a la vez, merma la despolarización de la membrana y reduce la liberación de neurotransmisores como noradrenalina, L-glutamato, GABA, dopamina, serotonina y acetilcolina en la terminal presináptica (Escobar Toledo, Berrouet Mejía, & González Ramírez, 2009)

Además de los efectos ya mencionados, los cannabinoides también pueden activar la fosfolipasa A2, al aumentar la liberación de ácido araquidónico, un ácido graso que puede utilizarse para la formación de diversos eicosanoides. Esto puede generar cambios en la función cerebral y alteraciones sensorio-perceptivas y desorientación (Escobar Toledo, Berrouet Mejía, & González Ramírez, 2009).

Es claro que hasta la fecha los receptores CB1 y CB2 están muy bien caracterizados, pero no se excluye la existencia de otros subtipos de receptores cannabinoides que pudieran explicar algunos de los efectos producidos por estos compuestos y para los que todavía no se ha encontrado una explicación molecular (Escobar Toledo, Berrouet Mejía, & González Ramírez, 2009).

La existencia de receptores para cannabinoides en el organismo implica la presencia de ligandos endógenos para dichos receptores, de modo que el primer ligando endógeno o endocannabinoide se identificó en 1992 y recibió el nombre de anandamida; una sustancia compuesta por una amida de ácido araquidónico y etanolamina. La anandamida se ha identificado en cerebro y en los tejidos periféricos humanos y de ratas. En ambas especies se han detectado regiones ricas en receptores CB1 en el hipocampo, el estriado y el cerebelo, así como en el tálamo, donde la expresión de este receptor es mucho menor (Escobar Toledo, Berrouet Mejía, & González Ramírez, 2009).

Después del descubrimiento de la anandamida, se caracterizaron otros cannabinoides endógenos. Uno de los más importantes, el 2-araquidonilglicerol (2-

AG), está formado por ácido araquidónico unido por un enlace ester a glicerol. El 2-AG fue aislado inicialmente en el intestino de perros, el bazo, el páncreas y el cerebro, donde está presente en concentraciones más altas que las de la anandamida (Escobar Toledo, Berrouet Mejía, & González Ramírez, 2009).

A diferencia de otros neurotransmisores, la anandamida y el 2-AG no se almacenan en vesículas para su liberación en las sinapsis, sino que la formación y liberación de estos endocannabinoides proviene de fosfolípidos de membrana precursores y formación de hendiduras dependientes del estímulo (Escobar Toledo, Berrouet Mejía, & González Ramírez, 2009).

En el último tiempo se descubrió también el 2-gliceril éter (éter de noladina) y la virodhamina, que representan el tercer y cuarto endocanabinoide, respectivamente, todos ellos derivados del ácido araquidónico (Ortega, 2004).

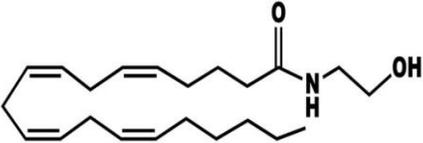
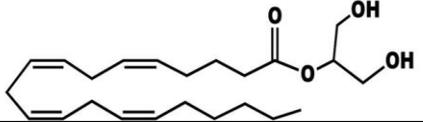
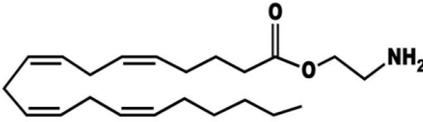
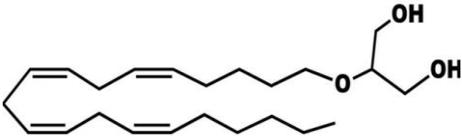
COMPUESTO	ESTRUCTURA QUÍMICA
ANANDAMIDA	
2-AG	
VIDORAMINA	
NOLADIN ETER	

Figura 2. Estructura química de endocannabinoides (Osorio & Tangarife, 2009).

De esta forma, los endocannabinoides actúan como moléculas de señal y realizan funciones reguladoras sobre diversos sistemas fisiológicos en sus distintas localizaciones, habiendo recibido especial atención su capacidad neuromoduladora en el sistema nervioso central o inmunomoduladora en el sistema inmune (Ortega, 2004).

Entre los efectos centrales cabría mencionar la antinocicepción, el desarrollo cerebral, la comunicación neuronal o la regulación de actividades cerebrales como la memoria, mientras que entre los periféricos destaca el control del apetito, la coordinación motora, la regulación de la proliferación celular, los procesos neuroinflamatorios y su influencia sobre los sistemas inmune y cardiovascular (Ortega, 2004).

Este amplio espectro de acción hace del sistema endocannabinoide una importante diana terapéutica para el tratamiento de numerosas enfermedades entre las que se incluyen trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, el Corea de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, procesos tumorales, así como otras alteraciones diversas, tales como la isquemia cerebral, el asma, el glaucoma, el dolor o la emesis inducida por tratamientos de quimioterapia (Ortega, 2004).

1.5 Actualidad

Debido a lo anteriormente señalado la industria farmacéutica hace ya unos años que trata de estandarizar los principios activos de esta especie botánica tanto en su formulación, composición y en su dosis. Esos caminos han llevado a la comercialización de algunos medicamentos como:

Cesamet®, nombre por el que se distribuye la nabilona, un análogo sintético del THC, que no es lo mismo que el cannabis sintético, es decir con la misma estructura para ser identificada por los receptores, pero con algunos cambios en su composición. Se utiliza como antiemético, para paliar síntomas como las náuseas y los vómitos consecuentes de tratamientos oncológicos (Alchimia, 2001).

Marinol® (dronabinol): otro análogo sintético del THC llamado dronabinol, tiene la apariencia de un aceite marrón. Tiene la misma indicación que Cesamet® y además se utiliza para paliar los síntomas del síndrome de anorexia/caquexia en pacientes con VIH o cáncer terminal. Cabe decir que los cannabinoides sintéticos han mostrado efectos secundarios por no ser administrados con sus antagonistas, como el CBD y otros, para el THC en la planta, que sirven para contrarrestar algunos efectos, por ello las farmacéuticas decidieron emprender la vía de

extracciones directas de la planta contemplando la importancia del abanico de cannabinoides (Alchimia, 2001).

Sativex®: A diferencia de los dos medicamentos anteriores Sativex® no es un cannabinoide sintético, sino que es un extracto de un fenotipo seleccionado y clonado con una cantidad de cannabinoides conocida, estandarizada y homogénea que, básicamente, contiene THC y CBD. Está indicado, por el momento, en pacientes con esclerosis múltiple y para tratar el dolor en pacientes con cáncer (Alchimia, 2001).

A nivel nacional en diciembre de 2015, el Poder Ejecutivo autorizó, por medio de Decreto Supremo la importación y venta para fines medicinales, de medicamentos que contengan cannabis, bajo receta médica retenida.

El 10 de mayo del 2017, se produjo la importación limitada de un medicamento a base de fitocannabinoides, los cuales estarán a la venta en 2 locales de la Farmacia El Carmen, de Santiago. Estos medicamentos se venderán a pacientes que lo requieran, bajo prescripción médica. Se trata de los productos T100 y TC100, del laboratorio canadiense Tilray.

Dado la apertura de nuestro país al mercado farmacéutico internacional y la eventual fabricación de medicamentos a base de esta especie botánica a nivel local, es que resulta menester asegurar la calidad, eficacia y seguridad de estos productos, para que los pacientes puedan consumirlos sin problemas. En este contexto es necesario contar con técnicas y metodologías analíticas que respalden estos requerimientos. Es en esta instancia donde el Laboratorio Externo de Control de Calidad (QUIFAC), que es una unidad perteneciente a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, el cual se encuentra autorizado por el Instituto de Salud Pública, jugaría un papel fundamental en satisfacer las demandas de este mercado con respecto a la legislación sanitaria vigente.

En este trabajo entonces se entrega una herramienta analítica, previamente validada, con el fin de estandarizar productos farmacéuticos fabricados a base de *Cannabis sativa* L. los cuales pueden provenir de fuentes naturales o preparados farmacéuticos. Para esto se utilizará la técnica cromatografía gaseosa de llama para identificar y cuantificar THC y CBD provenientes de diversas matrices.

1.6 Cromatografía de gases

La cromatografía de gas permite separar los componentes de una muestra vaporizada en virtud de que éstos se distribuyen entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida o sólida contenida en una columna. La muestra que se va a analizar se lleva a la fase gaseosa y se inyecta en una de las cabezas de la columna cromatográfica. La elución de los componentes se realiza mediante el flujo de una fase gaseosa móvil que, a diferencia de otros métodos cromatográficos, es inerte y no interactúa con las moléculas de las especies de la muestra; solo las transporta a través de la columna.

El fundamento de la cromatografía de gas-líquido es la separación del analito entre una fase gaseosa móvil y una fase líquida estática adherida en la superficie de un empaque sólido inerte o en las paredes de una columna capilar.

El cromatógrafo de gases es el equipo que realiza la cromatografía gaseosa, el cual consta con un sistema de integración electrónica y con procesadores de datos manejados por computadora y que entre sus componentes encontramos el sistema de gas acarreador, sistema de inyección de la muestra, detectores, y columnas.

Como se mencionó anteriormente la fase gaseosa móvil de un cromatógrafo de gases debe ser químicamente inerte, por lo cual se utiliza gas helio; aunque también pueden emplearse otros gases como argón, hidrógeno o nitrógeno, cabe destacar que es este último el gas utilizado en el presente trabajo. Ya que los gases vienen comprimidos en tanques de presión, es necesario disponer de reguladores de presión y manómetros para controlar la velocidad de flujo del gas. Las presiones que se alcanzan en la entrada de la columna van de 10 a 50 psi y proporcionan un flujo de 25 a 50 mL/min.

Para optimizar la eficacia de la columna cromatográfica, es indispensable que la muestra tenga el tamaño adecuado para inyectarla, si las muestras son voluminosas o se inyectan lentamente, se obtienen bandas muy anchas o su resolución es pobre. Las muestras líquidas se inyectan con microjeringas calibradas a través de un diafragma o septo de caucho o de silicona que desemboca en una cavidad donde se calienta la muestra antes de pasar a la cabeza de la columna. La temperatura que se alcanza en esta cavidad es de unos 50°C por arriba del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra.

Los sistemas de detección para la cromatografía de gases deben responder rápidamente a las pequeñas concentraciones de solutos que salen de la columna.

En cualquier instante, la concentración de soluto en el gas acarreador no llega a más de unas cuantas partes por mil, y a menudo es de dos órdenes de magnitud menor. Además, como el tiempo que tarda en pasar un pico de señal por el detector suele ser de un segundo (o menos), es imprescindible que éste responda totalmente a dicho lapso. Otras propiedades del detector incluyen que debe dar una respuesta rápida, que sea lineal, estable y uniforme para gran variedad de especies químicas; o de manera alternativa, la respuesta debe ser selectiva y predecible hacia uno o varios tipos de soluto. Sin embargo, no existe un solo detector que cumpla con todos estos requisitos.

De todos los detectores empleados en la cromatografía de gases, el de ionización de llama es tal vez el que presenta mayores aplicaciones, y es también el método que se validó para determinar cannabinoides a través de esta tesis. Muchos de los componentes orgánicos que se someten a pirólisis en la llama forman intermediarios iónicos que conducen electricidad. Cuando se emplea este tipo de detector, se mezcla hidrogeno con el gas acarreador, y el eluyente mezclado con oxígeno se quema en un mechero equipado con un par de electrodos. El detector registra la corriente generada por el cúmulo de iones y electrones producidos en los electrodos durante el proceso de combustión. El detector de ionización de llama es muy sensible, poco ruidoso y da una respuesta bastante lineal, además de resistente y fácil de usar. Su principal desventaja es que destruye la muestra durante la etapa de combustión.

Las columnas que se emplean en cromatografía de gases son de dos tipos: columnas capilares o columnas empacadas. Estas últimas tienen capacidad para muestras más grandes y son más versátiles que las primeras; mientras que las columnas capilares tienen una resolución inigualable.

SPB-5 Capillary GC Column utilizada en este trabajo, corresponde a una columna capilar, las cuales en su mayoría se fabrican con sílice fundida bastante pura para reducir al mínimo los residuos de óxidos metálicos. Los tubos tienen un diámetro interno de 0,1 a 0,5 mm, y se les da mayor resistencia recubriéndolos con una capa protectora de poliimida que se aplica al momento de hacer el capilar. Las columnas llegan a ser muy flexibles y pueden enrollarse en forma de serpentín hasta alcanzar un diámetro de unos cuantos centímetros. Las columnas tubulares abiertas de sílice que se consiguen comercialmente son bastante resistentes, flexibles y presentan baja reactividad hacia muchos componentes de la muestra. La fase líquida inmovilizada en una columna para cromatografía de gases deberá reunir las siguientes propiedades: ser poco volátil (idealmente, su punto de ebullición deberá estar a más de 100°C de la máxima temperatura de operación de la columna); tener estabilidad térmica; ser químicamente inerte y exhibir características de disolvente (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2001).

1.7 Validación de un método analítico

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables.

Lo que se busca entonces al validar el método por cromatografía gaseosa es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para la determinación de cannabinoides, así como también demostrar que las modificaciones que se le han de realizar no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados entregados. En este sentido, es importante que la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable (Instituto Salud Pública de Chile, 2010).

En relación a los parámetros de validación por tratarse de un método cuantitativo se evaluará linealidad, sensibilidad, límites, precisión, exactitud y aplicabilidad. Es importante también destacar que la validación se realizará de acuerdo a la guía "Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos" del Instituto de Salud Pública de Chile del año 2010 (ISPCh, 2010) y la USP 36 del año 2013.

Linealidad

Es la capacidad de un método de análisis, dentro un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra.

Sensibilidad

Es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición. Se dice que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito.

Límites

Se debe tener en consideración los siguientes parámetros: Valor crítico, límite de detección y límite de cuantificación.

Valor crítico (LC):

El valor de la concentración o cantidad neta que en caso de superarse da lugar, para una probabilidad de error dada α , a la decisión de que la concentración o cantidad del analito presente en el material analizado es superior a la contenida en el material testigo.

Límite de detección (LOD):

Concentración o cantidad real del analito presente en el material objeto de análisis que llevará, con una probabilidad $(1-\beta)$, a la conclusión de que la concentración o cantidad del analito es mayor en el material analizado que en el material testigo.

Límite de cuantificación (LOQ):

Una característica del funcionamiento del método que suele expresarse como señal del valor (verdadero) de la medición que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa generalmente de 10 %.

Precisión:

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados.

Repetibilidad:

Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo.

Reproducibilidad:

Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, en intervalos de tiempo más prolongados, entre otros.

Exactitud

Grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia. El término “exactitud” esta aplicado a un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo.

Veracidad:

determina el grado de coincidencia entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad puede ser determinada por sesgo o recuperación.

- Sesgo (s): la diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una mediación y el valor verdadero. El sesgo es el error sistemático total.

Incertidumbre:

El término incertidumbre analítica se asocia con las discrepancias entre las mediciones y corresponde al promedio de los desvíos absolutos (Picado & Álvarez, 2008).

Aplicabilidad:

Se utiliza el término de Aplicabilidad, cuando un método de análisis puede utilizarse satisfactoriamente para los analitos, matrices y concentraciones previstas. La declaración de aplicabilidad, además de una declaración del margen de funcionamiento satisfactorio para cada factor, puede incluir también advertencias acerca de la interferencia conocida de otros analitos, o de la inaplicabilidad a determinadas matrices y situaciones.

1.8 Idoneidad del sistema analítico

La determinación de la idoneidad del sistema corresponde a ensayos que se utilizan para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar y que entregue una respuesta confiable y eficiente (González Álvarez, Cabrera Pérez, & Bermejo Sanz, 2015). Para este trabajo se midió número de platos teóricos y factor de asimetría.

Numero de platos teóricos (N): corresponde a cortes o rodajas imaginarios de la columna cromatográfica, donde se consigue un equilibrio transitorio antes de que

la fase móvil avance hacia la próxima rodaja. La eficacia de la columna y por ende su poder separativo y de proporcionar bandas de elución estrechas se mide en función de los platos teóricos (González Álvarez, Cabrera Pérez, & Bermejo Sanz, 2015), (Legaz González, San Cristóbal, Díaz Peña, Alarcón Aguarales, & Vicente Córdoba, 2011). Se calcula por la siguiente ecuación:

$$N = 16 (t_R/W)^2$$

Donde:

T_R = Tiempo de retención

W = Ancho del pico en la base

Factor de asimetría (A_s): una señal perfectamente simétrica proporcionará una minimización en las imprecisiones de detección del inicio y final del pico por lo que permitirá una mejor y más precisa cuantificación (González Álvarez, Cabrera Pérez, & Bermejo Sanz, 2015).

Donde $W_{0,05}$ es el ancho del pico al 5% de la altura y f es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura desde la línea base (Farmacopea de los Estados Unidos de América, Formulario Nacional, USP 36 NF31, 2013).

$$A_s = W_{0,05}/2f$$

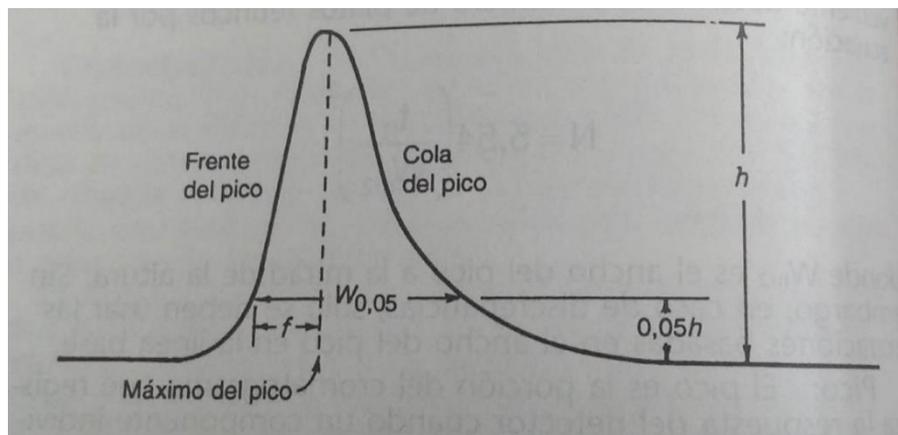


Figura 3. Esquema de triangulación de un pico Gaussiano, indicando los valores anchura (W) (USP36, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 General:

- Validar un método analítico basado en la técnica instrumental cromatografía gaseosa acoplada a un detector FID, con la finalidad de identificar y cuantificar THC y CBD en matrices de origen botánico y en preparados de uso farmacéutico.

2.2 Específicos:

- Diseñar y desarrollar una metodología analítica utilizando cromatografía gaseosa con detector FID, determinando las condiciones instrumentales óptimas para una correcta separación y resolución del contenido de THC y CBD de una muestra.
- Evaluar los parámetros estadísticos y características analíticas para validar la metodología propuesta, según la USP 36 y el protocolo de validación editado por el ISPCh. Los parámetros a evaluar son linealidad, sensibilidad, límites, precisión, exactitud, entre otros.
- Evaluar la aplicabilidad de la metodología analítica validada para la determinación de THC y CBD en matrices de origen botánico y en productos farmacéuticos a base de estos cannabinoides como principios activos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Muestras

- Extracto etanolico de cannabis preparado en lab. QUIFAC.
- “Aceite” de cannabis artesanal de dudosa procedencia.
- Extracto etanolico de cannabis preparado por un laboratorio X con fines farmacéuticos.

Materiales de laboratorio

- Matraces aforados Hatom 25 mL.
- Micropipeta Eppendorf 1000 μ L.
- Jeringa Hamilton 10 μ L.
- Filtros de jeringa Clarinert de 0,45 μ m.

Equipos laboratorio

- Cromatógrafo de gases- detector de ionización de llama (GC-FID) Perkin-Elmer AUTOSystem XL.

3.2 Reactivos

- Estándar THC 1mg/mL Cerilliant.
- Estándar THC 0,1 mg/mL LGC.
- Estándar CDB 1mg/mL Cerilliant.
- Gases: Nitrógeno, Hidrógeno y Aire ultrapuros Air liquide.
- Metanol p.a Merck.

3.3 Metodología

Este análisis se basa en la metodología que describe American Herbal Pharmacopoeia (AHP), con modificaciones realizadas para este trabajo.

Condiciones cromatográficas:

Columna	SPB-5 Capillary GC Column. 30 m x 0,53 mm x 1,50 μ m. Sigma-Aldrich
Fase móvil	Nitrógeno ultrapuro. Air Liquide
Presión del carrier	25 psi
Volumen de inyección	4 μ L
Modo de inyección	Split Off
Temperatura de inyector	280 °C
Programa de temperatura	200 °C (mantener por 2 min.) a 250 °C (mantener por 10 min.) a 10 °C /min, 17 min de corrida total
Temperatura del detector FID	300 °C
Gases de combustión	Hidrógeno y aire ultrapuros
Orden de elución	CBD y THC

3.4 Validación del método analítico.

3.4.1 Parámetros de Linealidad

Con el fin de determinar el rango lineal se realizó un gráfico de cantidad versus respuesta para THC y CBD, ambos de concentración estándar 1 mg/mL; para ello se tomaron alícuotas entre 4 a 0,5 μ L y entre 4 a 0,1 μ L respectivamente.

A partir de cada curva de calibración se obtuvo un coeficiente de correlación(r), el cual debe tener un valor muy cercano a 1 ($\geq 0,999$) para que la respuesta se considere lineal (ISPCh, 2010).

3.4.2 Parámetros de Sensibilidad

Se determinó el parámetro de sensibilidad para THC y CBD a través de la pendiente (m) obtenida de sus respectivas curvas de calibración. A mayor pendiente más sensible es el método.

3.4.3 Cálculo de Límites

Se inyectaron alícuotas de 4 µL de concentraciones estándares de 1 mg/mL, tanto de THC como de CBD, en 6 oportunidades, como es lo recomendado. Se realizaron los cálculos mediante las siguientes fórmulas, para un valor de α 0,05, donde DS corresponde a la desviación estándar de la respuesta.

Valor crítico (LC):

$$LC = 1,645 \times DS$$

Límite de detección (LOD):

$$LOD = 3,29 \times DS$$

Límite de cuantificación (LOQ):

$$LOQ = 10 \times DS$$

Un criterio de aceptabilidad adecuado es $LC < LOD \ll LOQ$.

3.4.4 Parámetros de precisión

Se estableció precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad de la lectura analítica en relación al área bajo la curva obtenida a través de los perfiles cromatográficos.

Para determinarla se calculó desviación Estándar (DS) y porcentaje de coeficiente de variación (CV%).

El criterio de aceptabilidad se realizó en base al coeficiente de variación de Horwitz:

$$CV_h\% = 2^{1-0,5\text{Log } C}$$

Donde:

C= valor nominal del analito expresado en potencia de 10

Repetibilidad:

Para medir este parámetro se inyectaron alícuotas de 4 μL de concentraciones estándares de 1 mg/mL, tanto de THC como de CBD, en 9 y 10 oportunidades, respectivamente, por un mismo analista y en un mismo día.

El criterio utilizado para la repetibilidad, es que el valor del CV% obtenido debe ser menor a $CV_h\%/2$.

Reproducibilidad:

Tanto para THC como CBD se repitieron las mediciones bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, pero 15 días después de las mediciones para repetibilidad. Cabe destacar que en este caso, se utilizó un estándar certificado de THC de concentración 0,1 mg/mL, ya que el anterior se agotó por uso.

El criterio utilizado para la reproducibilidad intralaboratorio, es que el valor del CV% obtenido debe ser menor a $2CV_h\%/3$.

3.4.5 Parámetros de Exactitud

La exactitud se determinó en términos de incertidumbre y veracidad, los cuales fueron calculadas a partir de concentraciones estándar de 1 mg/mL, tanto de THC como de CBD, inyectando 4 μL en 9 y 10 oportunidades, respectivamente.

Veracidad

Veracidad se determinó como sesgo.

➤ **Sesgo:**

Se determinó la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido. Cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad indica el método.

$$s = X - X_a$$

Donde:

s= sesgo

X= lectura obtenida o valor promedio de las lecturas obtenidas.

X_a= valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado

Para evaluar el sesgo, se realizó la prueba t-Student, en la cual

$t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabla}}$:

$$t_{\text{calc}} = \frac{[X_a - X]}{DS \times \sqrt{n}}$$

Donde:

t_{calc} = t observado o calculado

X_a = Valor esperado o valor certificado en concentración

X = Promedio de valores leídos u observados en concentración

DS = Desviación estándar

n = Número de lecturas o valores observados.

Incertidumbre

Se calculó la diferencia entre el promedio de las lecturas obtenidas y la desviación estándar, determinando de esta forma un rango de concentración aceptable, dentro del cual debe encontrarse la concentración certificada.

$$X \pm DS$$

Donde:

X : promedio de las lecturas obtenidas

DS : desviación estándar

3.4.6 Aplicabilidad

Para comprobar el ámbito de aplicabilidad del método estudiado, se analizaron tres matrices diferentes que contienen THC y CBD.

- Matriz 1: Un extracto etanólico obtenido del cultivar Wappa de la especie *Cannabis sativa* L., preparado en el laboratorio QUIFAC.
- Matriz 2: Un extracto etanólico de la especie *Cannabis sativa* L., de uso farmacéutico, preparado por un laboratorio "X".
- Matriz 3: Un "aceite" artesanal, supuestamente de *Cannabis sativa* L., de dudosa procedencia y origen desconocido.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Parámetros de Idoneidad del Sistema

Los valores obtenidos para los parámetros de idoneidad del sistema, tanto para THC como para CBD, se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 1: Parámetros de idoneidad y límites propuestos para THC (USP 36,2013)

THC	Parámetros	Resultados	Valor límite	Cumple
	Número de platos teóricos	5184,00	$N > 2000$	Sí
	Factor de asimetría	1	$As \leq 1,5$	Sí

Tabla 2: Parámetros de idoneidad y límites propuestos para CBD (USP 36, 2013)

CBD	Parámetros	Resultados	Valor límite	Cumple
	Número de platos teóricos	4160,25	$N > 2000$	Sí
	Factor de asimetría	1	$As \leq 1,5$	Sí

Por lo tanto, el sistema es apto para llevar a cabo el estudio de los parámetros estadísticos y características analíticas que lleven a la posterior validación del método propuesto.

4.2 Validación del método analítico

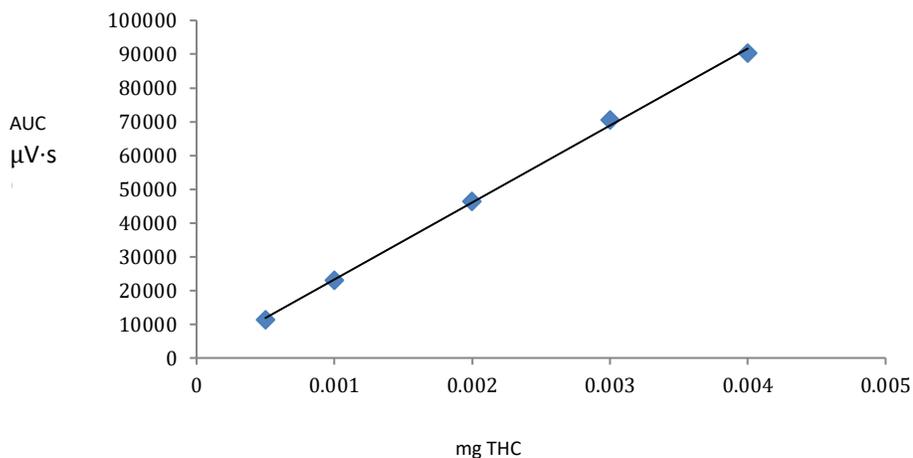
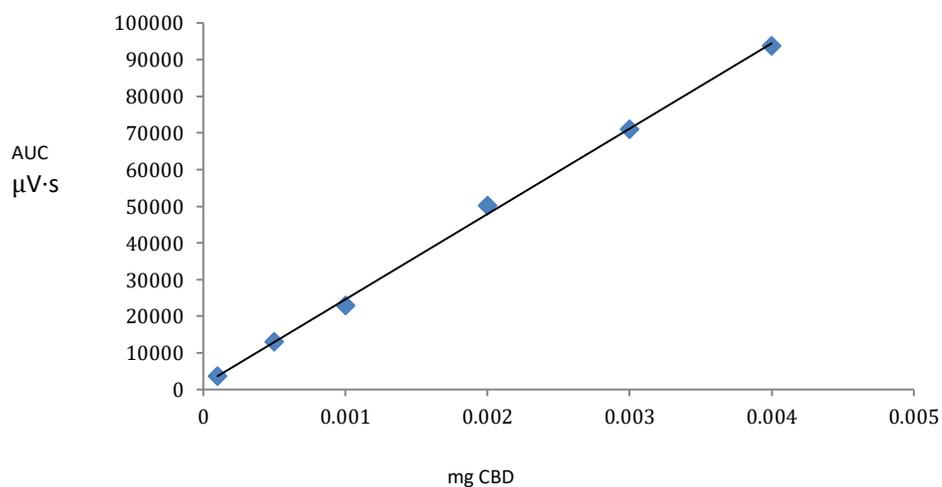
4.2.1 Parámetros de Linealidad

La ecuación de la recta y los valores del coeficiente de correlación “r” se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3: Ecuaciones de la recta y coeficientes de correlación “r” para curvas de calibrado de THC y CBD

Estándar	Ecuación de la recta	Coeficiente de correlación “r”
THC	$y = 22810858,05x + 437,31$	0,9993
CBD	$y = 23286730,23x + 1294,1$	0,9993

Al obtener valores de “r” muy cercanos a 1, se puede decir que existe correlación lineal en las mediciones obtenidas con una probabilidad elevada ($\alpha = 0,05$). Gráficamente se observa dicho comportamiento en los siguientes gráficos:

Gráfico 1: Curva de calibrado para estándar de THC (mg THC vs AUC $\mu\text{V}\cdot\text{s}$)Gráfico 2: Curva de calibrado para estándar de CBD (mg CBD vs AUC $\mu\text{V}\cdot\text{s}$)

4.2.2 Parámetros de Sensibilidad

Por definición, la sensibilidad de una metodología analítica está determinada por el valor de la pendiente de la curva de calibrado (m). Para ambos analitos, los resultados son los siguientes:

Tabla 4: Pendientes (m) de la curva de calibrado de THC y CBD.

Analito	pendiente (m)
THC	22810858,05
CBD	23286730,23

Numéricamente se observa que ambas pendientes son bastante altas, lo que significa que el método es bastante sensible para ambas especies químicas. No obstante, el método es un poco más sensible para CBD, lo que contrasta con los resultados obtenidos para los Límites, desarrollados a continuación.

4.2.3 Cálculo de Límites

Los resultados para el cálculo del Valor crítico (LC), Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ) para THC y CBD se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 5: Cálculo de límites para la determinación de THC y CBD (ISPCh, 2010)

Estándar	LC (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
THC	0,010	0,020	0,060
CBD	0,002	0,005	0,014

De lo anterior se cumple que $LC < LOD \ll LOQ$, por lo que este sería un criterio de aceptabilidad adecuado con un nivel de confianza razonable.

4.2.4 Parámetros de Precisión

Repetibilidad:

Los resultados obtenidos (tiempo de retención promedio, área promedio del pico cromatográfico, las DS y el %CV de cada analito), se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 6: Cálculo de precisión para tiempos de retención y área del pico de estándar de THC.

Lectura	tiempo de retención (min)	Area bajo la curva ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
1	7,207	94244,28
2	7,208	85931,96
3	7,212	87641,13
4	7,203	88681,37
5	7,224	90415,99
6	7,211	90288,95
7	7,203	88908,55
8	7,200	90789,15
9	7,228	91006,14
Promedio	7,211	89767,50
DS	0,010	2357,50
CV%	0,133	2,63

Tabla 7: Cálculo de precisión para tiempos de retención y área del pico de estándar de CBD.

Lectura	tiempo de retención (min)	Area bajo la curva ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
1	6,447	93159,87
2	6,435	92484,88
3	6,428	95512,51
4	6,427	91968,31
5	6,421	95289,50
6	6,445	93511,69
7	6,432	93956,64
8	6,490	94266,62
9	6,425	93758,66
10	6,418	94926,31
Promedio	6,437	93883,50
DS	0,021	1162,93
CV%	0,325	1,24

Los resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad se encuentran dentro de los criterios de aceptabilidad, ya que, los CV% de cada estándar (THC y CBD, ambos de concentración 1 mg/mL) son inferiores al coeficiente calculado según la ecuación de Horwitz ($CV_h\%$):

$$CV_h\% = 0,5 \times 2^{1-0,5\text{Log}0,001} = 2,82\%$$

$$2,63\%_{\text{THC}} < CV_h\%$$

$$1,24\%_{\text{CBD}} < CV_h\%$$

Por lo tanto, se establece que el método analítico utilizado para estos analitos es preciso.

Reproducibilidad:

Las siguientes tablas resumen los resultados obtenidos para este evento:

Tabla 8: Cálculo de precisión para tiempos de retención y área del pico de estándar de THC.

Lectura	tiempo de retención (min)	Area bajo la curva ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
1	7,259	6528,63
2	7,247	6548,95
3	7,249	6588,61
4	7,237	6452,12
5	7,249	6486,15
6	7,231	6445,97
7	7,224	6500,62
8	7,232	6489,29
9	7,253	6475,69
10	7,235	6471,89
Promedio	7,242	6498,79
DS	0,011	44,66
CV%	0,156	0,69

Tabla 9: Cálculo de precisión para tiempos de retención y área del pico de estándar de CBD.

Lectura	tiempo de retención (min)	Area bajo la curva ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
1	6,524	96363,74
2	6,500	88760,93
3	6,484	93638,71
4	6,491	95860,32
5	6,509	94275,00
6	6,504	94247,75
7	6,486	95931,22
8	6,496	91853,20
9	6,489	92591,01
10	6,501	91167,59
Promedio	6,498	93468,95
DS	0,012	2410,38
CV%	0,186	2,58

Los resultados obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad se encuentran dentro de los criterios de aceptabilidad, ya que, los CV% de cada estándar (THC y CBD, de concentración 0,1 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente) son inferiores al coeficiente calculado según la ecuación de Horwitz ($CV_{hRI}\%$):

$$CV_{hRi}\% = \frac{2 \times 2^{1-0,5\text{Log}0,0001}}{3} = 5,33\% \text{ (para THC)}$$

$$0,69\%_{\text{THC}} < CV_{hRi}\%$$

$$CV_{hRi}\% = \frac{2 \times 2^{1-0,5\text{Log}0,001}}{3} = 3,77\% \text{ (para CBD)}$$

$$2,58\%_{\text{CBD}} < CV_{hRi}\%$$

En base a estos resultados, se cumple el criterio de aceptabilidad para el parámetro de reproducibilidad.

4.2.5 Parámetros de Exactitud

Dado que se utilizaron estándares de referencia certificados de THC y CBD, ambos de concentración 1 mg/mL (X_a) para la validación del método cromatográfico, se procedió a calcular la incertidumbre y el error sistemático o sesgo.

Sesgo

Las siguientes tablas resumen los resultados para el cálculo del sesgo para ambos estándares:

Tabla 10: Cálculo del sesgo para el estándar de THC.

Lectura	X_i (mg/mL)	$X_i - X_a = \text{sesgo}$
1	1,028	0,027
2	0,938	-0,063
3	0,955	-0,045
4	0,968	-0,033
5	0,985	-0,015
6	0,985	-0,015
7	0,970	-0,030
8	0,990	-0,010
9	0,993	-0,008
Promedio	0,979	
DS	0,026	

Tabla 11: Cálculo del sesgo para el estándar de CBD.

Lectura	Xi(mg/mL)	Xi-Xa = sesgo
1	0,985	-0,015
2	0,980	-0,020
3	1,013	0,013
4	0,973	-0,028
5	1,010	0,010
6	0,990	-0,010
7	0,995	-0,005
8	0,998	-0,003
9	0,993	-0,008
10	1,005	0,005
Promedio	0,994	
DS	0,013	

Para ambos estándares se observan valores de sesgo bastante pequeños, lo que indica de manera preliminar una mayor veracidad del método analítico. No obstante, para evaluar estadísticamente el sesgo se debe realizar la prueba t-Student, para lo cual el $t_{\text{calculado}}$ debe ser menor al $t_{\text{crítico}}$ o de tabla, es decir no deben existir diferencias significativas entre los valores obtenidos y el valor de referencia.

Para un nivel de significancia de un 95% se obtuvieron los siguientes resultados:

Para THC:

$$t_{\text{calculado}} = [1 - 0,979] / 0,026 \times \sqrt{9} = 0,269$$

$$0,269 < 2,306$$

Para CBD:

$$t_{\text{calculado}} = [1 - 0,994] / 0,013 \times \sqrt{10} = 0,146$$

$$0,146 < 2,262$$

Por lo tanto, para ambos analitos no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos y el valor referencial. En conclusión, el método utilizado es aceptable y, por ende, tanto su veracidad como exactitud es aceptable.

Cálculo de Incertidumbre

THC						Valor de incertidumbre
Lectura	Xi (mg/mL)	Promedio	Xi-Promedio	(Xi-Promedio) ²	$\Sigma(\text{Xi-Promedio})^2/n-1$	$\sqrt{\Sigma(\text{Xi-Promedio})^2/n-1}$
1	1,028	0,979	0,048	0,002352	0,00065	0,026
2	0,938	0,979	-0,042	0,001722		
3	0,955	0,979	-0,024	0,000576		
4	0,968	0,979	-0,012	0,000132		
5	0,985	0,979	0,006	0,000036		
6	0,985	0,979	0,006	0,000036		
7	0,970	0,979	-0,009	0,000081		
8	0,990	0,979	0,011	0,000121		
9	0,993	0,979	0,013	0,000182		
Suma	8,810			0,005239		
Promedio	0,979					
DS	0,026					

Valor para THC = 0,979 mg/mL \pm 0,026 mg/mL

Rango de concentración aceptable = [0,953 - 1,005] mg/mL

CBD						Valor de incertidumbre
Lectura	Xi (mg/mL)	Promedio	Xi-Promedio	(Xi-Promedio) ²	$\Sigma(\text{Xi-Promedio})^2/n-1$	$\sqrt{\Sigma(\text{Xi-Promedio})^2/n-1}$
1	0,985	0,994	-0,009	0,000081	0,00017	0,013
2	0,980	0,994	-0,014	0,000196		
3	1,013	0,994	0,019	0,000342		
4	0,973	0,994	-0,022	0,000462		
5	1,010	0,994	0,016	0,000256		
6	0,990	0,994	-0,004	0,000016		
7	0,995	0,994	0,001	0,000001		
8	0,998	0,994	0,003	0,000012		
9	0,993	0,994	-0,002	0,000002		
10	1,005	0,994	0,011	0,000121		
Suma	9,940			0,001490		
Promedio	0,994					
DS	0,013					

Valor para CBD = 0,994 mg/mL \pm 0,013 mg/mL

Rango de concentración aceptable = [0,981 - 1,007] mg/mL

4.2.6 Aplicabilidad

Los resultados promedios obtenidos por triplicado para cada matriz se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 12: Resultados expresados como promedio \pm DS, para THC y CBD del análisis de la Matriz 1

Analito	tiempo de retención (min)	Area bajo la curva ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Concentración (mg/mL)
THC	7,345 \pm 0,030	215989,64 \pm 2631,29	2,362 \pm 0,029
CBD	6,466 \pm 0,034	12971,52 \pm 1840,29	0,125 \pm 0,020

Tabla 13: Resultados expresados como promedio \pm DS, para THC y CBD del análisis de la Matriz 2

Analito	tiempo de retención (min)	Area bajo la curva ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Concentración (mg/mL)
THC	7,422 \pm 0,018	349547,54 \pm 2651,41	95,427 \pm 0,722
CBD	6,527 \pm 0,011	179865,12 \pm 1464,16	47,938 \pm 0,390

Tabla 14: Resultados expresados como promedio \pm DS, para THC y CBD del análisis de la Matriz 3

Analito	tiempo de retención (min)	Area bajo la curva ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Concentración (mg/g aceite)
THC	7,202 \pm 0,015	27684,85 \pm 610,19	1,522 \pm 0,037
CBD	6,411 \pm 0,010	53873,14 \pm 1876,46	2,882 \pm 0,104

Como se observa, en las tres matrices se evidencia la presencia de THC y CBD. La proporción de estos analitos depende principalmente de la naturaleza del extracto y del cultivar de la especie *Cannabis sativa* L. utilizado para su fabricación.

Para el caso de la Matriz 1, la proporción THC : CBD \approx 19 : 1, lo que coincide con datos bibliográficos de productores de este cultivar, el cual se caracteriza por poseer elevadas concentraciones de THC, contrastadas con bajas cantidades de CBD. Cabe destacar que la concentración de cannabinoides en una especie botánica depende, además de su genética, a las condiciones atmosféricas y de suelos donde esta se desarrolla.

Por otro lado, para la Matriz 2, la proporción THC : CBD \approx 2 : 1. Este tipo de proporción es una de las más utilizadas para la fabricación de medicamentos a base de cannabinoides, al igual que la proporción THC : CBD = 1 : 1. En este caso particular, este extracto debe ser diluido a concentraciones de THC y CBD menores a la obtenida, de acuerdo a las dosis establecidas farmacológicamente para el tratamiento de patologías asociadas al uso de este medicamento.

Finalmente, para la Matriz 3, la proporción THC : CBD \approx 1 : 2, en la que predomina la especie química CBD. En este caso en particular, si bien es cierto que se logró cuantificar este “aceite”, este método no asegura la naturaleza de la matriz, es decir, no podemos asegurar que se trate de un producto natural obtenido por procesos extractivos a partir de *Cannabis sativa* L., o en su defecto, sea un preparado al cual se le adicionaron de manera externa los analitos en estudio.

En definitiva, sea cual sea el tipo de matriz analizada, estas pruebas de aplicabilidad resultaron ser exitosas para la estandarización de THC y CBD, obteniendo resultados que reflejan eficacia, sensibilidad, reproducibilidad, selectividad y precisión.

Tanto la AHP como la UNODC recomiendan y describen metodologías analíticas para identificar y cuantificar cannabinoides, utilizando la técnica cromatografía gaseosa con detector FID. Sin embargo, el método desarrollado y validado en este trabajo de internado ofrece algunas ventajas por sobre estas técnicas.

En primer lugar el gas “carrier” utilizado en la técnica descrita por la AHP, corresponde a helio, el cual es un gas noble de un elevado precio por cilindro. Por otro lado, el “carrier” utilizado por la UNODC corresponde a hidrógeno, un gas bastante peligroso de manejar, ya que es altamente inflamable. Por el contrario, el “carrier” utilizado en este trabajo corresponde a nitrógeno, el cual es un gas bastante accesible, inerte y lo más importante, de un precio por cilindro muy por debajo de otros gases nobles, lo que convierte a este método, no sólo en un método eficiente, sino que también económico.

Además, el sistema con inyección dividida presenta algunos problemas cuando se requieren resultados cuantitativos precisos, esto debido principalmente a la variación en la relación de división del carrier que provoca cambios temporales en la presión o la viscosidad de la mezcla de inserción; vaporización incompleta de gotitas; falta de homogeneidad de la mezcla portadora de muestra resultante; y adsorción térmica o química, lo cual se ve reflejado en las áreas de los picos. En este caso en particular se utilizó “splitless” lo que asegura un resultado más preciso. (Kaufman & Polymeropoulos, 1988)

Otra diferencia radica en la columna utilizada, si bien se pueden usar varios tipos de columnas analíticas para la separación de cannabinoides, las más comunes son columnas de fase estacionaria no polares de pequeño diámetro. En el presente trabajo se utilizó SPB-5 Capillary GC Column. 30 m x 0,53 mm x 1,50 μ m. Sigma-Aldrich, en la cual la fase estacionaria corresponde a 5% difenil 95% dimetil silicona, la que no posee la polaridad suficiente para separar totalmente el

CBD del cannabícromeno, lo que podría afectar el resultado de CBD obtenido. (Ruppel, Kuffel, PerkinElmer, & Shelton)

Además es importante destacar que el método por cromatografía gaseosa no permite determinar los componentes ácidos de THC y CBD (THCA y CBDA, respectivamente), debido a que ambos son térmicamente lábiles y se convierten en THC y CBD por descarboxilación durante el calentamiento de la muestra en el puerto del inyector. Debido a que THCA tiene algunas propiedades terapéuticas que pueden ser deseables para algunos pacientes, en algunos casos es de interés determinar su concentración; para ello es necesario realizar una derivatización previa de la muestra. (Ruppel, Kuffel, PerkinElmer, & Shelton), (Oficina de las naciones unidas contra las drogas y el delito, 2010).

Otra limitante no menos importante es la necesidad de contar con estándares certificados de los cannabinoides a analizar. Esta limitante no sería de importancia al utilizar un detector de masa acoplado al cromatógrafo de gases.

Un parámetro de validación interesante de estudiar sería la robustez del método analítico, ya que este dato nos estaría indicando el comportamiento del sistema cuando se cambian algunas variables críticas que condicionan los resultados. Una de estas variables es la temperatura, tanto de la columna como del inyector.

Por todo lo anteriormente expuesto, se puede concluir de manera fehaciente que el método desarrollado y validado en este trabajo de internado es apto para su utilización en la identificación y cuantificación de THC y CBD, ya que es un método eficiente, rápido y económico; pero que no es recomendado si se requieren determinar las formas ácidas de THC y CBD, ni tampoco para determinar otros cannabinoides diferentes a los recién mencionados.

5. CONCLUSIONES

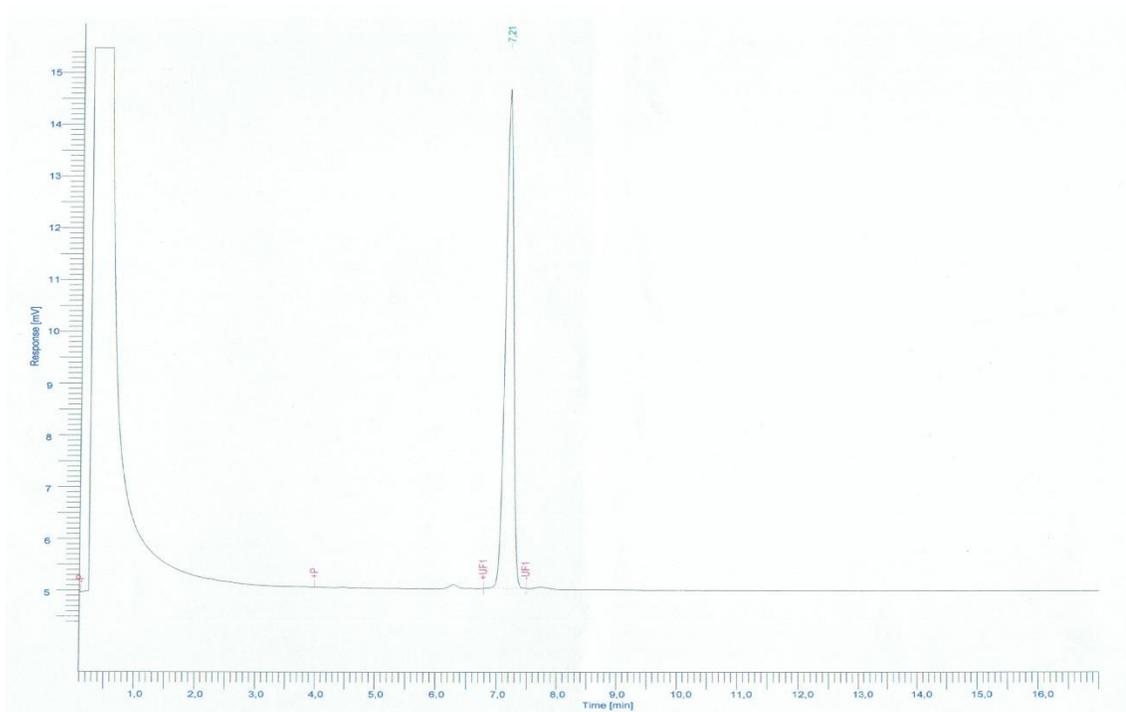
- La metodología analítica desarrollada por cromatografía gaseosa con detector FID, bajo condiciones especificadas, permite la cuantificación del contenido de THC y CBD.
- La metodología desarrollada cumple con las características analíticas utilizadas para la validación de métodos, según USP 36 y el ISPCCh. Entrega resultados proporcionales a la concentración del analito, lo que demuestra linealidad. El método es preciso ya que entrega resultados repetitivos y reproducibles. Es exacto, específico y sensible.
- La metodología analítica desarrollada, de acuerdo a las condiciones analizadas, es aplicable para la determinación de THC y CBD en matrices de origen botánico y en productos farmacéuticos con estos cannabinoides como principios activos.

6. BIBLIOGRAFÍA

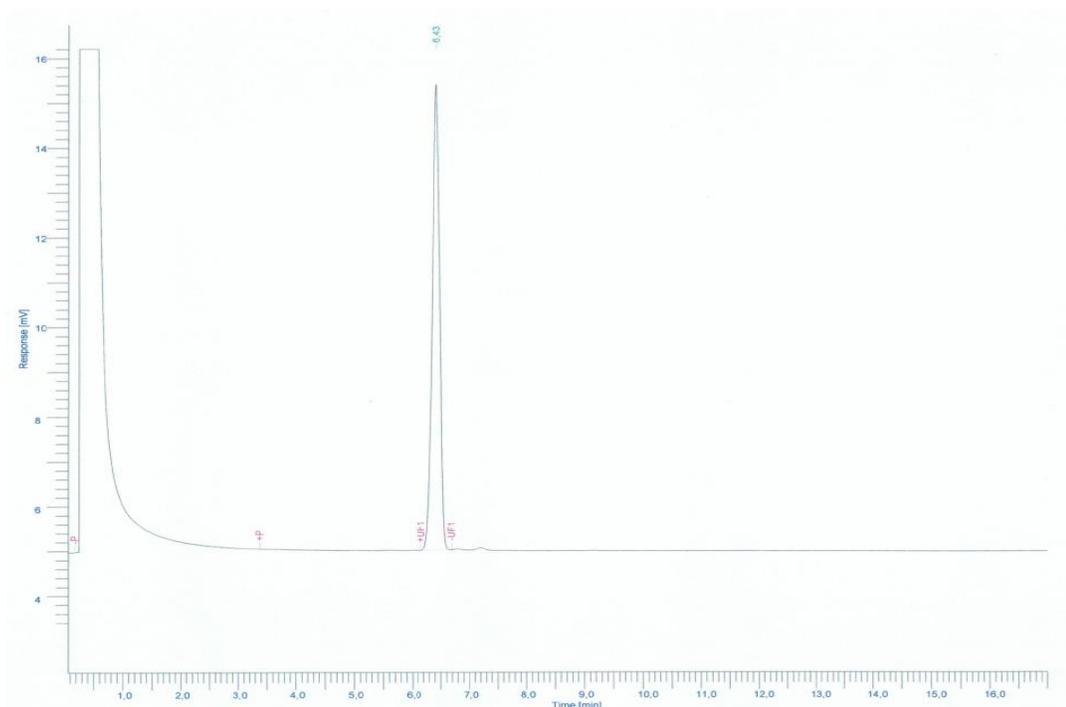
- Alchimia*. (2001). Recuperado el 15 de marzo de 2018, de <http://www.alchimiaweb.cl>
- Ángeles López, G. E., Brindis, F., Cristians Niizawa, S., & Ventura Martínez, R. (2014). Cannabis sativa L, una planta singular. *Revista mexicana de ciencias farmacéutica*.
- Escobar Toledo, I. E., Berrouet Mejía, M. C., & González Ramírez, D. M. (2009). Mecanismos moleculares de la adicción a la marihuana. *Revista colombiana de psiquiatría*, 38(1).
- Farmacopea de los Estados Unidos de América, Formulario Nacional, USP 36 NF31* (Vol. 1). (2013). Rockville: USP.
- Figuroa, D. A., Bravo, R., Triviño, I., & Hernández, G. (2015). *Guía técnica toxicología y análisis de cannabis y sus derivados*. Capítulo 2, Instituto de Salud Pública de Chile, Departamento de salud ambiental.
- Florian, N. M., Parada, F., & Garzón, W. F. (2009). *Estudio del contenido de cannabinoides en muestras de marihuana (cannabis sativa L.) cultivadas en varias regiones de Colombia*. Recuperado el 10 de junio de 2017, de Scielo: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042009000200008
- Fuente, J. R., Álvarez, D., Rodríguez, R., Ramos, L., Prospéro, O., Mesa, F., . . . Melgar, M. (2015). *Marihuana y Salud*. México: Fondo de Cultura Económica.
- González Álvarez, I., Cabrera Pérez, M. A., & Bermejo Sanz, M. (2015). *Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos*. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Grotenhermen, F. (2006). *Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide*. Hürth, Germany.
- Hazekamp, A., Fishedick, J. T., Llano, M., Lubbe, A., & Ruhaak, R. L. (2010). *Chemistry of Cannabis*. Leiden University. Leiden, The Netherlands: Elsevier Ltda.
- Instituto Salud Pública de Chile. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos"*. Guía técnica N°1, Departamento de salud ambiental, Santiago. Obtenido de <http://www.ispch.cl>
- Kaufman, & Polymeropoulos. (1988). *Study of the injection process in a gas chromatograph split injection port*. Mechanical and Aerospace Engineering. Amsterdam: Elsevier.
- Legaz González, M. E., San Cristóbal, M. S., Díaz Peña, E. M., Alarcón Agualeles, B., & Vicente Córdoba, C. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. *Reduca (Biología)*. Serie Técnicas y Métodos, 4, 1-32.

- Oficina de las naciones unidas contra las drogas y el delito. (2010). *Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis*. Manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes, sección de laboratorio y asuntos científicos, Nueva York.
- Ortega, S. (2004). *Estudio del proceso de recaptación de anandamida mediante la síntesis de inhibidores y evaluación de su aplicabilidad terapéutica*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Orgánica I, Madrid.
- Osorio, J. H., & Tangarife, H. F. (2009). *Cannabis, una opción terapéutica*. Recuperado el 6 de Junio de 2017, de Scielo: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v8n1/v8n1a19.pdf>
- Pascual Simón, J. R., & Fernández Rodríguez, B. L. (marzo de 2017). *Scielo*. Recuperado el 22 de marzo de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192017000300014&lng=es&tlng=es.
- Picado, A. B., & Álvarez, M. (2008). *Química I: introducción al estudio de la materia*. San José, Costa Rica: EUNED.
- Ruppel, T. D., Kuffel, N., PerkinElmer, I., & Shelton, C. (s.f.). *Cannabis Analysis: Potency Testing Identification and Quantification of THC and CBD by GC/FID and GC/MS*.
- Skoog, D., West, D., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2001). *Química analítica* (séptima ed.). México.
- Upton R, C. L., ElSohly M, R. A., & M, S. (2014). *American Herbal Pharmacopoeia*.

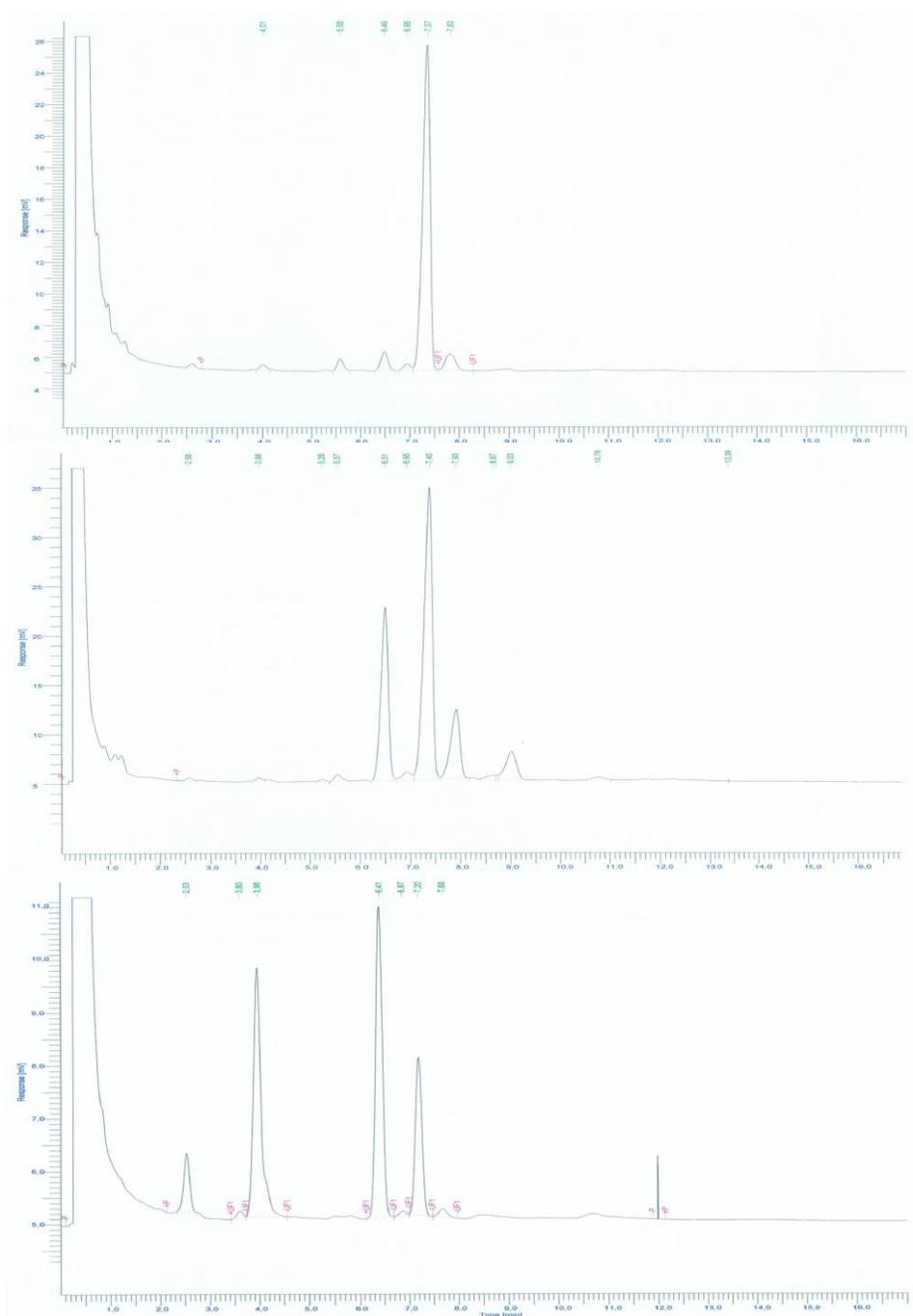
7. ANEXOS



Anexo 1: Cromatograma del estándar de THC (1 mg/mL)

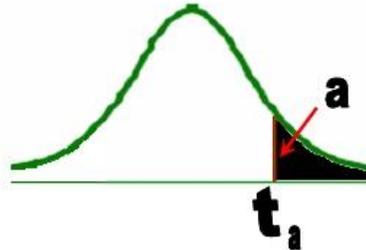


Anexo 2: Cromatograma del estándar de CBD (1 mg/mL)



Anexo 3: Cromatogramas de las tres matrices estudiadas: (A) Extracto etanólico del cultivar Wappa de *Cannabis sativa* L. preparado en lab. QUIFAC, (B) Extracto etanólico de uso farmacéutico obtenido de *Cannabis sativa* L. preparado en un lab. "X", (C) "aceite" artesanal de cannabis de dudosa procedencia y origen desconocido.

Puntos porcentuales de la distribución t



grados libertad		a=0,100	a=0,050	a=0,025	a=0,010	a=0,005	a=0,001
1	v	3,07768	6,31375	12,70620	31,82052	63,65674	318,30884
2		1,88562	2,91999	4,30265	6,96456	9,92484	22,32712
3		1,63774	2,35336	3,18245	4,54070	5,84091	10,21453
4		1,53321	2,13185	2,77645	3,74695	4,60409	7,17318
5		1,47588	2,01505	2,57058	3,36493	4,03214	5,89343
6		1,43976	1,94318	2,44691	3,14267	3,70743	5,20763
7		1,41492	1,89458	2,36462	2,99795	3,49948	4,78529
8		1,39682	1,85955	2,30600	2,89646	3,35539	4,50079
9		1,38303	1,83311	2,26216	2,82144	3,24984	4,29681
10		1,37218	1,81246	2,22814	2,76377	3,16927	4,14370
11		1,36343	1,79588	2,20099	2,71808	3,10581	4,02470
12		1,35622	1,78229	2,17881	2,68100	3,05454	3,92963
13		1,35017	1,77093	2,16037	2,65031	3,01228	3,85198
14		1,34503	1,76131	2,14479	2,62449	2,97684	3,78739
15		1,34061	1,75305	2,13145	2,60248	2,94671	3,73283
16		1,33676	1,74588	2,11991	2,58349	2,92078	3,68615
17		1,33338	1,73961	2,10982	2,56693	2,89823	3,64577
18		1,33039	1,73406	2,10092	2,55238	2,87844	3,61048
19		1,32773	1,72913	2,09302	2,53948	2,86093	3,57940
20		1,32534	1,72472	2,08596	2,52798	2,84534	3,55181
21		1,32319	1,72074	2,07961	2,51765	2,83136	3,52715
22		1,32124	1,71714	2,07387	2,50832	2,81876	3,50499
23		1,31946	1,71387	2,06866	2,49987	2,80734	3,48496
24		1,31784	1,71088	2,06390	2,49216	2,79694	3,46678
25		1,31635	1,70814	2,05954	2,48511	2,78744	3,45019
26		1,31497	1,70562	2,05553	2,47863	2,77871	3,43500
27		1,31370	1,70329	2,05183	2,47266	2,77068	3,42103
28		1,31253	1,70113	2,04841	2,46714	2,76326	3,40816
29		1,31143	1,69913	2,04523	2,46202	2,75639	3,39624
30		1,31042	1,69726	2,04227	2,45726	2,75000	3,38518
31		1,30946	1,69552	2,03951	2,45282	2,74404	3,37490
32		1,30857	1,69389	2,03693	2,44868	2,73848	3,36531
33		1,30774	1,69236	2,03452	2,44479	2,73328	3,35634
34		1,30695	1,69092	2,03224	2,44115	2,72839	3,34793
35		1,30621	1,68957	2,03011	2,43772	2,72381	3,34005
36		1,30551	1,68830	2,02809	2,43449	2,71948	3,33262
37		1,30485	1,68709	2,02619	2,43145	2,71541	3,32563
38		1,30423	1,68595	2,02439	2,42857	2,71156	3,31903
39		1,30364	1,68488	2,02269	2,42584	2,70791	3,31279

Anexo 3: Valores tabulados de tabla t-Student