



Facultad de Farmacia
Escuela de Química y Farmacia
Laboratorio Externo de Control de Calidad QUIFAC

ANÁLISIS PROXIMAL Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE RAÍCES
OBTENIDAS DE DOS CULTIVARES DE LA ESPECIE BOTÁNICA
Cannabis sativa L

Internado para optar al Título de Químico Farmacéutico

NATALIA ANDREA SALINAS PÉREZ

Director de Internado
Dr. Rodrigo Díaz Viciedo

2018

Resumen.

La especie botánica *Cannabis sativa* L., es una planta utilizada desde hace siglos y que actualmente sigue siendo materia de interés y estudio desde el punto de vista medicinal. Sin embargo, sus raíces, cuya función principal es el soporte nutricional y estructural, han sido muy poco estudiadas en cuanto a su composición. Por esta razón, el objetivo de este estudio es contribuir al conocimiento de la especie botánica *Cannabis sativa* L., mediante el análisis químico-proximal y perfil de ácidos grasos de las raíces de plantas, provenientes de dos cultivares legales, Pandora y Durga mata CBD, pertenecientes la fundación DAYA y a la Ilustre Municipalidad de La Florida, mediante la resolución exenta N° 2490/2014 del Servicio Agrícola y Ganadero, que autoriza a la fundación DAYA a la siembra, cultivo y cosecha de esta especie botánica, además de la correspondiente resolución N°2098 del Instituto de Salud Pública de Chile, en que se autoriza al laboratorio QUIFAC a realizar los ensayos analíticos correspondientes.

Para ello, según métodos oficiales establecidos por la Asociación Oficial de Química Analítica, la Farmacopea Europea y la USP, la composición químico-proximal de las raíces correspondientes a los cultivares Pandora y Durga mata CBD fueron: humedad 7,91-7,38%; cenizas 4,37-3,97%; proteínas 4,91-5,05%; grasas 0,77- 0,55%; Fibra 76,41 -80,55%; carbohidratos 5,62-2,50%, y kilocalorías 49,07-35,11 respectivamente. En cuanto a los resultados del perfil lipídico analizado por cromatografía gaseosa, se encontraron diferencias cualitativas y cuantitativas entre ambos cultivares; con mayor contenido de ácido palmítico y behénico en ambos cultivares estudiados.

Abstract.

Cannabis sativa L., botanical species, it's a plant been used seen centuries ago and currently it still is subject of interest and study from a medicinal point of view. However, its roots, which principal function has been the nutritional and structural sustenance, have been poorly studied related to its composition. For this reason, the aim of this study it's to contribute to the knowledge of *Cannabis sativa* L. botanical species, by carrying out a proximal-chemical analysis and a fatty acid profile to the roots of plants, coming from two different legal crops, Pandora and Durga mata CBD, located in the city of La Florida, owned by DAYA foundation and the illustrious city hall of La Florida, by exempt resolution N° 2490/2014 form Agriculture and Livestock Service, which allows to DAYA foundation to sowing, farming and harvest of the botanical species; in addition to the corresponding resolution N°2098 from the Public Health Institute of Chile, in which QUIFAC laboratory it's authorize to conduct pertinent trials.

To accomplish that, official methods stablished by the Association of Official Analytical Chemists, European Pharmacopoeia and United States Pharmacopeia were used. The results of the proximal composition for the roots belonging to the crops Pandora and Durga mata CBD were: 7,91-7,38% moisture; 4,37-3,97% ashes; 4,91-5,05% protein; 0,77- 0,55% fat; 76,41 -80,55% fiber; 5,62-2,50% carbohydrates, and 49,07-35,11 Kilocalories respectively. As for the results for fatty acids profile analyzed by gas chromatography, there were qualitative and quantitative differences between both crops, with higher content of palmitic and behenic acid in both crops studied.

Índice.

1. Introducción.	1
1.1. Características bioquímicas y farmacológicas.....	5
1.2. Composición química de <i>Cannabis sativa</i> L.	10
1.3. Porción radicular de <i>Cannabis sativa</i> L. y proyección del estudio.....	13
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo general:.....	15
2.2. Objetivos específicos.	15
3. Materiales y Métodos.....	16
3.1. Características del Estudio.	16
3.2. Muestras botánicas.....	16
3.3.1. General para análisis químico.....	17
3.5. Reactivos:.....	19
3.5. Métodos.....	21
3.5.1. Preparación de la muestra.....	21
3.5.2. Análisis Químico-proximal.	21
3.5.2.1. Análisis de humedad.	22
3.5.2.4. Análisis de proteínas.	26
3.5.2.5. Análisis de fibra dietética total.	28
3.5.2.6. Análisis proximal de carbohidratos.....	31
3.5.2.7. Determinación de calorías totales.	31
3.5.3. Cromatografía gaseosa.	32
3.5.3.1. Análisis de perfil de ácidos grasos.	32
4. Resultados.....	36
4.1. Análisis químico-proximal.....	36
4.1.1. Análisis químico-proximal para el cultivar Pandora.....	36
4.1.2. Análisis químico-proximal para el cultivar Durga mata CBD.....	37
4.1.3. Comparación químico-proximal para ambos cultivares.	38
4.2. Perfil de ácidos grasos.....	39
4.2.1. Análisis de cromatografía gaseosa del cultivar Pandora.	39
4.2.2. Análisis de cromatografía gaseosa del cultivar Durga mata CBD.	41
5. Discusión.....	44

5.1. Procedimiento de análisis químico-proximal y perfil lipídico por cromatografía de gases... 44

5.2 Análisis comparativo de los dos cultivares en estudio. 48

6. Conclusiones 54

7. Bibliografía 55

8. Anexos..... 59

1. Introducción.

La especie botánica *Cannabis sativa* L., comúnmente llamada marihuana o cáñamo, es una planta milenaria, cuyas propiedades han sido ampliamente aprovechadas por el hombre. Los datos arqueológicos e históricos revelan su uso como fuente alimentaria, medicinal y de fibra, además del uso con fines recreativos y espirituales. Esta especie es originaria de Asia Central y cuando fue cultivada por primera vez en China, India, Paquistán y Afganistán, se generó el primer registro de sus propiedades medicinales, existiendo constancia de su uso en el tratamiento del paludismo, el reuma y la gripe en tratados médicos chinos que datan desde el año 2700 antes de Cristo, además de los primeros conocimientos sobre sus aplicaciones industriales en dichos países. Esta información se extendió progresivamente a diversos países asiáticos y europeos, donde Grecia fue quien dio más importancia a su uso textil, por ser el cáñamo muy resistente y útil para la elaboración de diversas prendas. Los griegos y los romanos mencionan en sus escritos a esta especie por su fibra, pero también lo hacen por sus propiedades medicinales, por lo que hasta el siglo XIX en el continente europeo, esta planta era habitualmente utilizada por sus propiedades anticonvulsivantes, analgésica, ansiolítica y antiemética (Ángeles et al., 2014; De la Fuente et al., 2015; Farag & Kayser, 2017; Osorio & Tangarife, 2009).

Se postula, según algunos autores, que esta especie llegó al continente americano en el siglo XV junto a los colonizadores, quienes, además de usar diversos materiales elaborados con hilo de cáñamo, traían consigo semillas de la

planta para sembrarlas en las nuevas tierras y así continuar elaborando los subproductos necesarios para sobrevivir. En este contexto, las condiciones climáticas no fueron impedimento para su arraigo, debido a su fácil adaptación a diferentes ecosistemas, facilitando su cultivo a gran escala. Esto es posible ya que esta especie es capaz de modificar sus rutas biosintéticas de compuestos fitoquímicos que le permiten sobrevivir y prevalecer en distintos tipos de territorios, considerando características del suelo, grado de humedad o radiación solar, entre otros (Avello et al., 2017; De la Fuente et al., 2015; Honóric et al., 2006).

Clasificada por primera vez en 1753 por Carl Linnaeus, esta planta recibe la denominación científica de *Cannabis sativa* L.; y, desde la perspectiva taxonómica, pertenece a la clase de las dicotiledóneas, orden 4, Urticales, familia Cannabaceae. Hasta la fecha, se han descrito tres variedades de esta familia: sativa (típica de Europa y África), índica (típica de sudeste asiático) y ruderalis (típica de Rusia); difiriendo estas por sus rasgos anatómicos, hábitos de crecimiento, variación de hojas y tipo de semillas (Ángeles et al., 2014; De la Fuente et al., 2015).

Desde el punto de vista botánico, esta especie es una planta herbácea, anual, de tallo erguido, recto y rígido, con sección transversal cilíndrica, raíz pivotante, aspecto áspero, color verde oscuro con ramas cortas y frágiles. Sus hojas son palmadas y estipuladas con las inferiores opuestas y las superiores alternas, sobre pecíolos de hasta siete centímetros de largo. Cada hoja se compone de entre tres a nueve folíolos angostos, de ápice agudo con márgenes serrados y tricomas glandulares sobre el haz y el envés de un color más claro. Los tricomas glandulares

producen una resina con el fin de proteger a la planta de agresiones externas. Cuenta con inflorescencias en las axilas de las hojas superiores o al terminar las ramas, con brácteas herbáceas y glandulosas. Las inflorescencias masculinas son ramificadas, laxas y con muchas flores pediceladas, con perianto de cinco tépalos; mientras que las femeninas son densas pero con pocas flores, que son sésiles, con perianto entero membranáceo y pegado al ovario, persistente en el fruto, ovario con un solo óvulo y dos estigmas. El fruto es un aquenio con una sola semilla ovoide, algo comprimida, de color blanco o verdoso teñido de púrpura, encerrado en el perianto (Ángeles et al., 2014; De la Fuente et al., 2015; Farag & Kayser, 2017). Todo esta descripción se expone en la Figura 1.1. En relación a su rasgo reproductivo, la floración de esta comienza a partir del equinoccio de otoño, período del año en que la noche alcanza las doce horas diarias, pudiendo durar esta entre cuatro y doce semanas según la variedad botánica y las condiciones ambientales a las que se ve sometida. Un buen indicio de madurez de la planta es el color de los estigmas, ya que al madurar la flor, estos se marchitan adquiriendo un color marrón que al alcanzar aproximadamente un 75% del total indicaría que la planta está lista para su recolección (Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito (ONUDD), 2010).

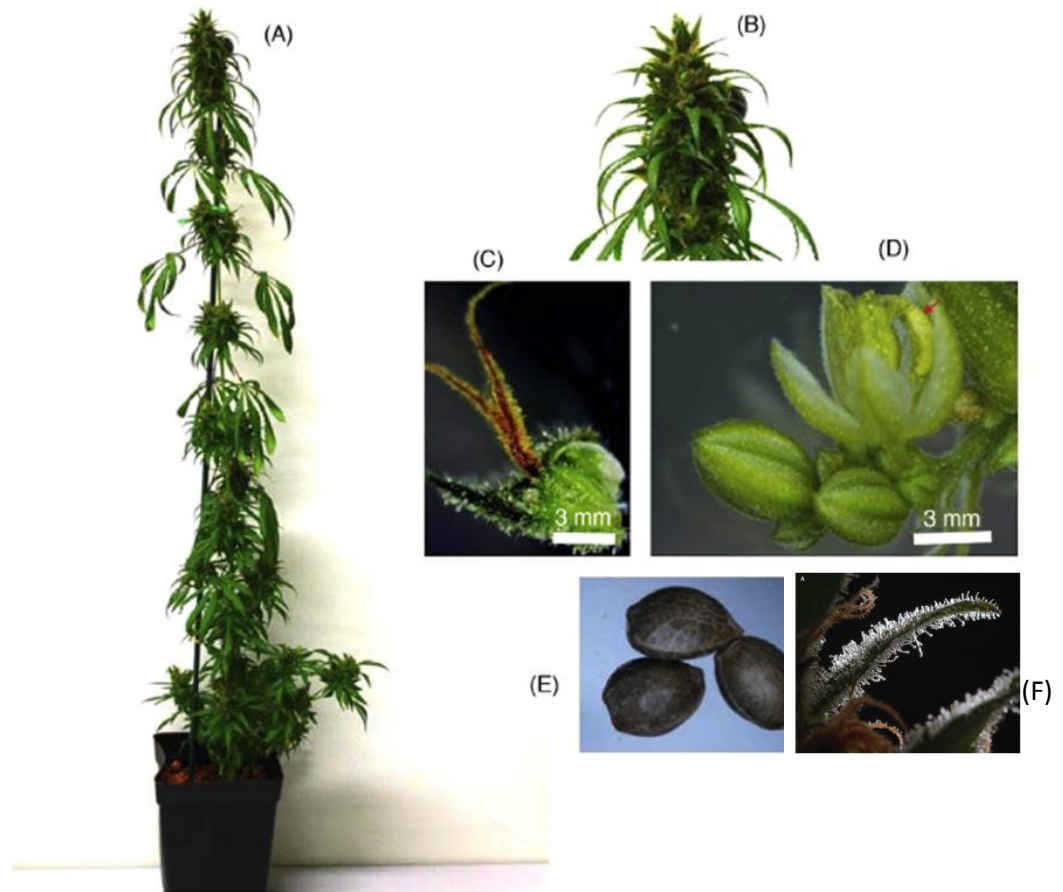


Figura 1.1. (A) *Cannabis sativa* L., femenina. (B) Porción de flores femeninas. (C) Pistilo flor femenina (Estigma, estilo, bráctea perigonal y estípula). (D) Visión de anteras de flores femeninas. (E) Semillas maduras. Fuente: propia adaptada de Farag et al., (2017) y Pertwee, (2014).

1.1. Características bioquímicas y farmacológicas.

La composición química de esta especie botánica ha sido estudiada ampliamente, identificándose más de 500 metabolitos secundarios, entre los que se encuentran: fitocannabinoides, terpenos, flavonoides, alcaloides, estilbenos, amidas fenólicas y lignanamidas (Ángeles et al., 2014; Pertwee, 2014)

Los fitocannabinoides son los metabolitos más abundantes en *Cannabis sativa* L. A la fecha se han aislado más de 120, de los que solo unos pocos exponentes han sido vinculados a una acción farmacológica con efectos psicotrópicos en el ser humano. Estos, químicamente, son hidrocarburos aromáticos, que al contrario de otras drogas de origen natural, como la nicotina, cocaína y opioides, no contienen nitrógeno y por lo tanto no son alcaloides (Morales et al., 2017). Los más abundantes en la planta son el Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), cannabinol (CBN), cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), Δ^9 -tetrahydrocannabivarina (THCV), cannabivarina (CBV) y cannabidivarina (CBDV) (Figura 1.2). Coexistiendo además con cannabinoides menos abundantes como como cannabinodiol (CBND), cannabision (CBE), cannabiciclol (CBL) y cannabitriol (CBT) (Morales et al., 2017; Pascual & Fernández, 2017).

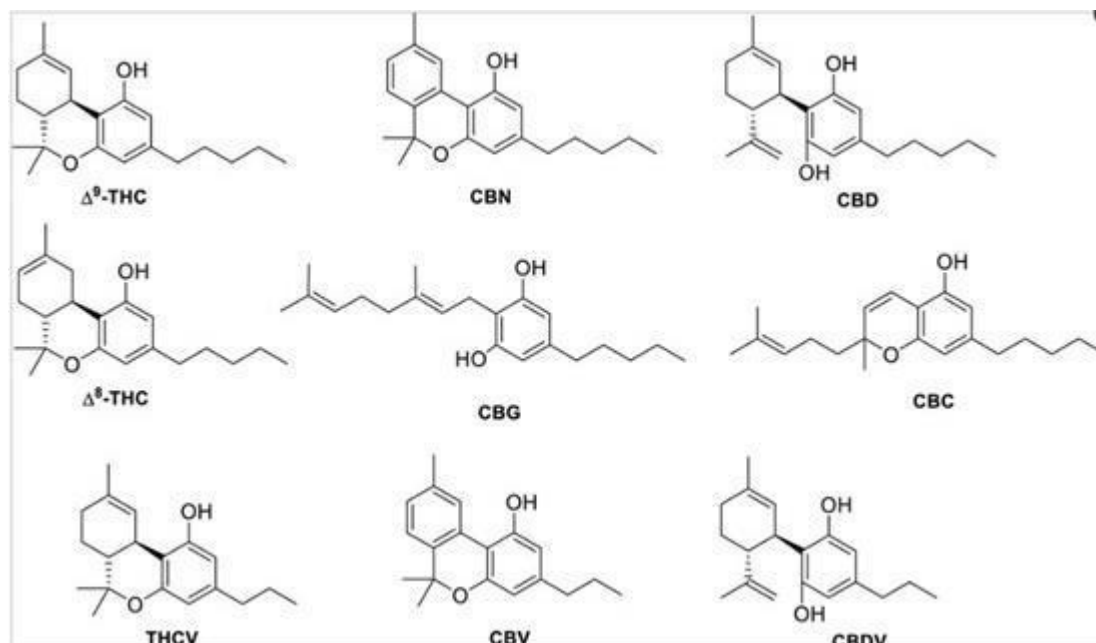


Figura 1.2. Estructuras de fitocannabinoides más abundantes en la especie *Cannabis sativa* L. De izquierda a derecha Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC),cannabinol (CBN), cannabidiol (CBD), Δ^8 Tetrahidro cannabinol (Δ^8 -THC), cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), Δ^9 -tetrahidrocannabivarina (THCV),cannabivarina (CBV) y cannabidivarina (CBDV). Fuente: Morales et al., 2017.

La mayoría de las propiedades biológicas relacionadas con los cannabinoides dependen de sus interacciones con el sistema endocannabinoide humano. En este sistema se han identificado dos tipos de receptores acoplados a proteína G, denominados receptores cannabinoides tipo 1 y tipo 2 (CB1 y CB2). El receptor CB1 se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso central (SNC), específicamente en el ganglio basal, corteza, estriado e hipocampo; mientras que el receptor CB2 se localiza en neuronas del sistema nervioso periférico (SNP), en células del sistema inmunológico como linfocitos-T, en páncreas y microglía

(Martinez et al., 2007; Osorio & Tangarife, 2009; Pascual & Fernández, 2017). Estos receptores responden a dos clases de ligandos endógenos, la anandamida y el 2-araquidonilglicerol, que comprenden compuestos eicosanoides, a los que se asocian funciones neuromoduladoras a nivel de apetito, dolor, humor, memoria, inflamación, secreción de insulina, sensibilidad y metabolismo de la grasa entre otros, existiendo una correlación de estos efectos biológicos con los producidos por acción farmacológica de los cannabinoides exógenos, pero con una duración de la acción mucho más corta (Andre et al., 2016; Pascual & Fernández, 2017).

Es por esto que en la actualidad, profesionales vinculados a áreas de la salud, discuten a nivel mundial sobre su potencial uso medicinal como droga estandarizada. De esta manera es que se le acreditan diferentes usos según finalidad terapéutica requerida, distinguiéndose su uso como droga coadyuvante o no recomendada para algunas patologías, como se describen en la Tabla 1.1. La aplicación terapéutica para *Cannabis* y sus fitocannabinoides o derivados, nace de acciones agonista y antagonista con distintas afinidades sobre CB1 y CB2. (Avello et al., 2017).

Tabla 1.1 Algunas aplicaciones terapéuticas de *Cannabis sativa* L., y sus derivados.

Categoría terapéutica	Potenciación cannabinoide
Tratamiento complementario	Analgésico Trastornos espásticos Náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia Síndrome caquético-anoréxico en pacientes con SIDA o cáncer terminal
No recomendada*	Glaucoma Trastornos inflamatorios del tubo digestivo Ansiedad, depresión Patología tumoral Neuroprotección

*No se considera como tratamiento complementario por existir otras drogas con mejores parámetros de efectividad y seguridad o falta de investigación que avale su utilidad clínica. Fuente: Avello et al., (2017)

Dentro de los fitocannabinoides presentes en la especie *Cannabis sativa* L., el THC es el principio activo más abundante con una concentración equivalente al 10 - 12%, presentándose en mayor cantidad en la resina de las inflorescencias pistiladas sin fertilizar de la planta femenina. Este metabolito secundario produce la mayoría de las acciones psicoactivas y efectos terapéuticos atribuidos a la planta, que en su mayoría están mediados por una acción del THC como agonista parcial sobre los receptores cannabinoides CB1 y CB2 (Honórico et al., 2006; Morales et al., 2017; Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (ONUDC), 2010). Adicionalmente, también se le reconocen actividades psicoactivas al isómero

isobárico $\Delta 8$ -THC, el que además posee la ventaja de ser químicamente más estable que THC, con un moderado efecto agonista parcial en receptores CB1 y CB2 con propiedades similares *in vitro* e *in vivo* (Morales et al., 2017).

Por otra parte, el CBD es uno de los fitocannabinoides más estudiados en la actualidad debido a sus prometedores efectos terapéuticos sumado a la ausencia significativa de actividad psicoactiva. Adicionalmente, ha demostrado efectos antiinflamatorios, ansiolíticos, antitumorales, entre otros. Según estudios *in vitro*, el CBD manifiesta débiles efectos antagonistas en los receptores CB1 y CB2, mostrando que se comportaría como modulador alostérico negativo endógeno del THC y 2-araquidonilglicerol, junto con inhibir la captación de anandamida, agonista CB1 endógeno, con lo que modificaría directamente al tono del sistema endocannabinoide (Avello et al., 2017; Morales et al., 2017; Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (ONUDD), 2010).

Otros metabolitos secundarios presentes en esta especie botánica son los terpenos, estos son responsables de otorgar el olor y sabor propios de las diferentes cepas. Se han descrito alrededor de 120 terpenos diferentes, donde algunos de ellos son farmacológicamente activos y podrían producir efectos sinérgicos con los fitocannabinoides. De estos, los mono y sesquiterpenos se han detectado en flores, raíces y hojas de Cannabis; teniendo como principal sitio de producción los tricomas glandulares secretores de la planta. Los monoterpenos dominan generalmente el perfil terpénico volátil e incluyen principalmente D-limoneno, β -mirceno, α - y β -pineno, terpinoleno y linalool (Andre et al., 2016; Ángeles et al., 2014).

Por su parte, los flavonoides se encuentran principalmente en las hojas identificándose alrededor de 20, pertenecientes en su mayoría a las subclases flavona y flavonol; estas incluyen las versiones O-glicósido de las agliconas apigenina, luteolina, kaempferol y quercetina, así como la cannflavina A y la cannflavina B, flavonas que son exclusivas de *Cannabis*. Estas últimas han demostrado actividad farmacológica, inhibiendo la producción de prostaglandina E, mientras que otros estudios sugieren que modulan la acción de cannabinoides (Andre et al., 2016; Ángeles et al., 2014; Mc Partland & Mediavilla, 2002).

1.2. Composición química de *Cannabis sativa* L.

En cuanto a los metabolitos primarios que conforman a la *Cannabis*, tienen particular interés los ácidos grasos, estos desempeñan un papel muy importante en diferentes rutas sintéticas de la planta, especialmente en la biosíntesis de fitocannabinoides y flavonoides, como así de los distintos metabolitos secundarios, siendo de este modo las bases de la regulación y adaptación metabólica de la especie según su ambiente (Andre et al., 2016). En la Figura 1.3 se exponen las rutas de los distintos metabolitos secundarios en interacción de distintos ácidos grasos presentes en la planta.

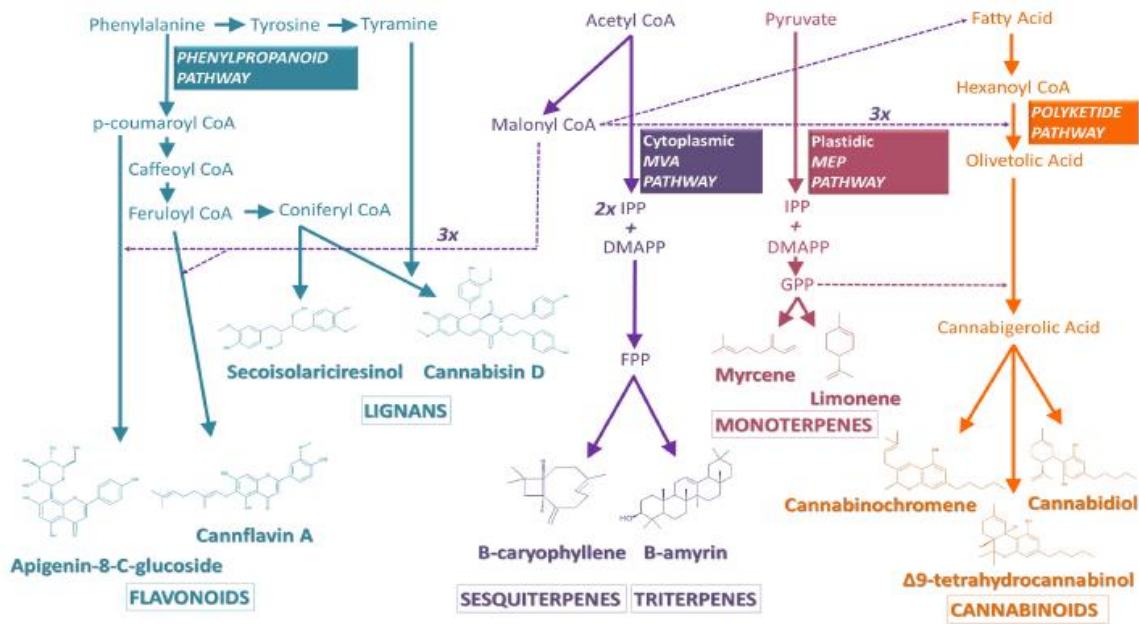


Figura 1.3. Esquema visual de las rutas biosintéticas que conducen a la síntesis de metabolitos secundarios en la especie *Cannabis sativa* L. Fuente: Andre et al., (2016).

Las semillas de *Cannabis sativa* L., si bien cuentan con menor difusión en cuanto a sus características, se reconoce su importante constitución lipídica al poseer aproximadamente entre el 29 y el 34% de aceite en relación a su peso. Adicionalmente, constituyen una potente fuente de ácidos grasos, específicamente de omega 3 (Ω -3). Considerando la composición específica de este aceite, se ha descrito que cada 100g de aceite de semilla de *Cannabis* existe una cantidad aproximada de 19g de ácido α -linolénico, con una proporción aproximada de 3:1 entre los ácidos grasos omega 6 (Ω -6) y Ω -3, lo que hace que este aceite sea un alimento de alta calidad nutricional. Sin embargo, debido a su alta proporción de ácidos grasos insaturados, este tiende rápidamente a adquirir un carácter rancio si no se almacena en un lugar fresco y en ausencia de luz solar (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (ONUDD), 2010; Vonapartis et al., 2015). Adicionalmente, estudios señalan que semillas de diferentes cultivares contienen en promedio entre 20-25% de proteínas, 2-3% de carbohidratos, 5-6% de cenizas y 33-39% de fibra (House, Neufeld, & Leson, 2010; Vonapartis et al., 2015).

La cantidad de fibra encontrada en el tallo alcanza sobre el 90% de su biomasa. La corteza posee un 70% de celulosa, 10% hemicelulosa y 5% de lignina; mientras que el núcleo contiene 35% de celulosa, 20% de hemicelulosa y 20% de lignina (Brown, 2003).

Otros componentes químicos que también están presentes en la planta, pero en una menor proporción, son los alcaloides. Estos, son compuestos nitrogenados que pueden derivar de aminoácidos y que usualmente presentan una actividad

biológica a dosis bajas. Se han aislado e identificado al menos diez de estos compuestos en polen, hojas, tallos y raíces (Osorio & Tangarife, 2009).

1.3. Porción radicular de *Cannabis sativa* L. y proyección del estudio.

Las raíces, como en toda especie, desempeñan varios papeles: fijan y estabilizan la planta, captan agua y nutrientes del suelo que luego distribuyen a la parte aérea de esta. Además, sirven para almacenar nutrientes para un periodo de crecimiento posterior y estimular la actividad microbiana alrededor de ellas (Hodgson, 1987). Existen pocas referencias científicas sobre estudios correspondientes a este órgano en la especie *Cannabis sativa* L, sin embargo, dentro de la escasa información que se dispone, se sabe de la existencia de amidas fenólicas y lignanamidas, junto con triterpenos, friedelina y epifriedelanol con presencia en esta porción de la planta; y, adicionalmente destaca un contenido muy bajo de CBD y THC, encontrándose este último en cantidades inferiores al 0,03%, en comparación al alto porcentaje encontrado en las partes aéreas (Andre et al., 2016; Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (ONUDD), 2010).

Es por esto que, ante la ausencia de estudios que brinden información en cuanto a la composición química y perfil de ácidos grasos del órgano radicular de la especie *Cannabis sativa* L, nace el interés científico de identificar y cuantificarlos para comprender mejor la distribución de estos en la planta. Por esta razón es que en este estudio se emplearon raíces de dos cultivares legales de la especie *Cannabis sativa* L ubicados en la comuna de La Florida, Región Metropolitana,

Chile; pertenecientes específicamente a los géneros híbridos denominados Pandora (70% indica,20% sativa,10% ruderalis) y Durga mata CBD (90% indica, 10% sativa); ambas fueron cultivadas en exterior, con iguales condiciones ambientales y dentro de recintos acreditados pertenecientes a la Fundación Daya, quienes se encuentran autorizados por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de la Región Metropolitana, para la siembra, cultivo y cosecha de ejemplares de *Cannabis sativa* L. Para esto, se decidió determinar de manera analítica la humedad, cenizas, grasa, proteína y fibra dietética; todo junto con la evaluación del perfil de ácidos grasos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general:

Contribuir al conocimiento de la especie botánica *Cannabis sativa* L., mediante la evaluación de su composición química y perfil de ácidos grasos de raíces pertenecientes a dos cultivares: Pandora y Durga mata CBD.

2.2. Objetivos específicos.

- Determinar el contenido de proteínas, grasas, carbohidratos, fibra dietética total, humedad y cenizas, de raíces de dos cultivares de la especie botánica *Cannabis sativa* L.
- Identificar y cuantificar los ácidos grasos presentes en las raíces de ambos cultivares de la especie botánica *Cannabis sativa* L.

3. Materiales y Métodos.

3.1. Características del Estudio.

Estudio analítico de interpretación cualitativa y cuantitativa que cuenta con la copia de autorización del SAG de la Región Metropolitana (Anexo 8.1.) para la siembra, cultivo y cosecha de la *Cannabis sativa* L., por parte de la Fundación Daya en la comuna de La Florida; y la autorización del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), Resolución 2098 para la tenencia, transporte y uso con finalidad científica de *Cannabis sativa* L., dentro del Laboratorio Externo de Control de Calidad QUIFAC, de la Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso. Ambas resoluciones se encuentran archivada por el Dr. Q.F. Rodrigo Díaz, Director Técnico del laboratorio previamente enunciado.

3.2. Muestras botánicas.

Muestras de raíces secas de la especie botánica *Cannabis sativa* L., provenientes de dos cultivares legales ubicados en la comuna de La Florida, Región Metropolitana, Chile, ambas cultivadas y recolectadas en igual condiciones por personal autorizado de la Fundación Daya, y almacenadas dentro de envases herméticos en lugar fresco, seco, protegidas de la luz y la humedad en las bodegas de contramuestras del Laboratorio QUIFAC de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso. Para esto se dispuso de 9,2 g de raíces del cultivar Durga mata CBD y 11,5 g del cultivar Pandora.

3.3. Materiales.

Para el análisis de las muestras se utilizaron materiales y equipos dispuestos por el Laboratorio Externo de Control de Calidad QUIFAC de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

3.3.1. General para análisis químico.

-Material de vidrio graduado clase A y B:

-(Matraces graduados y aforados, pipetas graduadas y aforadas, bureta, vaso precipitado, entre otros).

-Embudos de vidrio, Pyrex®.

-Cápsulas de Petri.

-Frascos de vidrio con tapa con tapa rosca (250 mL), Boeco®.

-Tubos de digestión y destilación.

-Crisoles de porcelana.

-Sistema de extracción Soxhlet.

-Crisoles de Gooch N°2, Duran®.

-Dedales de celulosa ID33mm, OD37mm, L100mm, Advantec®.

-Otros materiales de laboratorio (gradillas, guantes de vinilo, algodón, perlas de ebullición, pipetas Pasteur, entre otros)

3.3.2. Específico para cromatografía gaseosa.

- Columna de sílica fundida de 100 m x 0,25 mm x 0,2 μ m de diámetro COL-ELITE- 2560, PerkinElmer®.
- Jeringas de vidrio (10 μ L), Hammlton®.
- Tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca (10 mL), GL14, Duran®.
- Viales color ámbar (4 mL).

3.4. Equipos de Laboratorio:

- Manta calefactora, Bibby®.
- Baño termorregulado, Memmert®. .
- Campana de extracción.
- Agitador vórtex, QL-861.
- Estufa de secado ECC-192, Memmert®.
- Placa calefactora con agitación magnética RH-KT/C, IKA®.
- Limpiador ultrasónico PES-20, Arquimed®.
- Balanza analítica 120 A, Precisa®.
- Balanza semianalítica WTC 2000, Radwag®.

- Digestor Kjeldahl DK6 Velp Scientifica®.
- Destilador UDK-139, Velp Scientifica®.
- Mufla D2804 Lilenthal/Bremen, Naber®.
- pHmetro pH 510 series, Oakton®.
- Rotavapor RE-52A, GL®.
- Cromatógrafo de gas. Auto System XL con detector FID, PerkinElmer®.

3.5. Reactivos:

- Éter etílico ((C₂H₅)₂O) para análisis (p.a.), Winkler®.
- Hidróxido de Sodio (NaOH) en lentejas, Merck®.
- Ácido clorhídrico (HCl) concentrado al 37%, Merck®.
- Sulfato de Potasio (K₂SO₄) granulado p.a., Merck®.
- Ácido Bórico (H₃BO₃) granular, Merck®.
- Sodio fosfato monobásico hidratado (NaH₂PO₄ x H₂O), p.a., Merck®.
- Sodio hidrógeno fosfato dihidrato (Na₂HPO₄ x 2H₂O), p.a., Merck®.
- Kit Fibra dietética total Megazyme K-TDFR.

α-Amilasa A-336

Proteasa P3a10

Amiloglucosidasa A99B.

- Etanol (C_2H_5OH) al 95%, Merck®.
- Alcohol isopropílico (C_3H_7OH) al 95%, Merck®.
- Reactivo de kieselguhr, Sigma-Aldrich®.
- Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, 95-97%, Merck®.
- Sulfato de Cobre ($CuSO_4$) anhidro, Sigma Aldrich®.
- Sulfato de Potasio (K_2SO_4) p.a., Merck®.
- Indicador de Tashiro, Merck®.
- Alcohol isopropílico al 95%, Merck®.
- Estándar mezcla de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos, FAME mix 37, 47885U, Supelco®.
- Complejo de trifluoruro de Boro-metanol (solución de metanol al 20%), para síntesis, Merck®.
- Nitrógeno en balón, Alphagaz® 2, con 99,9999% de pureza.
- Aire en balón (N_2+O_2), Alphagaz® 2, con 99,9999% de pureza.
- Hidrógeno en balón Alphagaz® 2, con 99,9999% de pureza.
- Hexano al 95% para análisis de calidad para HPLC, Winkler®.
- Diclorometano (CH_2Cl_2) $\geq 99.9\%$ de pureza, Merck®.

3.5. Métodos.

El procesamiento y análisis de las muestras se realizó en dependencias del Laboratorio Externo de Control de Calidad QUIFAC de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

3.5.1. Preparación de la muestra.

Previo a los análisis se debió homogenizar las muestras a utilizar. Para ello, las raíces de cada cultivar fueron trituradas mecánicamente de forma manual, generando material con un tamaño de partícula de 2-3 mm de largo, con un ancho ≤ 2 mm, según parte de la raíz. Se trituró la totalidad de la muestra dispuesta, obteniéndose así 9,2 g de triturado de raíces del cultivar Durga mata CBD y 11,5 g de Pandora.

3.5.2. Análisis Químico-proximal.

Mediante determinación analítica se evaluó humedad, cenizas, grasa, proteína y fibra dietética total de los dos cultivares en estudio.

3.5.2.1. Análisis de humedad.

Se efectuó por medio de la determinación de pérdida por secado según lo definido por las Farmacopea Estadounidense (USP) y Farmacopea Europea (Council of Europe, 2014; The United States Pharmacopeia Convention, 2013), aplicándose el Método 731 de la USP. Este procedimiento gravimétrico determina la pérdida de material volátil de cualquier tipo que se elimina bajo condiciones específicas. En este caso se evaluó la pérdida de agua tras calentamiento y evaporación desde una matriz sólida.

Para la realización del análisis, primero se trató el material de trabajo compuesto por cápsulas de Petri, calentándolas en estufa a 105°C durante 4 h, para luego enfriarlas hasta temperatura ambiente por medio de un desecador por 6 h. Antes de utilizar dicho material se registró el peso de cada una de las capsulas de Petri en balanza analítica y se dispuso 1 g de homogenizado de cada muestra en triplicado, para luego someterlas a 105°C durante 2 h. Después se llevaron a temperatura ambiente en desecador, con posterior registro del peso. Para el cálculo del porcentaje de humedad se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de humedad (\%)} = \frac{mp2 - mp0}{mr - mp0} \times 100$$

mr: masa de cápsula Petri con muestra de raíces homogenizadas (g).

mp0: masa de cápsula Petri vacía (g).

mp2: masa de cápsula Petri con muestra residual seca (g).

3.5.2.2. Análisis de cenizas.

Este método se basa en la destrucción de la materia orgánica (carbohidratos, proteínas y lípidos) presente en la muestra, tras calcinación y determinación gravimétrica del residuo correspondiente al contenido mineral resultante desde la matriz sólida, efectuado según lo definido por la Farmacopea Europea y el método 942.05 de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, 1990; Council of Europe, 2014).

Para ello, se dispuso de crisoles de porcelana previamente calcinados en la mufla por 12 h y llevados a temperatura ambiente en desecador por 6 h. Luego, se registró el peso de cada uno de ellos, para en seguida disponer en triplicado 1 g de ambas muestras de raíces en estos, y posteriormente se llevaron a secado en estufa a 105°C por 2 h, para en seguida ponerlos a 450°C por 5 h en la mufla, hasta que todo el material contenido en su interior adquirió un color blanco y peso constante. Para retirar de la mufla, las muestras se dejaron enfriar durante 5 h, para posteriormente llevar a temperatura ambiente en desecador. Para el cálculo del porcentaje de ceniza se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de cenizas totales(\%)} = \frac{mc2 - mc0}{mr - mc0} \times 100$$

mr: masa del crisol con la muestra de raíces homogenizada (g).

mc0: masa del crisol vacío (g).

mc2: masa del crisol con residuo de cenizas (g).

3.5.2.3. Análisis de grasa total.

Este procedimiento gravimétrico tiene como objetivo la extracción total de la materia grasa libre, mediante la utilización de un solvente orgánico con posterior determinación de su masa total. En este caso se evaluó el residuo de grasas tras extracción con solvente orgánico desde la matriz sólida según lo establecido en el método 920.39 de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, 1990).

Para realizar el análisis, se secaron en vidrio reloj 2 g de las muestras homogenizadas en duplicado, mediante estufa a 105°C por 2 h. Luego, se trasvasió la muestra dentro de dedales de celulosa asignados a cada una ellas, cubriéndolos con algodón e introduciéndolos en la cámara del extractor Soxhlet. Luego se pesaron los balones de vidrio, previamente secados en la estufa a 105°C por una hora y enfriados en desecador hasta temperatura ambiente registrando sus respectivas masas. Se adicionó, a cada balón de vidrio, éter de petróleo para análisis, en cantidades suficientes para asegurar que el dedal en la cámara de extracción fuera cubierto en su totalidad (aproximadamente 200 mL) y luego se instaló el balón en la base del sistema Soxhlet para proceder a calentar el solvente por medio de una manta calefactora hasta ebullición, realizando ciclos de extracción por un periodo de 6 h, a una velocidad de extracción de 3-6 gotas por segundo. Una vez obtenido el producto de la extracción, se eliminó el solvente de cada balón mediante el uso de un rotavapor, para posteriormente ser secados en la estufa a 105°C por 10min y ser llevados a temperatura ambiente en desecador, con posterior

registro del peso a cada balón con la grasa obtenida. (Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), 2005). Para el cálculo del porcentaje de grasa se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de grasa (\%)} = \frac{mb2 - mb1}{mr - Vr} \times 100$$

mr: masa del vidrio reloj con muestra de raíces homogenizadas (g).

Vr: masa del vidrio reloj vacío (g).

mb1: masa de balón redondo vacío (g).

mb2: masa de balón redondo con residuo de grasas (g).

3.5.2.4. Análisis de proteínas.

Este método consiste en cuantificar las proteínas presentes mediante la determinación de Nitrógeno orgánico total según el método Kjeldahl. Para ello se provoca destrucción de la materia orgánica por medio de ácido sulfúrico concentrado, con la formación de sulfato de amonio que en exceso de NaOH libera amoníaco, el que es destilado recibiendo en ácido bórico con la posterior formación de borato de amonio, el que más tarde es valorado con H_2SO_4 , para aplicar un cálculo final en base a un factor 6,25 sobre la cantidad de nitrógeno orgánico obtenido, según lo establecido por el método 976.05 de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, 1990).

Para el análisis, se pesaron en vidrio de reloj 1 g de muestra de cada cultivar y se trasladaron a tubos aptos para digestión-destilación previamente rotulados. Luego, se llevaron a digestión con 7 mL de H_2SO_4 junto a 0,5 g de $CuSO_4$ y 4,5 g de K_2SO_4 como agentes catalizadores de la reacción en digestor Kjeldahl por un periodo de 4 h bajo campana.

Mientras tanto, en 4 matraces de Erlenmeyer ya rotulados para el proceso de destilación, se adicionaron 25 mL de ácido bórico al 4,0% junto a 4 gotas del indicador de Tashiro. Una vez digeridas las muestras, una a una se les agregó 50 mL de NaOH al 40%, recibiendo el destilado en los matraces de Erlenmeyer, para una posterior valoración del exceso de ácido con una solución estandarizada de

H₂SO₄ al 0,10373N hasta cambio de color (viraje de celeste a lila). Para el cálculo cuantitativo y porcentual de proteínas se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de Proteínas (\%)} = \frac{14 \times N \times V \times 100 \times 6,25}{(mr - Vr) \times 1000}$$

mr: masa del vidrio reloj con muestra de raíces homogenizadas (g).

Vr: masa del vidrio reloj vacío (g).

V: volumen de H₂SO₄ empleado (mL)

N: Normalidad del H₂SO₄ (N)

3.5.2.5. Análisis de fibra dietética total.

Este método enzimático-gravimétrico consiste en medir la suma de los polisacáridos vegetales y la lignina, que son resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas del ser humano (Escudero Álvarez & González Sánchez, 2006; Trowell et al., 1976). Los parámetros de este análisis se llevaron a cabo según lo estipulado en el método 962.09 de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, 1990). Para ello, se realizó digestión enzimática utilizando α -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa, incubándolas por separado a alta temperatura en baño termostático con agitación en intervalos de 5 min para posteriormente enfriar a temperatura ambiente con ajuste de pH antes de agregar la siguiente enzima.

Para esto, primero se preparó 500 mL de buffer fosfato pH 6,00, adicionando 0,7 g de Na_2HPO_4 más 4,2 g de NaH_2PO_4 en un matraz aforado de 500mL con agua destilada y ajuste de pH. En seguida, se tomaron 4 muestras de 1 g de cada uno de los dos cultivares, pesados en vidrio reloj, y se trasvasijaron a frascos de vidrio con tapa rosca previamente rotulados. Para luego, adicionar a cada uno 50 mL de buffer fosfato junto a 0,1 mL de α -amilasa 3000 UI/mL, cerrándolos e incubándolos en baño termostático a 95°C por 30 min. Finalizado este primer tratamiento, se ajustó el pH de las muestras a $\text{pH } 7,50 \pm 0,20$ con solución de NaOH 0,275 N. Posteriormente, se añadió a cada una de estas 0,1 mL de proteasa de 50 mg/mL, y se llevó cada frasco a incubar por 30 min a 60°C. Nuevamente se debió ajustar pH,

esta vez a valores de pH $4,30 \pm 0,30$ con HCl 0,325 N y se adicionó 0,1 mL de amiloglucosidasa 3300 UI/mL a cada muestra, cubriendo con la tapa e incubando por 30 min a 60°C.

Luego de completar la digestión enzimática, a las muestras se agregaron 4 volúmenes de etanol al 95% a cada muestra, dejando los frascos tapados, protegidos de la luz y a temperatura ambiente hasta total precipitación por 24 h. Finalizado este proceso, se rotularon y pesaron crisoles de Gooch con reactivo de Kieselguhr, el que ayuda a retener la fibra soluble en la placa de vidrio fritado y no interfiere en el resultado final de la técnica. En este punto, las muestras fueron filtradas al vacío, a través del crisol de Gooch, y el residuo resultante fue lavado con dos porciones de 10 mL de alcohol al 78% y dos porciones de 10 mL de alcohol isopropílico al 95%, para luego ser llevado a la estufa por 2 h a 105°C y finalmente llevar a temperatura ambiente en desecador con registro del peso en balanza analítica.

Como parte final del método, se seleccionaron dos muestras de cada cultivar ya procesado, y se determinó la ceniza presentes en las muestras de fibra obtenidas, para ello las muestras fueron calcinadas por 5 h a 550°C, enfriadas y pesadas. Las otras dos muestras restantes de cada cultivar fueron sometidas a análisis de proteínas por método de Kjeldahl, ya descrito en la sección 3.5.2.4. Una vez obtenidos todos los resultados se realizó el cálculo de fibra total, empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de fibra total (\%)} = \left[\frac{((mr - Vr) - (CGm - CGv))}{mr - Vr} \times 100 \right] - \%P - \%C$$

mr: masa del vidrio reloj con muestra de raíces homogenizadas (g).

Vr: masa del vidrio reloj vacío (g).

CGm: masa de crisol de Gooch con residuo de fibra seco.

CGv: masa de crisol de Gooch vacío.

%P: porcentaje de proteínas según fórmula sección 3.5.2.4.

%C: porcentaje de cenizas según fórmula sección 3.5.2.2.

3.5.2.6. Análisis proximal de carbohidratos.

Estos fueron conjeturados en base al cálculo porcentual por diferencia con el resto de los análisis químicos realizados a las raíces homogenizadas de los cultivares. Donde la cantidad restante de la suma de los porcentajes de humedad, ceniza, grasa, proteína y fibra, corresponde a la cantidad de hidratos de carbono contenidos en la muestra (Espitia-Pérez et al., 2013).

$$\text{Porcentaje de carbohidratos (\%)} = 100 - [\%H + \%C + \%G + \%P + \%Ft]$$

%H: porcentaje de humedad según sección 3.5.2.1.

%C: porcentaje de cenizas según fórmula sección 3.5.2.2.

%G: porcentaje de grasas según fórmula sección 3.5.2.3.

%P: porcentaje de proteínas según fórmula sección 3.5.2.4.

%Ft: porcentaje de fibra total según fórmula sección 3.5.2.5.

3.5.2.7. Determinación de calorías totales.

Las calorías totales de cada muestra corresponden a la suma las calorías aportadas por el total de carbohidratos, de proteínas y de grasas comprendidas en las muestras de raíces estudiadas. Para esto, los carbohidratos y proteínas se les aplicó un factor de 4 Kcal/g, y las grasas a un factor de 9 Kcal/g; resultando la siguiente fórmula:

$$\text{Calorías totales (Kcal/100(g))} = \left(\frac{\%G}{100} \times 9\right) + \left(\frac{\%P}{100} \times 4\right) + \left(\frac{\%CH}{100} \times 4\right)$$

%G: porcentaje de grasas según fórmula sección 3.5.2.3.

%P: porcentaje de proteínas según fórmula sección 3.5.2.4.

%CH: porcentaje de carbohidratos según fórmula sección 3.5.2.6.

3.5.3. Cromatografía gaseosa.

Mediante determinación analítica se establecieron cualitativa y cuantitativamente los perfiles de ácidos grasos para las raíces de ambos cultivares en estudio.

3.5.3.1. Análisis de perfil de ácidos grasos.

Para este análisis se utilizó la técnica de cromatografía gaseosa (CG). Esta, consiste en la separación de una mezcla compleja de sustancias a componentes individuales para facilitar su determinación cualitativa y cuantitativa. Para ello, la mezcla de sustancias a analizar debe tener un nivel suficiente de volatilidad y estabilidad térmica para no desestabilizar o degradarse durante el proceso. Dentro de las moléculas aptas para dicho tratamiento, se encuentran los ácidos grasos extraídos por solventes polares desde matrices orgánicas.

La técnica para determinar el perfil de ácidos grasos se basó en el análisis por doble duplicado de muestras grasas obtenidas de raíces homogenizadas de cada cultivar según definido en la sección 3.5.2.3. De esta manera se obtienen glicéridos de los ácidos grasos presentes en la muestra para someterlos luego a una reacción de transesterificación. Para esta reacción, el residuo de grasas de cada muestra debió extraerse de cada balón de vidrio agregando 500 μL de hexano junto a 2 mL del derivatizante, compuesto por un complejo de trifluoruro de Boro-

metanol, el que se encarga de la formación de metilésteres a partir de los glicéridos ya mencionados. Como última fase, el contenido es trasvasiado a un tubo de vidrio con tapa rosca, para luego incubar en estufa a 105°C por 12 h.

Posterior a llevar las muestras a temperatura ambiente, se agregaron a cada tubo 6 mL de hexano para análisis en tres porciones de 2 mL, con agitación por vórtex y extracción cuidadosa del sobrenadante presente en los tubos con una pipeta Pasteur. La muestra obtenida se traspasó a un vial color ámbar para cromatografía gaseosa y luego se almacenó en cadena de frío (3-8°C) hasta posterior análisis por cromatografía.

Previo al análisis cromatográfico, el equipo de CG debe ser suministrado con gases de alta pureza. Para el análisis de ácidos grasos, los gases utilizados para alimentar la llama del detector de llama ionizante (FID) corresponden a gas de hidrógeno y aire, mientras que el vehículo utilizado como transportador de la muestra al interior del inyector y columna para llegar al detector FID, viene dado por gas de nitrógeno. Esto se ve esquematizado en la Figura 3.1.

Así mismo, se preparó el horno del equipo de CG con un programa de temperatura establecido previamente para este tipo de análisis, el que consiste en elevar su temperatura hasta los 100°C y mantenerse por 4 min; luego incrementar la temperatura subiendo 5°C hasta alcanzar los 180°C en un periodo de 10 min; para finalmente aumentar de a 2°C hasta llegar a los 220°C en 30 min.

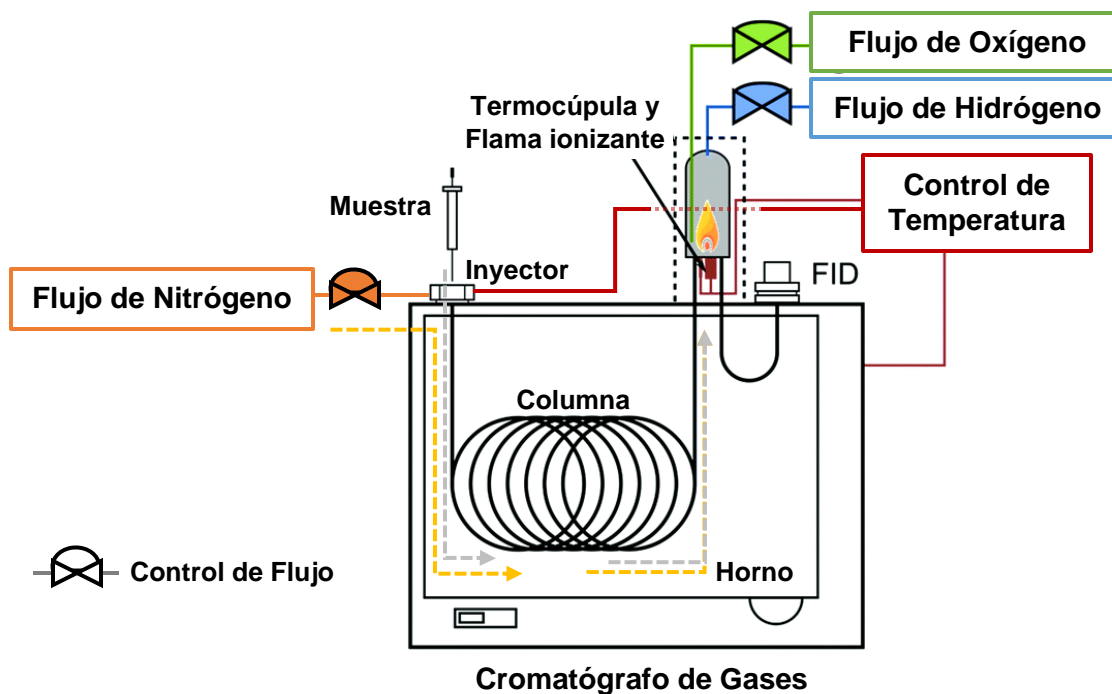


Figura 3.1. Esquema de componentes y funcionamiento general de un equipo de Cromatografía Gaseosa con detector de flama ionizante (FID). Fuente: diseño propio.

Una vez preparado el equipo, se procedió a inyectar 4 μL de diclorometano como blanco analítico, para luego inyectar la solución estándar FAME mix. Para esto, se inyectaron 4 μL del estándar, los que se calentaron hasta los 250°C dentro del equipo de CG, teniendo como resultado la vaporización de los solutos volátiles y el ingreso a la columna de sílica de fase reversa mantenida a 220°C, transportados por el gas de nitrógeno. Una vez en esta fase, los ácidos grasos metilados eluyen por la columna a velocidades variables según sus características físicas por una duración de 80 min, finalizando cada uno de estos su recorrido en el sistema de detección de flama ionizante (FID) que se mantiene a una temperatura de 280°C, y en respuesta a la ionización resultante se genera una señal electrónica que se

registra en el sistema de datos como una señal analítica expresada como parte de un vasto cromatograma (Anexo 8.2). En el cromatograma, el área de las señales analíticas o picos, corresponden a la cantidad del compuesto en la muestra y el tiempo de retención, es el tiempo que tarda el compuesto en atravesar la columna. Ambos factores son utilizados para determinar cuantitativa y cualitativamente la cantidad de compuesto en base a la comparación del cromatograma del estándar con el de los cromatogramas de las muestras en análisis.

El procesamiento de la muestra consistió en, una vez retirada de la cadena de frío, se secó el contenido de cada vial con gas de N₂, para luego ser reconstituidos con diclorometano en volúmenes de 500 µL. A continuación, al igual que para el estándar, se inyectaron 4 µL de las muestras, procurando alternar corridas cromatográficas con la inyección de solvente puro, eliminando así cualquier tipo de interferencia que pudiera llevar a algún error. En los Anexos 8.3 y 8.4 se expone un cromatograma correspondiente a cada cultivar.

4. Resultados

4.1. Análisis químico-proximal

Los resultados de las muestras procesadas por análisis químico-proximal fueron obtenidos por método gravimétrico en base a balanza analítica y a aproximaciones según lo permitido por la USP, Farmacopea Europea y AOAC.

4.1.1. Análisis químico-proximal para el cultivar Pandora.

Las muestras homogenizadas de raíz de *Cannabis sativa* L, cultivar Pandora fueron sometidas a los métodos 731 de la USP para humedad, método 942.05 de la AOAC para cenizas, método 920.39 de la AOAC para grasas, método 976.05 de la AOAC para proteínas, método 962.09 de la AOAC para fibra total, análisis proximal de para carbohidratos con un cálculo final para determinar las calorías de las muestras. Todos los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 4.1. Los parámetros se ven expresados en valores promedios y rangos de valores (g/100g de raíz) y en base a porcentaje promedio.

Tabla 4.1. Resultados de análisis químico-proximal para la cultivar Pandora.

Parámetro	Rango de valores (g/100g)	Promedio (g/100g)	Desviación estándar (DS)	Porcentaje (%)
Humedad (n=3)	[7,55 – 8,24]	7,91	0,3460	7,91
Cenizas (n=3)	[4,10 – 4,56]	4,37	0,1660	4,37
Proteínas (n=2)	[4,50 – 5,32]	4,91	0,5825	4,91
Grasas (n=2)	[0,34 – 1,20]	0,77	0,6116	0,77
Fibra (n=4)	[73,65 – 80,41]	76,41	2,9303	76,41
Carbohidratos	-	5,62	-	5,62
Kilocalorías (kcal/100g)	-	49,07	-	-

4.1.2. Análisis químico-proximal para el cultivar Durga mata CBD.

Las muestras homogenizadas de raíz de *Cannabis sativa* L, cultivar Durga mata CBD fueron sometidas a los métodos 731 de la USP para humedad, método 942.05 de la AOAC para cenizas, método 920.39 de la AOAC para grasas, método 976.05 de la AOAC para proteínas, método 962.09 de la AOAC para fibra total, a análisis proximal de Weende para carbohidratos, con un cálculo final para determinar las calorías de las muestras. Todos los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 4.2. Los parámetros se ven expresados en valores promedios y rangos de valores (g/100g de raíz) y en base a porcentaje promedio.

Tabla 4.2. Resultados de análisis químico-proximal para el cultivar Durga mata CBD.

Parámetro	Rango de valores (g/100g)	Promedio (g/100g)	Desviación estándar (DS)	Porcentaje (%)
Humedad (n=3)	[6,83 – 8,06]	7,3833	0,6242	7,38
Cenizas (n=3)	[3,86 – 4,05]	3,9688	0,0973	3,97
Proteínas (n=2)	[4,53 – 5,57]	5,0487	0,7327	5,05
Grasas (n=2)	[0,53 – 0,56]	0,5456	0,0161	0,55
Fibra (n=4)	[71,52 – 86,09]	80,5520	6,6982	80,55
Carbohidratos	-	2,5016	-	2,50
Kilocalorías (kcal/100g)	-	35,1112	-	-

4.1.3. Comparación químico-proximal para ambos cultivares.

Se realizó la comparación entre ambos resultados químico-proximales de las variedades Pandora y Durga mata CBD de la especie *Cannabis sativa* L, obteniéndose los resultados expuestos en la tabla 4.3., con una masa de 100g de muestra de raíces.

Tabla 4.3. Comparación de resultados del análisis químico-proximal entre las variedades Pandora y Durga mata CBD en 100g de muestra de raíces.

Parámetro	Pandora	Durga mata CBD
	Promedio (g/100g)	Promedio (g/100g)
Humedad (n=3)	7,9100	7,3833
Cenizas (n=3)	4,3747	3,9688
Proteínas (n=2)	4,9123	5,0487
Grasas (n=2)	0,7712	0,5456
Fibra (n=4)	76,4113	80,552
Carbohidratos	5,6205	2,5016
Kilocalorías (kcal/100g)	49,07	35,11

4.2. Perfil de ácidos grasos

Los resultados de las muestras procesadas por análisis cromatográfico en equipo de CG fueron obtenidos por método electrofotometría de llama en base a un detector de llama ionizante (FID) e integradas por un software especializado que entrega las señales analíticas como cromatograma.

4.2.1. Análisis de cromatografía gaseosa del cultivar Pandora.

Las muestras homogenizadas de raíz de *Cannabis sativa* L, cultivar Pandora fueron sometidas a extracción, derivatización, reconstitución y final análisis por CG para análisis de perfil de ácidos grasos según Farmacopea Europea e ISP de Chile. Los resultados cuantificables según análisis de cromatograma de la muestra con el cromatograma del estándar de ácidos grasos se ven expresados en gramaje promedio cada 100 g de raíz o 100 g de grasa, y se exponen en la Tabla 4.4., junto al análisis de los ácidos grasos expuestos en la Tabla 4.5.

Tabla 4.4. Resultados del perfil de ácidos grasos para *Cannabis sativa* L, cultivar Pandora.

Ácido graso	Tipo	Proporción en raíz (g/100g)	Proporción en grasa (g/100g) o Porcentaje en grasa (%)
Ácido butírico	Saturado	0,0001	0,03
Ácido caprílico	Saturado	0,0001	0,03
Ácido cáprico	Saturado	0,0002	0,06
Ácido mirístico	Saturado	0,0011	0,32
Ácido miristoleico	Monoinsaturado	0,0002	0,06
Ácido pentadecanoico	Saturado	0,0001	0,04
Ácido palmítico	Saturado	0,0309	9,11
Ácido heptadecanoico	Saturado	0,0008	0,23
Ácido esteárico	Saturado	0,0054	1,59
Ácido elaídico	Monoinsaturado	0,0008	0,22
Ácido oleico	Monoinsaturado	0,0027	0,79
Ácido linolelaídico	Poliinsaturado	0,0006	0,17
Ácido linoleico	Poliinsaturado	0,0072	2,13
Ácido araquídico	Saturado	0,0024	0,71
Ácido γ -linolénico	Poliinsaturado	0,0012	0,37
Ácido cis-11-eicosenoico	Monoinsaturado	0,0014	0,43
Ácido linolénico	Poliinsaturado	0,0013	0,38
Ácido cis-11,14-eicosadienoico	Poliinsaturado	0,0031	0,91
Ácido behénico	Saturado	0,0192	5,68
Ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico	Poliinsaturado	0,0006	0,18
Ácido erúcico	Monoinsaturado	0,012	0,35
Ácido araquidónico	Poliinsaturado	0,0019	0,55
Ácido lignocérico	Saturado	0,0209	6,17
Total		0,1033	30,50

Tabla 4.5. Porcentajes de ácidos grasos según grado de insaturación, incluyendo análisis por omega-3 y omega-6.

Ácidos grasos	Porcentaje (%)
Saturados	78,53
Monoinsaturados	6,08
Poliinsaturados	15,40
Razón Ω -6/ Ω -3	8/1

4.2.2. Análisis de cromatografía gaseosa del cultivar Durga mata CBD.

Las muestras homogenizadas de raíz de *Cannabis sativa* L, cultivar Durga mata CBD fueron sometidas a extracción, derivatización, reconstitución y final análisis por CG para análisis de perfil de ácidos grasos según Farmacopea Europea e ISP de Chile. Los resultados cuantificables según análisis de cromatograma de la muestra con el cromatograma del estándar de ácidos grasos se ven expresados en gramaje promedio cada 100g de raíz o 100g de grasa, y se exponen en la Tabla 4.6., junto al análisis de los ácidos grasos expuestos en la Tabla 4.7.

Tabla 4.6. Resultados del perfil de ácidos grasos para *Cannabis sativa*, cultivar Durga mata CBD.

Ácido graso	Tipo	Proporción en raíz (g/100g)	Proporción en grasa (g/100g) o Porcentaje en grasa (%)
Ácido butírico	Saturado	0,0001	0,03
Ácido caprílico	Saturado	0,0002	0,03
Ácido cáprico	Saturado	0,0002	0,04
Ácido láurico	Saturado	0,0008	0,15
Ácido mirístico	Saturado	0,0011	0,32
Ácido miristoleico	Monoinsaturado	0,0009	0,15
Ácido pentadecanoico	Saturado	0,0003	0,05
Ácido cis-10-pentadecenoico	monoinsaturado	0,0003	0,05
Ácido palmítico	Saturado	0,0237	4,25
Ácido heptadecanoico	Saturado	0,0013	0,23
Ácido esteárico	Saturado	0,0078	1,41
Ácido elaídico	Monoinsaturado	0,0005	0,08
Ácido oleico	Monoinsaturado	0,0081	1,45
Ácido linoleico	Poliinsaturado	0,0058	1,04
Ácido araquídico	Saturado	0,0017	0,30
Ácido γ -linolénico	Poliinsaturado	0,0024	0,43
Ácido linolénico	Poliinsaturado	0,0020	0,35
Ácido heneicosanoico	Saturado	0,0007	0,12
Ácido cis-11,14-eicosadienoico	Poliinsaturado	0,0019	0,34
Ácido behénico	Saturado	0,0092	1,66
Ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico	Poliinsaturado	0,0016	0,28
Ácido erúcico	Monoinsaturado	0,0022	0,39
Ácido araquidónico	Poliinsaturado	0,0023	0,42
Ácido cis-13,16-docosadienoico	Poliinsaturado	0,0080	1,44
Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	Poliinsaturado	0,0026	0,47
Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	Poliinsaturado	0,0013	0,22
Total		0,0871	15,64

Tabla 4.7. Porcentajes de ácidos grasos según grado de insaturación, incluyendo análisis por omega-3 y omega-6.

Ácidos grasos	Porcentaje (%)
Saturados	54,56
Monoinsaturados	4,28
Poliinsaturados	41,16
Razón Ω -6/ Ω -3	2/1

4.2.3. Comparación de perfil de ácidos grasos para ambos cultivares.

Se compararon ambos resultados de perfil de ácidos grasos de los cultivares Pandora y Durga mata CBD de la especie *Cannabis sativa* L, para muestras con masa de 100g, obteniéndose los resultados expuestos en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Comparación de resultados del análisis de perfil de ácidos grasos entre los cultivares Pandora y Durga mata CBD en 100g de muestra grasa extraída de raíces.

Ácido graso	Pandora	Durga mata CBD
	Porcentaje en grasa (%)	Porcentaje en grasa (%)
Ácido butírico	0,03	0,03
Ácido caprílico	0,03	0,03
Ácido cáprico	0,06	0,04
Ácido láurico	0,00	0,15
Ácido mirístico	0,32	0,32
Ácido miristoleico	0,06	0,15
Ácido pentadecanoico	0,04	0,05
Ácido cis-10-pentadecenoico	0,00	0,05
Ácido palmítico	9,11	4,25
Ácido heptadecanoico	0,23	0,23
Ácido esteárico	1,59	1,41
Ácido elaídico	0,22	0,08
Ácido oleico	0,79	1,45
Ácido linoleico	0,17	0,00
Ácido linoleico	2,13	1,04
Ácido araquídico	0,71	0,30
Ácido γ -linolénico	0,37	0,43
Ácido cis-11-eicosenoico	0,43	0,00
Ácido linolénico	0,38	0,35
Ácido heneicosanoico	0,00	0,12
Ácido cis-11,14-eicosadienoico	0,91	0,34
Ácido behénico	5,68	1,66
Ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico	0,18	0,28
Ácido erúcico	0,35	0,39
Ácido araquidónico	0,55	0,42
Ácido lignocérico	6,17	0,00
Ácido cis-13,16-docosadienoico	0,00	1,44
Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	0,00	0,47
Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	0,00	0,22

5. Discusión

5.1. Procedimiento de análisis químico-proximal y perfil lipídico por cromatografía de gases.

El análisis químico-proximal es una herramienta de gran utilidad analítica al momento de establecer cuantitativamente la composición química de matrices orgánicas de origen animal, vegetal y fúngico. Es mediante este análisis que es posible definir, de mejor manera, los criterios para extracción, usos o síntesis de diversos productos a partir de los diferentes compuestos presentes en la matriz. Si bien el análisis como tal, consta de una variedad de métodos acreditados internacionalmente por organismos como la AOAC, o a nivel regional por la USP o la Farmacopea Europea; como cualquier otro método, este no se encuentra libre de susceptibilidad a errores, ya sean pre-analíticos, analíticos o post-analíticos. Es en este aspecto, que es importante señalar la importancia pre-analítica sujeta a este tipo de análisis de composición química, donde fácilmente diferencias en horario de recolección, periodos de regadío y abono, junto a otros factores podrían alterar considerablemente las concentraciones o cantidades de los analitos a estudiar.

Por otro lado, a nivel analítico, el análisis químico-proximal posee, según el método a emplear para el procesamiento de la muestra, distintas posibilidades de encontrarse con variables que alteren el resultado cuantitativo final obtenido por las técnicas. Es así como en la determinación de humedad pueden perderse otras

sustancias volátiles diferentes del agua, lo que podría incrementar el valor del agua contenida en la matriz vegetal.

Considerando las características propias de las muestras que corresponden a la porción subterránea de las plantas, toma particular interés la interpretación de la determinación de la materia mineral, al no ser esta del tipo cualitativo; por lo que no es posible identificar los minerales contenidos y sus proporciones. Tampoco es indicativa de la biodisponibilidad de ellos, por lo que las cenizas totales podrían corresponder no solo a la parte mineral de interés nutricional, sino que estas podrían tener un porcentaje que pudiera ser contaminación propiamente tal, por ejemplo sílice o contaminación de tipo ambiental, que además interfiere en la absorción de estos (Mora, 1991).

Otra variable a considerar dentro de los métodos empleados, corresponde al análisis de proteínas, el que podría verse sobreestimado ya que este no discrimina si se trata de nitrógeno proteico o proveniente de otra fuente, como por ejemplo urea, alcaloides u otras moléculas provenientes de fertilizantes o abonos. Por lo tanto a mayor cantidad de nitrógeno no proteico, mayor es el error al calcular el porcentaje de proteínas. Adicionalmente cabe destacar que se presume una composición de 16 g de nitrógeno por cada 100 g de proteínas; esto por no existir estudios que ratifiquen la proporción nitrógeno/proteínas para las proteínas de *Cannabis sativa* L, por lo que se utiliza el factor convencional estándar de 6,25 para realizar el cálculo de proteínas en las muestras estudiadas. (Mora, 1991).

Asimismo, en el análisis de grasas el valor podría sobrestimarse por la presencia de ceras, además de otros materiales liposolubles como los pigmentos contenidos en el extracto etéreo (Mora, 1991).

A nivel metodológico, el análisis de fibra puede verse interferido por el uso de bomba de vacío al momento del filtrado, ya que podría, incluso tomando precauciones con reactivo de kieselguhr en el crisol de Gooch, verse arrastrada fibra soluble, subestimando el valor real de la fibra total. Y finalmente el cálculo del porcentaje de carbohidratos por diferencia va a contener todos los errores expuestos anteriormente, si así hubieran incurrido, y de igual manera sucedería con el cálculo de calorías totales.

Cabe destacar que todos los métodos efectuados para el análisis químico-proximal son altamente operador dependiente, dado principalmente por la ausencia de equipos automatizados disponibles para el desarrollo de la mayoría de las técnicas. Esto repercute en la necesidad de poseer un operador experimentado en el uso de material de laboratorio de calidad analítica, así como de exhibir una rigurosidad metódica que sean capaces de reducir al mínimo las variables posibles a cometer.

A este nivel, cobran similar importancia lo discutido anteriormente para la determinación del perfil lipídico por cromatografía de gases, donde los resultados obtenidos pueden verse subestimados en su mayoría por errores pre-analíticos, específicamente relacionados con la preparación de la muestra. Por ejemplo, al arrastrar el extracto etéreo de grasa desde el balón de vidrio previo a la

derivatización o al traspasar la muestra ya derivatizada al vial color ámbar, entre otros. Además, producto del funcionamiento manual del inyector, la realización adecuada de la inyección de la muestra al equipo requiere especial atención, principalmente en la toma e inyección del volumen mínimo requerido para la realización efectiva del análisis, junto con asegurarse de la ausencia de burbujas dentro de la jeringa, las que interfieren significativamente en el resultado final del cromatograma.

Dentro de los posibles errores analíticos, se encuentra la posibilidad de que la columna quede con residuos de muestras anteriores o con residuos de la solución estándar, lo que interferiría con las señales del análisis cromatográfico siguiente, incrementando el número o intensidad de algunas señales cromatográficas. Por esto se tomó la precaución de utilizar solución blanco, en este caso diclorometano, y corroborar por medio de una corrida cromatográfica la presencia aislada de la señal que corresponde al solvente, en ausencia de cualquier otra.

Otras variantes que son necesarias vigilar durante el proceso de corrida cromatográfica, corresponden a los parámetros físicos de la columna en uso, los cuales están directamente relacionados con el tiempo de corrida de los analitos en estudio.

Finalmente, los errores post-analíticos, tanto para el análisis químico proximal, como para el análisis de perfil de ácidos grasos, pueden verse como los más comunes a cometer dado el alto número de valores a tomar en cuenta previo realizar la conformación del resultado final obtenido. Aun así, es posible reducir

estos errores al efectuar verificaciones constantes durante el desarrollo de los métodos, que permitan facilitar el análisis o uso de fórmulas, al cerciorarse de tener detalle de cada variable o factor presente durante la realización de la técnica. En el caso particular de la cromatografía gaseosa, la integración de las señales analíticas sugiere un desafío adicional, ya que el integrarlas correctamente es un paso crucial en la cuantificación del total de cada analito en estudio, y es a partir de esta integración, que el software encuentra el inicio, final y máximo para cada pico, construyendo así una línea base y área correspondiente para cada analito en particular. Es por esto que, un error a este nivel deriva en una malinterpretación de los resultados obtenidos y con ello en una subestimación o sobreestimación, según corresponda al caso particular, de los valores para cada señal analítica del cromatograma.

5.2 Análisis comparativo de los dos cultivares en estudio.

Los resultados obtenidos tras efectuar el análisis químico proximal contaron con precisión en sus valores y no arrojaron grandes diferencias entre las raíces de ambos cultivares en estudio; siendo lo más relevante el contenido de kilocalorías (49,01 kcal/100 g el cultivar Pandora; 35,11 kcal/100 g el cultivar Durga mata CBD), el contenido de hidratos de carbono (5,62% Pandora; 2,50% Durga mata CBD) y el contenido de fibra (76,41% Pandora; 80,55% Durga mata CBD). Este último resultado fue considerablemente alto en proporción al total de muestra de raíz analizado para ambos cultivares, lo que coincide con el alto contenido de fibra de la

parte aérea de la *Cannabis sativa* L, específicamente el tallo que contiene sobre un 90% de su biomasa compuesta por fibra (Brown, 2003).

La mayor cantidad de datos acerca de la composición de alguna porción de esta especie, corresponde a la semilla, por su actual interés nutricional, con un promedio entre 20-25% de proteínas, 29-34% de grasas, 5-6% de cenizas, 2-3% de carbohidratos, y 33-39% de fibra (House et al., 2010; Vonapartis et al., 2015); porcentajes que se justifican por su rol biológico. En cambio, los resultados obtenidos para la composición química de las raíces, establece que ambos cultivares presentan una baja cantidad de proteínas (4,91% Pandora; 5,04% Durga mata CBD), baja cantidad de grasa total (0,77% Pandora; 0,55% Durga mata CBD), similar cantidad de cenizas (4,37% Pandora; 3,97% Durga mata CBD), y una mayor cantidad de carbohidratos para el caso del cultivar Pandora (5,62%), y una cantidad similar en el cultivar Durga mata CBD (2,50%). En el caso de la fibra, este valor superó de manera considerable la fibra contenida en la semilla, siendo mayores del 75,00% para las raíces de ambos cultivares. Todo esto se relaciona con la función estructural de las raíces, más que de reservorio para la planta.

En cuanto a los resultados obtenidos de los cromatogramas de las muestras para el perfil de ácidos grasos, sólo fue posible identificar 23 ácidos grasos para el cultivar Pandora, de un total de 38 señales analíticas verificables en cada cromatograma obtenido; mientras que para el cultivar Durga mata CBD, se identificaron 26 ácidos grasos de un total de 48 señales analíticas. Esto deja un total de 15 analitos sin identificar para la variedad Pandora, y de 12 para Durga mata

CBD. Lo que sugiere el uso de más de un estándar de ácidos grasos o la utilización de un estándar más amplio y específico para estudios cromatográficos de esta planta o el uso de mejores tecnologías vigentes. Por otro lado, del total de ácidos grasos identificados y cuantificados (60,53% en Pandora; 54,17% en Durga mata CBD), fue posible establecer que, para el cultivar Pandora, estos corresponden a un 30,50% del total de la materia grasa y un 0,10% del total de la raíz; mientras que en el cultivar Durga mata CBD corresponden al 15,64% de la materia grasa total y a un 0,09% de la raíz.

En análisis específico de los perfiles de ácidos grasos para ambos cultivares establece que los ácidos grasos predominantes fueron el ácido palmítico (9,11% Pandora; 4,25% Durga mata CBD), el ácido behénico (5,68% Pandora; 1,66% Durga mata CBD) y el ácido esteárico (1,59% Pandora; 1,41% Durga mata CBD). Adicionalmente, para el cultivar Pandora los otros dos ácidos grasos de mayor relevancia fueron el ácido lignocérico (6,16%) y el ácido linoleico (2,13%); mientras que para Durga mata CBD, fueron el ácido oleico (1,45%) y el ácido cis-13,16-docosadienoico (1,44%).

En ambos cultivares, se encontró una alta cantidad de ácidos grasos saturados. En la variedad Pandora se alcanzó el 78,53% del extracto de grasas, mientras que en Durga mata CBD se encontró un 54,56% de saturación. Sin embargo, hubo una gran diferencia en la proporción de ácidos grasos insaturados puesto que el cultivar Pandora presentó sólo un 21,47%, de los que el 6,08% corresponde a ácidos grasos monoinsaturados y 15,40% de polinsaturados;

mientras que el cultivar Durga mata CBD presentó un 45,44% de ácidos grasos insaturados, con un 4,28% de monoinsaturados y 41,16% de polinsaturados.

Respecto al análisis de los ácidos grasos insaturados, es posible establecer una presencia importante de ácidos grasos Ω -6 (ácidos linoleaídico, linoléico, gamma-linoléico, 8,11,14-cis eicosatrienoico y araquidónico) y Ω -3 (ácidos linolénico, 11,14,17-cis eicosatrienoico, cis-5,8,11,14,17-cis eicosapentanoico y cis-4,7,10,13,16 docosahexaenoico). Estos ácidos grasos son clasificados como esenciales para el ser humano debido a que no se posee la maquinaria enzimática necesaria para biosintetizarlos y por lo tanto requieren ser aportados por la dieta. Estos idealmente deben presentarse en una relación de 5/1 con un máximo de 10/1 (Jiménez et al., 2013; Martin et al., 2006). Si bien ambos cultivares contienen un valor adecuado, la razón Ω -6/ Ω -3 fue bastante más favorable para el cultivar Pandora, por ser esta de alrededor 2/1.

La mayor parte de los ácidos grasos contenidos en ambas muestras de raíces fueron coincidentes, sin embargo hubo ácidos grasos que fueron exclusivos para cada cultivar, siendo los ácidos grasos linolelaídico, cis-11-eicosenoico y lignocérico exclusivos para el cultivar Pandora. Asimismo, los ácidos grasos láurico, cis-10-pentadecenoico, heneicosanoico, cis-13,16-docosadienoico, cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico y cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico estaban presentes exclusivamente para Durga mata CBD.

Si bien, se trabajó con raíces de *Cannabis sativa* L, las especies utilizadas corresponden a híbridos de la planta. Por lo tanto, las diferencias obtenidas en el

análisis de la composición para ambas variedades, responde a esta característica intrínseca presente en las muestras de ambos cultivares, donde la composición de Pandora se ve influenciada en un 70% por *Cannabis sativa* var. *índica*, 20% var. *sativa* y 10% var. *ruderalis*; mientras que la Durga mata CBD posee un 90% de var. *índica* y 10% var. *sativa*. Siendo precisamente esta diferencia en las características de hibridación, las que definen sus rasgos metabólicos a nivel de precursores, como ácidos grasos, para la síntesis de metabolitos secundarios presentes en alta concentración en la planta como serían los fitocannabinoides, así como en las diferencias obtenidas dentro de los porcentajes de fibra o carbohidratos presentes en la composición de ambas raíces.

Es a través de los perfiles de composición química aplicada a materias orgánicas, específicamente vegetales, que es posible establecer patrones de calidad a nivel industrial y responder efectivamente a la legislación de los distintos países en torno a dicha materia. También son las herramientas que permiten definir la implementación de distintos métodos de extracción y procesamiento según las características químicas presentes, así como dar luces de posibles usos o aprovechamiento de ciertos rasgos químicos presentes con actividad o funciones físicas útiles para aplicar a nivel doméstico o industrial. En este punto, es que un profesional calificado y capacitado resulta ser un factor imprescindible para desarrollar, interpretar y proyectar, a partir de este tipo de análisis, al avance de nuevos productos de origen vegetal.

6. Conclusiones

Se determinó la composición química-proximal de proteínas, grasas, fibra dietética total, humedad, cenizas y carbohidratos, junto con el cálculo de calorías presentes en las raíces de los cultivares Pandora y Durga mata CBD de la especie botánica *Cannabis sativa* L., de manera satisfactoria, no observándose diferencias sustanciales entre ambos cultivares, siendo la fibra dietética total el mayor componente.

En base al estándar disponible se identificaron y cuantificaron los ácidos grasos presentes en las raíces de ambos cultivares de la especie botánica *Cannabis sativa* L., observándose algunas diferencias cualitativas y cuantitativas respecto de los ácidos grasos evaluados, presentando además, una razón Ω -6/ Ω 3 mas favorable para el cultivar Pandora.

7. Bibliografía

- Andre, C. M., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Ángeles, G., Brindis, F., Niizawa, C., & Ventura, R. (2014). *Cannabis sativa* L., una planta singular. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(4), 1–6. Recuperado el 13-06-2017 desde [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000400004&lng=es&nrm=iso&tlng=es]
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. (1990). *Official methods of analysis*. (K. Helrich, Ed.) (15th Editio). Virginia, United States of America: Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Inc.
- Avello, M., Pastene, E., Pola, F., & Córdova, P. (2017). Potencial uso terapéutico de cannabis. *Revista Médica de Chile*, 145, 360–367. Recuperado el 20-06-2017 desde [<http://www.scielo.cl/pdf/rmc/v145n3/art10.pdf>]
- Brown, D. (2003). *Cannabis the genus Cannabis. Medicinal and aromatics plants - industrial profiles* (1st Editio). Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic.
- Council of Europe. (2014). *European Pharmacopoeia (PhEur), Volumen 1*. (Council of Europe, Ed.) (8th Editio). France, Paris: European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (EDQM).

- De la Fuente, J., Álvarez, D., Rodríguez, R., Ramos, L., Porspéro, O., Mesa, F., ... Melgar, M. (2015). *Marihuana y Salud* (1° Edición). Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Escudero Álvarez, E., & González Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutricion Hospitalaria*, 21(SUPPL. 2), 61–72.
- Espitia-Pérez, P., Pardo-Plaza, Y., & Montalvo-Puente, A. (2013). Características del análisis proximal de harinas obtenidas de frutos de plátanos variedades papocho y pelipita (Musa ABB Simmonds). *Acta Agronomica*, 62(3), 189–195.
- Farag, S., & Kayser, O. (2017). The Cannabis Plant: Botanical Aspects. In Technical University Dortmund (Ed.), *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (pp. 3–12). Dortmund, Germany: Elsevier Inc.
- Hodgson, J. (1987). *Muestreo y Descripción de Suelos* (1° Edición). Barcelona, España: Editorial Reverté, SA.
- Honórico, K., Arroio, A., & Borgues, A. (2006). Aspectos terapêuticos de compostos da planta Cannabis sativa. *Quim. Nova.*, 29(2), 318–325.
- House, J. D., Neufeld, J., & Leson, G. (2010). Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11801–11807.
- Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). (2005). Procecimiento para determinar materia grasa : Método Soxhlet. Santiago, Chile: Ministerio de Salud (MINSAL).

- Jiménez, P., Masson, L., & Quitral, V. (2013). Composición química de semillas de chía, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(2), 155–160.
- Martínez, L., Tacoronte, J., Nuñez, Y., Montalbán, M., & Cabrera, H. (2007). Potencial terapéutico de los cannabinoides como neuroprotectores. *Revista Cubana de Farmacia*, 1–11.
- Mc Partland, J., & Mediavilla, V. (2002). *Cannabis and cannabinoids: pharmacology, toxicology and therapeutic potential*. New York, USA.: The Haworth Integrative Healing Press.
- Morales, P., Hurst, D., & Reggio, P. (2017). Molecular targets of the phytocannabinoids-a complex picture. *Prog Chem Org Nat Prod.*, 103(1), 103–131.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (ONUDD). (2010). *Métodos recomendados para la identificación y el análisis de Cannabis y los productos del Cannabis*. New York, USA.: Organización de Naciones Unidas (ONU).
- Osorio, J., & Tangarife, H. (2009). Cannabis, una opción terapéutica. *Biosalud*, 8(1), 166–177. Recuperado el 09-04-2017 desde [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502009000100019&lng=en&nrm=iso&tlng=es]
- Pascual, J., & Fernández, B. (2017). Breve reseña sobre la farmacología de los

cannabinoides Brief review on the pharmacology of cannabinoids Dr. C. José Ramón Pascual Simón. *MEDISAN*, 21(3), 334–345. Recuperado el 13-03-2017 desde [<http://scielo.sld.cu/pdf/san/v21n3/san14203.pdf>]

Pertwee, R. (2014). *Handbook of Cannabis* (1st Editio). Oxford, England: Oxford University Press.

The United States Pharmacopeia Convention. (2013). *United States Pharmacopeia 36 (USP36) & National Formulary 31 (NF31), Volumen 1* (31st Edition). Rockville, United States of America.

Trowell H, Southgate DA, Wolever TM, Leeds AR, Gassull MA, J. D. (1976). Dietary fibre redefined. *Lancet*, (967).

Vonapartis, E., Aubin, M.-P., Seguin, P., Mustafa, A. F., & Charron, J.-B. (2015). Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 8–12.

8. Anexos

Anexo 8.1. Resolución del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de la Región Metropolitana. Hoja 1 de 3.

22/9/2014

ceropapel.sag.gob.cl/documentos/documento.php?idDocumento=22452068


RESOLUCIÓN EXENTA N°:2490/2014

AUTORIZA A FUNDACIÓN DAYA LA SIEMBRA, PLANTACIÓN, CULTIVO Y COSECHA DE ESPECIE CANNABIS SATIVA EN LOS TÉRMINOS QUE INDICA.

- 08/ 09/ 2014

VISTOS:

La solicitud de Fundación DAYA de fecha 23 de mayo de 2014 y su Declaración Jurada Simple, suscrita ante Notario Público de Santiago Sr. Juan Facuse Heresí con fecha 10 de junio de 2014; ORD. N° 4246/2014 del Intendente Región Metropolitana; ORD. N°1353/2014 del Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA); ORD. N°1200/2014 del Instituto de Salud Pública; la Ley 20.000/2005 que Sanciona el Tráfico Ilícito de Estupefacientes y Sustancias Sicotrópicas y su Decreto del Ministerio del Interior N° 867/2007 que Aprueba Reglamento de la Ley N° 20.000; D.L N° 3557 de 1980, sobre Protección Agrícola; Lo dispuesto en la Ley N° 18.755; modificada por la Ley N° 19.283 y las facultades que invisto como Director Regional (TYP) del SAG mediante Resolución N° 133 del 05 de mayo de 2014 de la Dirección Nacional.

CONSIDERANDO:

1. Que de acuerdo a lo establecido en el artículo N° 9 de la Ley 20.000, corresponde al Servicio Agrícola y Ganadero autorizar la siembra, plantación, cultivo y cosecha de especies vegetales del género Cannabis y otras productoras de sustancias estupefacientes.
2. Que con fecha 23 de mayo de 2014, se presenta a la Dirección Regional Metropolitana del SAG una solicitud de autorización de siembra de la especie Cannabis, por parte de Fundación DAYA, la cual tiene como objeto la implementación y ejecución del estudio denominado "USO COMPASIVO DE ACEITE DE CANNABIS COMO TERAPIA COMPLEMENTARIA PARA EL MANEJO DEL DOLOR EN USUARIOS DE ESTABLECIMIENTOS DE SALUD Y DE FUNDACIÓN DAYA EN LA COMUNA DE LA FLORIDA"
3. Que, una vez efectuada la revisión de la documentación presentada, se acredita que esta cumple con todos los requisitos señalados en los artículos 7 y 8 del Decreto N° 867, de 2007.
4. Que con fecha 03 de julio de 2014, mediante Ordinarios N° 1188, N° 1194 y N° 1195, éste Servicio solicita informe a diversos organismos públicos, a Instituto de Salud Pública (ISP), a Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA).
5. Que mediante Ordinario N° 1353/2014, el Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA) señala que "tal investigación puede entregar importantes conclusiones que aporten al conocimiento médico y científico respecto del uso terapéutico del cannabis y sus derivados..."
6. Que mediante Ordinario N° 1200/2014, el Instituto de Salud Pública informa "que como encargados del registro de productos farmacéuticos, nos parece que existe evidencia que prueba que el uso de cannabis como tratamiento de terapia complementaria ha sido utilizados en pacientes de varios países...que dicho estudio permitirá contar con evidencia nacional para el uso terapéutico de la cannabis".
7. Que Fundación Arturo López Pérez, así como, Farmacopea Chilena y Universidad de Valparaíso apoyan el presente de proyecto.
8. Que mediante Oficio N° 4246/2014, el Intendente de la Región Metropolitana remite a este Servicio la documentación solicitada en virtud del artículo N° 9 del Decreto N° 867 y señala que "considera positivo el desarrollo del mencionado proyecto, el cual permitirá efectuar los estudios médicos pertinentes para la elaboración de terapias y productos farmacéuticos necesarios para el tratamiento de pacientes oncológicos, mejorando sustancialmente su calidad de vida"
9. Que analizados los antecedentes por este Servicio, especialmente los informes acompañados, el Convenio de colaboración entre la Fundación DAYA y la Ilustre Municipalidad de La Florida, y las opiniones técnicas de instituciones como la Fundación Arturo López Pérez, La Universidad de Valparaíso, el Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol, y el Instituto de Salud Pública, Intendencia Regional Metropolitana; organismos que han emitido informes favorables, manifestando interés a la realización del proyecto denominado "USO COMPASIVO DEL ACEITE DE CANNABIS COMO TERAPIA COMPLEMENTARIA PARA EL MANEJO DEL DOLOR EN USUARIOS DE ESTABLECIMIENTOS DE TERAPIA COMPLEMENTARIA PARA EL MANEJO DEL DOLOR EN USUARIOS DE ESTABLECIMIENTOS DE SALUD Y DE FUNDACIÓN DAYA EN LA COMUNA DE LA FLORIDA".

RESUELVO:

<http://ceropapel.sag.gob.cl/documentos/documento.php?idDocumento=22452068>

Anexo 8.1. Resolución del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de la Región Metropolitana. Hoja 2 de 3.

22/9/2014

ceropapel.sag.gob.cl/documentos/documento.php?idDocumento=22452068

- 1.
- 2.
- 3.
4. El interesado deberá velar por la existencia de algún sistema que impida el acceso al lugar donde se desarrolla el cultivo de cualquier persona que no esté directamente encargada de este.
5. El interesado deberá comunicar a la Dirección Regional del Servicio Agrícola y Ganadero, con una anticipación de 30 días, la fecha exacta de la siembra, la cual sólo podrá efectuarse con el material de reproducción que se indicó en la presentación en cumplimiento del artículo 7 letra d) del Reglamento de la Ley N° 20.000. El remanente del material de reproducción que no se siembre deberá destruirse en un plazo de 3 días.
6. Del mismo modo el interesado deberá comunicar a la Dirección Regional Metropolitana del Servicio Agrícola y Ganadero, la fecha exacta de la cosecha, con una antelación de no inferior a 60 días, contados desde la fecha indicada para el inicio de la misma.
7. Finalizada la cosecha y separado el producto, las plantas, sus rastrojos, florecencia, semillas u otras partes activas deberán ser eliminadas mediante incineración por el interesado, dentro de los tres días siguientes, en presencia de un Inspector del Servicio Agrícola y Ganadero y de un funcionario de la Policía de Investigaciones o de Carabineros de Chile de la unidad más próxima al predio. De tal diligencia se levantará un acta, que suscribirán los funcionarios asistentes y el interesado, copia de la cual se remitirá a este Servicio. El total del producto de la cosecha, deberá destinarse exclusivamente a la elaboración de aceite, prohibiéndose expresamente cualquier otro uso distinto, especialmente, conservarlo para semilla o consumirlo sin transformarlo en aceite.
8. Toda maquinaria, implementos y envases empleados en la cosecha deberán limpiarse prolijamente en el mismo suelo donde se estableció el cultivo, como requisito previo para su salida.
9. Para el efecto del transporte a laboratorio del producto de la cosecha, para la elaboración del aceite que la solicitud indica es la finalidad del proyecto que por esta Resolución se autoriza, el interesado deberá requerir previamente al Servicio Agrícola y Ganadero el sellado del contenedor y/o vehículo y una guía de libre tránsito, en la que se individualizará el medio de transporte, cantidad de los productos, ruta a utilizar y destino; asimismo, al llegar el producto a laboratorio, no se podrán descargar ni romper los sellos si no se encuentra presente un Inspector del Servicio, para lo cual el interesado deberá solicitar la intervención de la Oficina correspondiente, con la debida antelación. Dicha guía deberá ser visada por la unidad de Carabineros más próxima al predio y también por aquella correspondiente al lugar de destino de los productos.
10. El transporte de los productos deberá realizarse bajo condiciones de seguridad que eviten toda pérdida de material durante el trayecto.
11. El solicitante deberá informar a este Servicio, sobre el producto que no se utilice o no termine en aceite, que es la finalidad del proyecto, ya que se prohíbe expresamente cualquier otro uso distinto. Asimismo, Fundación DAYA deberá llevar un registro documental y digital en el cual indicara la cantidad de aceite que produzca, como se repartirá dicho aceite e informar que ocurre con la aplicación del producto.
12. El interesado deberá tener a disposición de las entidades fiscalizadoras, una permanente y completa rastreabilidad física y documental del material ingresado, producido y transportado.

Anexo 8.1. Resolución del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de la Región Metropolitana. Hoja 3 de 3.

ceropapel.sag.gob.cl/documentos/documento.php?idDocumento=22452068

13. El recinto podrá ser inspeccionado por las entidades fiscalizadoras en todo tiempo, y el interesado quedará obligado a facilitar el cumplimiento de su cometido a los fiscalizadores de esas entidades.
14. Esta autorización tendrá vigencia a contar de la fecha de la presente resolución hasta mayo de 2015.
15. El incumplimiento de alguna de las obligaciones que establece la presente Resolución, determinará que la autorización quedará sin efecto, quedando sujetos a responsabilidad penal, el solicitante y el propietario del predio, sus representantes, los socios, directores, administradores y miembros, junto con las personas encargadas del cultivo. El hecho de haber quedado sin efecto la autorización, deberá denunciarse al Ministerio Público o Carabineros de Chile.

ANOTESE Y TRANSCRIBASE

**OSCAR ENRIQUE CONCHA DÍAZ
DIRECTOR REGIONAL (TYP) REGIÓN
METROPOLITANA - SERVICIO AGRÍCOLA Y
GANADERO**

DBC/DMP

Distribución:

- Oscar Enrique Concha Díaz - Director Regional (TyP) Región Metropolitana - Servicio Agrícola y Ganadero - Or.RM
- Pablo José Willson Avaria - Jefe División Jurídica
- Roberto Andres Rojas Fabris - Analista Jurídico División Jurídica
- Daniela Nabiha Bahamonde Chelech - Encargada Jurídica Región Metropolitana - Or.RM
- Daisy Millaleo Padilla - Funcionario Jurídica Región Metropolitana - Or.RM
- Rodrigo Astete Rocha - Jefe (TyP) División Protección Agrícola y Forestal
- Violeta Patricia Peña Moraga - Colaborador/a División Protección Agrícola y Forestal
- Rodolfo Carter Fernández - Alcalde I. Municipalidad de La Florida
- Ana María Gazmuri Vieira - Representante Legal Fundación DAYA
- CLAUDIO ORREGO INTENDENTE REGION METROPOLITANA
- Ricardo Fábrega Lacoa - Director (TYP) Instituto de Salud Pública
- Lidia Amarales Osorio - Directora (TYP) Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol
- Leonardo Acuña Vilches - Prefecto Inspector, Jefe Nacional Antinarcoóticos y Contra el Crimen Organizado Policia de Investigaciones
- Omar Cortez Zapata - Teniente Coronel Carabineros de Chile - 36° Comisaría de La Florida.

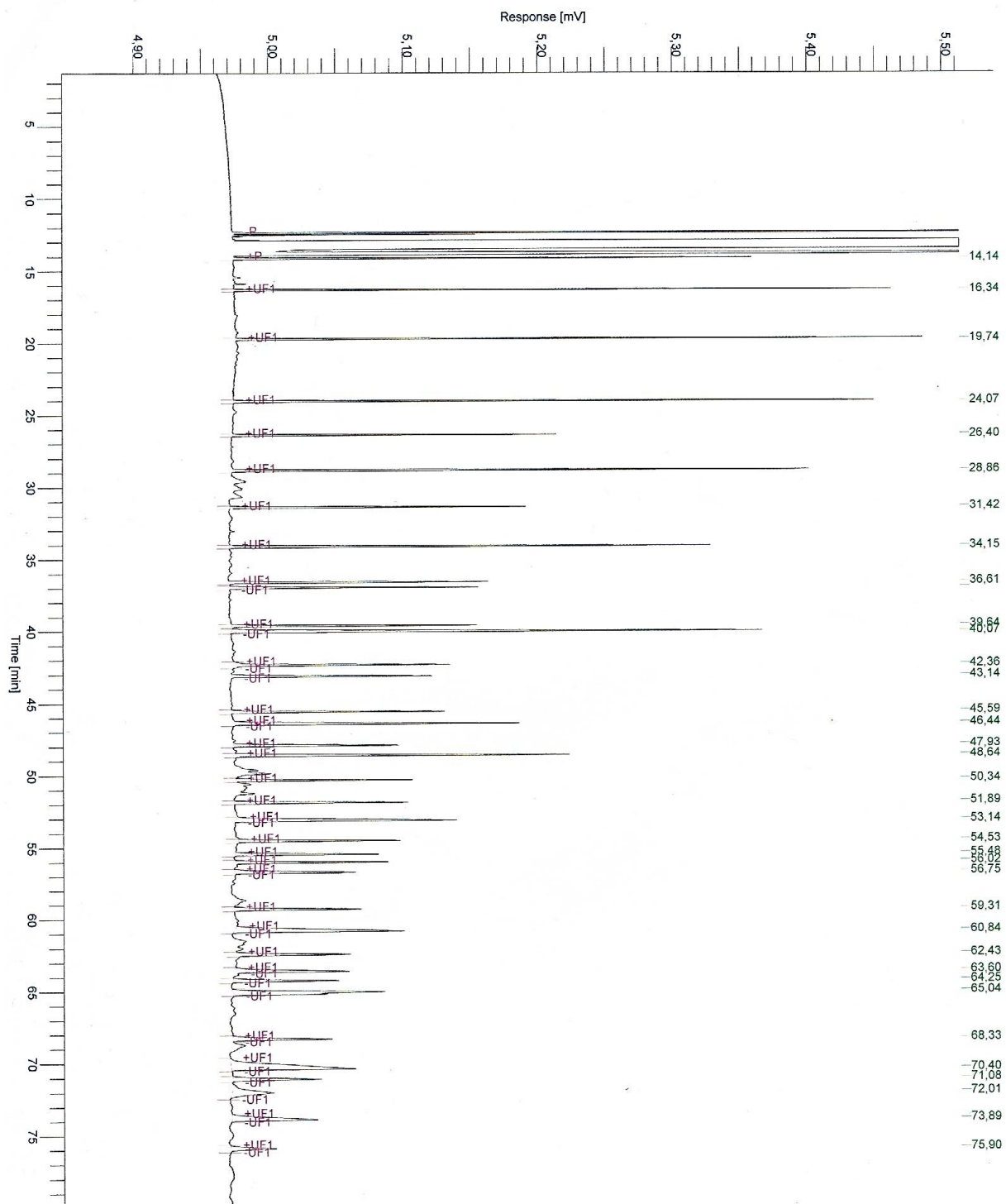
Región Metropolitana - Servicio Agrícola y Ganadero - -



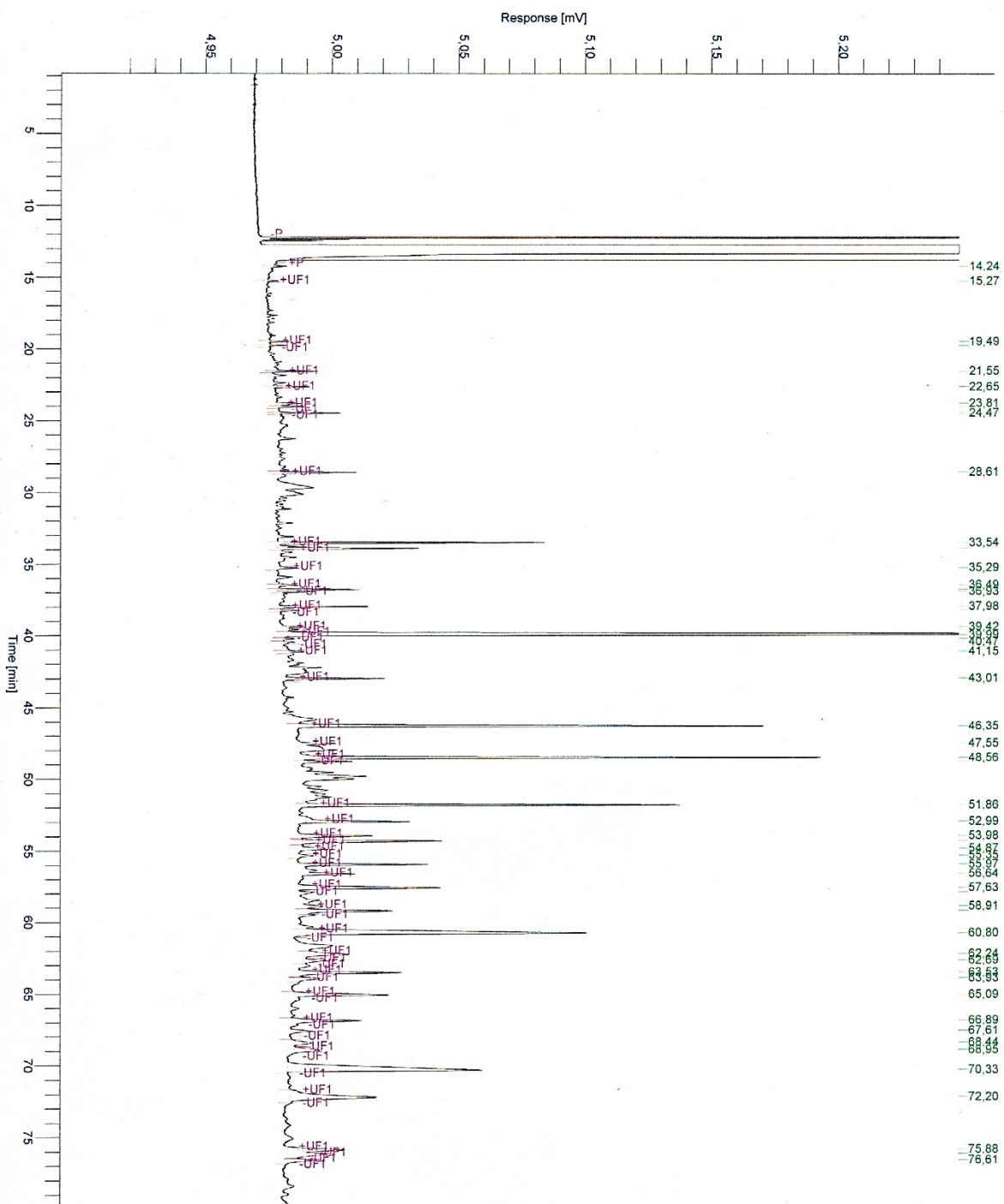
El presente documento ha sido suscrito por medio de firma electrónica avanzada en los términos de la Ley 19.799 (Sobre Documentos Electrónicos, Firma Electrónica y Servicios de Certificación de dicha Firma), siendo válido de la misma manera y produciendo los mismos efectos que los expedidos por escrito y en soporte de papel, con firma convencional.

El documento original está disponible en la siguiente dirección
url:<http://custodiafirma1409.acepta.com/v01/b281613ac4ede81abb8bd88b29a2b22f796ca8b>

Anexo 8.2. Cromatograma del estándar FAME mix.



Anexo 8.3. Cromatograma de extracto derivatizado de muestra grasa de raíces de *Cannabis sativa* L., cultivar Durga mata CBD.



Anexo 8.4. Cromatograma de extracto derivatizado de muestra grasa de raíces de *Cannabis sativa* L., cultivar Pandora.

