

COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE DESCARBOXILACIÓN DE LAS FORMAS ÁCIDAS CBDA Y THCA A SUS FORMAS NEUTRAS CBD Y THC, EN ACEITES MEDICINALES DE CANNABIS

María Marcela Amaro¹⁺, Leonardo Bajda^{1,2+} y Guillermina A. Bongiovanni^{1,3}

1- Laboratorio de Cromatografía del PROBIEN, CONICET - UNCo, Neuquén, Argentina

2- Facultad de Administración y Economía, UNCo, Neuquén, Argentina

3- Facultad de Ciencias Agrarias, UNCo, Río Negro, Argentina

⁺Los autores tuvieron el mismo grado de participación en los desarrollos experimentales descritos.

Email: marcela.amaro@probien.gob.ar, cromatografia@probien.gob.ar

RESUMEN

Desde la legalización del uso medicinal e investigación de *Cannabis sativa* ha surgido gran interés en los métodos de obtención de extractos con actividad terapéutica. Entre otros metabolitos, esta planta produce cannabinoides ácidos que, por descarboxilación, son transformados en cannabinoides neutros con actividad farmacológica muy diferente. En el marco de los servicios de análisis que brinda el PROBIEN, se compararon métodos de descarboxilación de CBDA y THCA (formas ácidas) con el fin de seleccionar el más eficiente para la obtención de CBD y THC (formas neutras). Se determinó la cinética de descarboxilación durante tratamiento térmico en Baño María, autoclave, baño de glicerina y mufla. Los cannabinoides ácidos y neutros fueron identificados y cuantificados por cromatografía líquida de alta performance con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Los resultados indican que la incubación en baño de glicerina a 145°C durante 20 minutos, sería un procedimiento eficiente, reproducible y económico.

1. Introducción

La especie *Cannabis sativa* L. es una de las plantas medicinales más antiguas del mundo, pero la investigación científica de sus actividades farmacológicas ha sido muy demorada por su vinculación con el uso recreativo de las variedades con alto contenido en el cannabinoide delta-9-tetrahidrocannabinol o THC, el cual tiene efecto psicotrópico y es una droga ilegal (estupefaciente) en muchos países. Por otro lado, el THC también tiene propiedades medicinales y el cannabis tiene más de 500 compuestos bioactivos, con actividad medicinal comprobada o en estudio. Entre ellos, más de 100 cannabinoides y otros compuestos no cannabinoides, como flavonoides, terpenos, esteroides, ácidos grasos, compuestos nitrogenados, alcaloides, entre otros (Bajda et al., 2023; dos Santos and Romao, 2023; Datta et al., 2021). La abundante evidencia científica del valor medicinal del cannabis hizo que, en diciembre de 2020, la Comisión de Estupefacientes de las Naciones Unidas (CND), órgano encargado de la política de drogas de la ONU, eliminara al cannabis de la lista IV, referida a drogas adictivas sin propiedades medicinales (fuente digital: CND, 2020). Esta

modificación es el reconocimiento de las propiedades terapéuticas del cannabis y ha significado un fuerte aliciente para avanzar en las investigaciones del uso de los derivados del cannabis para el tratamiento de Parkinson, Alzheimer, cáncer, COVID-19, diabetes tipo 2, y muchas otras patologías (dos Santos and Romao, 2023; Fonseca et al., 2023; Mukherjee et al., 2022). Además, ya se comercializan los fármacos el Sativex® (cannabidiol CBD y THC) para el tratamiento de la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple que no responden a otros medicamentos (en Canadá y países europeos) y el Epidiolex® (CBD) para reducir las convulsiones en pacientes con epilepsia de Dravet y síndrome de Lennox-Gastaut (en Estados Unidos). Estos fármacos contienen las formas neutras de los cannabinoides. Sin embargo, la planta de cannabis produce sus formas ácidas, por ejemplo, ácido cannabidiólico (CBDA) y ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) que no tiene efecto psicotrópico, ambos con propiedades farmacológicas diferentes a sus derivados neutros. Los cannabinoides ácidos pueden transformarse en cannabinoides neutros mediante la pérdida de dióxido de carbono, por un proceso llamado descarboxilación. Este

proceso ocurre de forma natural en la planta, pero en una proporción muy baja, por lo que los cannabinoides neutros están en muy bajo porcentaje. Sin embargo, las condiciones de almacenamiento tras la cosecha, como luz, porcentaje de humedad y principalmente temperatura, pueden acelerar este proceso (Das et al., 2022; Seo et al., 2022), haciendo que los aceites y otros extractos contengan cantidades variables y pocas veces controladas, de las formas neutras. Por otro lado, también ocurre la descomposición del THC formando CBN. Los cannabinoides ácidos y neutros y el CBN tienen actividades biológicas, pero diferentes a las de sus precursores por lo que la descarboxilación es un proceso que modifica las propiedades farmacológicas de los extractos de cannabis. Además, actualmente tienen mayor valor farmacológico las formas neutras de CBD y THC, por ser los más estudiados y aprobados para uso clínico (Seo et al., 2022).

En el Laboratorio de Cromatografía del PROBIEN (Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas, CONICET-Universidad Nacional del Comahue) funciona un Servicio Técnico de Alto Nivel (STAN ST4856 “Análisis cuantitativo de cannabinoides y terpenos en aceites; tinturas y extractos de cannabis”) coordinado por la Dra. Guillermina A. Bongiovanni, profesora de Química General Agrícola en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue y miembro de la RACME (Red Argentina de Cannabis Medicinal del CONICET). Con la experiencia en numerosos análisis de muestras de cannabis y a partir del requerimiento de otros laboratorios de control de calidad de extractos de cannabis, así como de laboratorios que pretenden brindar este servicio y de usuarios particulares, se optimizaron los métodos de descarboxilación y de análisis de cannabinoides ácidos y neutros. Para investigar el rendimiento de la descarboxilación del CBDA y THCA en aceites de cannabis, se examinaron muestras tratadas a diferentes temperaturas y tiempos para seleccionar un procedimiento eficiente para aumentar la cantidad de CBD y THC en los aceites.

2. Materiales y Métodos

Las muestras utilizadas en los ensayos fueron obtenidas por donaciones de asociaciones de cannabis cultores.

2.1. Métodos de descarboxilación del CBDA y THCA, para aumentar los niveles de CBD y THC

Se comparó la cinética de descarboxilación de las formas ácidas mediante tratamientos térmicos en un rango determinado de temperaturas (100-145°C) y tiempos (0-120 min), buscando un método asequible y reproducible, que permita lograrlo de manera eficiente. Los tratamientos térmicos ensayados para estudiar la cinética de descarboxilación de CBDA y THCA fueron: Baño María (100°C), autoclave (121°C; 1 Atm), baño de glicerina y mufla (145°C). Las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida de alta performance, en un equipo con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para la identificación y cuantificación de las formas ácidas y neutras en muestras de aceite de cannabis.

2.2. Identificación y cuantificación de CBD y THC por HPLC-DAD

Los análisis se llevaron a cabo utilizando un sistema HPLC Agilent (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.) de la serie 1200, que consiste en una bomba G1310A, un disolvente desgasificador G1322A y un inyector automático G1329A. Se registró el espectro completo en el rango de 200-400 nm usando un detector de arreglo de diodos G1315D (PDA, en inglés). La separación cromatográfica se consiguió utilizando una columna ZORBAX Eclipse Plus C18, Rapid Resolution (4.6 x 100mm, 3.5 µm, Agilent). El control del equipo, la adquisición de datos y la integración se realizaron con el programa Agilent Chemstation. Los cannabinoides CBD y THC fueron identificados comparando tiempos de retención y espectros UV de sus estándares analíticos. Los picos de las formas CBDA y THCA fueron asignados con sus espectros UV y al relacionar la disminución de las áreas de dichos picos con respecto al aumento en la concentración de las formas neutras al aumentar el tiempo de tratamiento (resultado no mostrado).

Se empleó el método del estándar externo para la determinación cuantitativa. Para ello se prepararon curvas de calibración, empleando metanol como diluyente, en un rango de 0,001 a

0,3 mg/ml de CBD y THC puros de calidad certificada. Todas las muestras de aceites de cannabis fueron diluidas entre 20 y 600 veces en isopropanol, dependiendo de la concentración de los cannabinoides y posteriormente filtradas con filtros de jeringa con membrana de nylon (25 mm de diámetro; 0,2 μm de poro) antes de inyectarlas en el equipo.

3. Resultados

Para seleccionar un método eficiente para la descarboxilación de cannabinoides de importancia farmacológica e industrial, se compararon distintos tratamientos térmicos. En la Figura 1 se observa que las técnicas a Baño María (1h y 2h a 100°C) y autoclave (20 min a 120°C) tuvieron muy baja eficiencia de descarboxilación; mientras que, con las técnicas de baño de glicerina y mufla (20 min a 145°C), se obtuvieron buenos porcentajes de descarboxilación de CBDA (82% y 94%, respectivamente) y una descarboxilación completa para el THCA con ambos tratamientos. Sin embargo, la inercia térmica del horno tipo mufla resultó muchas veces en la degradación de los metabolitos por lo que los ensayos de incubaciones a diferentes tiempos, para estudiar la cinética del proceso de descarboxilación, se realizaron usando el baño de glicerina. En estas condiciones, el THCA presentó mayor velocidad de descarboxilación con respecto al CBDA. A los

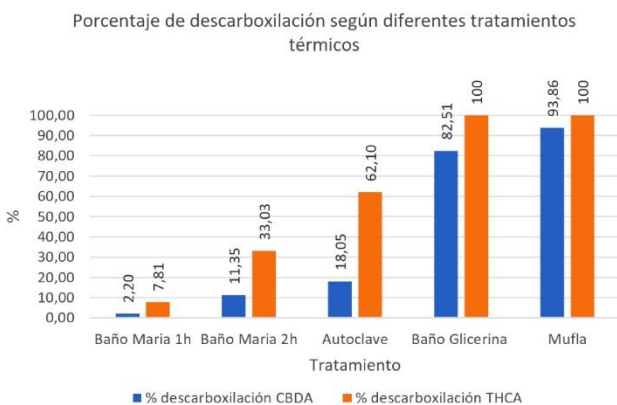


Figura 1. Eficiencia del proceso de descarboxilación de CBDA y THCA con diferentes tratamientos térmicos. Los valores corresponden a los porcentajes de CBD y THC respecto de los iniciales (0 min de incubación) y representan el promedio de 3 determinaciones independientes. Tiempos de incubación: 1 y 2 hs en baño María, 20 min en autoclave y 20 min en baño de glicerina y mufla.

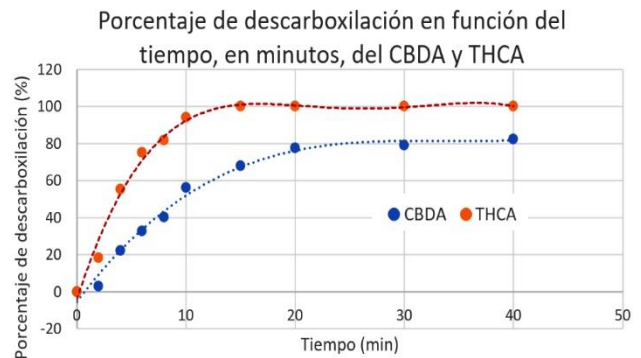


Figura 2. Cinética del proceso de descarboxilación de CBDA y THCA en baño de glicerina. Los valores corresponden a porcentajes de CBD y THC respecto del valor inicial (0 min de incubación) obtenidos a diferentes tiempos de incubación y representan el promedio de 3 determinaciones independientes.

8 minutos se alcanzó una descarboxilación del 80% para el THCA y un 40% para el CBDA. La tasa de conversión para los dos compuestos se comportó de forma lineal durante los primeros 10 y 20 minutos, respectivamente, iniciando a un aparente agotamiento del proceso transcurridos esos plazos (Figura 2).

La figura 3 muestra el cromatograma obtenido por HPLC-DAD de una muestra de aceite de cannabis, antes y después del tratamiento térmico por incubación en baño de glicerina. Se observa la desaparición de los picos correspondientes a las formas ácidas CBDA y THCA y el aumento del área de los picos correspondientes a las formas neutras CBD y THC (notar que la escala del cromatograma superior llega a una intensidad máxima de 800, mientras que la escala del inferior llega a 1000). Los resultados también indican que la muestra fue obtenida de una variedad de cannabis rica en THCA/THC. Es decir que sintetiza mayor cantidad de THCA que CBDA. Por otro lado, como se menciona más arriba, las plantas tienen baja eficiencia de descarboxilación, pero en el cromatograma se observan altas proporciones de las formas neutras CBD y THC. Esto se relaciona al método de secado, de extracción, exposición a la luz, demoras en la cosecha (envejecimiento de la planta), entre otros factores. Los análisis de control de calidad de los aceites u otros extractos de cannabis permiten visualizar estas modificaciones postcosecha, que afectan a la calidad del extracto y a sus propiedades farmacológicas. Los cromatogramas no muestran

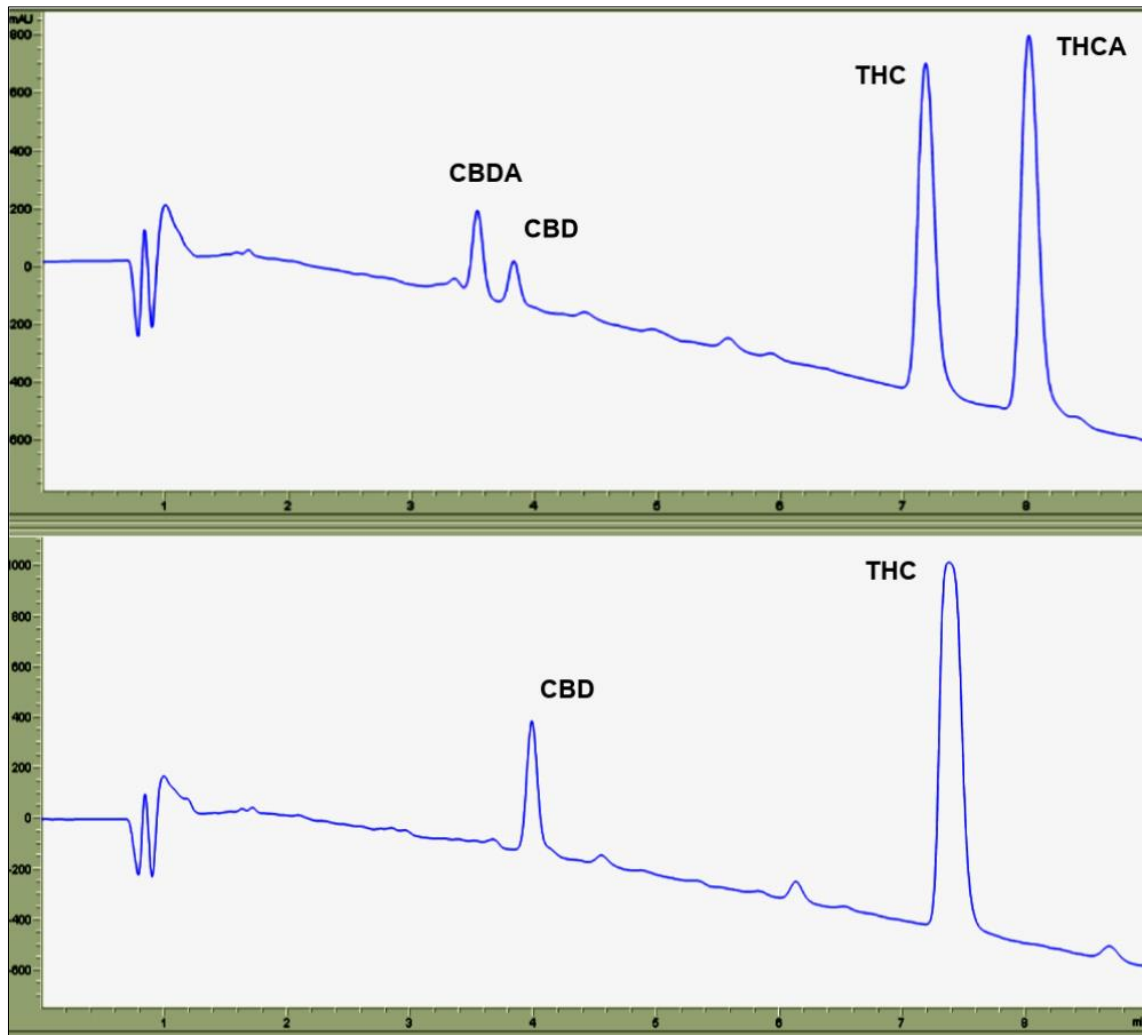


Figura 3. Cromatogramas representativos de los resultados obtenidos por HPLC-DAD de una muestra de aceite de cannabis sin tratamiento (superior) y luego de 20 min de incubación en baño de glicerina a 145°C (inferior). La imagen muestra la intensidad de la señal producida por los compuestos que eluyen de la columna en función del tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra en la columna.

otros cannabinoides del aceite porque están en mucha menor proporción que CBD y THC (p.ej. CBN y CBG/CBGA).

4. Conclusiones

Analizando los diferentes tratamientos térmicos utilizados para la descarboxilación de los cannabinoides CBDA y THCA, se observó que el método de la mufla fue el más eficiente con respecto a los porcentajes obtenidos de CBD y THC. Sin embargo, es un método inestable y de baja reproducibilidad, debido a la inercia térmica; por otro lado, los métodos de baño María y autoclave mostraron ser más reproducibles, aunque ineficaces con respecto a la descarboxilación esperable. El método de baño de glicerina, permitió alcanzar un adecuado porcentaje de descarboxilación, con una alta tasa de conversión en los primeros 20 minutos para

ambos cannabinoides, además de ser un método práctico, de bajo costo y estable. Concluimos que el tratamiento térmico en baño de glicerina a 145°C durante 20 minutos, sería un procedimiento adecuado para la descarboxilación de CBDA y THCA en muestras de aceite de cannabis o para obtener mayores cantidades de la droga activa antes de elaborar una formulación comercial.

Aquí cabe mencionar que cuando se trata de aceites u otros extractos complejos, por la gran cantidad de compuestos presentes en los mismos, el calentamiento a 145°C durante 20 minutos podría alterar otros principios activos o propiedades farmacológicas, incluso algunas no estudiadas. En este sentido, el cannabis y sus extractos tienen gran concentración de terpenos que son compuestos farmacológicamente activos (Datta et al., 2021) y muy volátiles. El

tratamiento térmico reduce el contenido de terpenos (resultados no publicados del Laboratorio de Cromatografía del PROBIEN). Las metodologías mostradas en este trabajo también son usadas en nuestro Laboratorio para el control de calidad de productos a base de CBD y/o THC en industrias farmacéuticas y cosméticas. Es decir, para comprobar que contienen el principio activo (formas descarboxiladas o neutras) referido en el producto y determinar su concentración.

AGRADECIMIENTOS

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

5. Referencias

Bajda, L., Amaro, M.M., Bongiovanni, G., 2023. Métodos cromatográficos optimizados para la identificación y cuantificación de terpenos en aceite de *Cannabis sativa* de uso medicinal. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba 80(2): 99-105. Enlace: <https://doi.org/10.31053/1853.0605.v80.n2.39593>

CND, 2020. Comisión de Estupefacientes de las Naciones Unidas. <https://www.unodc.org/documents/commissions/CND/>

[CND Sessions/CND 63Reconvened/Press statement CND 2 December.pdf](#)

Das, P.C., Vista, A.R., Tabil, L.G., Baik, O.D., 2022. Postharvest Operations of Cannabis and Their Effect on Cannabinoid Content: A Review. Bioengineering 9(8), 364. Enlace: <https://doi.org/10.3390/bioengineering9080364>

Datta, S., Ramamurthy, P.C., Anand, U., et al., 2021. Wonder or evil?: Multifaceted health hazards and health benefits of *Cannabis sativa* and its phytochemicals. Saudi J Biol Sci. 28(12), 7290-7313. Enlace: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.036>

dos Santos, N.A. and Romao, W., 2023. Cannabis - A state of the art about the millenary plant: Part I. Forensic Chemistry 32, 100470. Enlace: <https://doi.org/10.1016/j.forc.2023.100470>.

Fonseca, C. Ettcheto, M., Bicker, J., Fernandes, M.J., Falcão, A., Camins, A., Fortuna, A., 2023. Under the umbrella of depression and Alzheimer's disease physiopathology: Can cannabinoids be a dual-pleiotropic therapy? Ageing Research Reviews, 90, 101998. Enlace: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101998>.

Mukherjee, P.K., Efferth, T., Das, B., Kar, A., Ghosh, S., Singha, S., Debnath, P., Sharma, N., Kumar Bhardwaj, P., Haldar, P.K., 2022. Role of medicinal plants in inhibiting SARS-CoV-2 and in the management of post-COVID-19 complications. Phytomedicine 98, 153930. Enlace: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.153930>.

Seo, C., Jeong, M., Lee, S., Kim, E.J., Rho, S., Cho, M., Lee, Y.S., Hong, J., 2022. Thermal decarboxylation of acidic cannabinoids in Cannabis species: identification of transformed cannabinoids by UHPLC-Q/TOF-MS. Journal of Analytical Science and Technology 13, 42. Enlace: <https://doi.org/10.1186/s40543-022-00351-4>