



Perfil de cannabinoides y actividad antioxidante de *Cannabis sativa*

Bruno Musetti

Tutores:

Dra. Leonor Thomson y Dr. Javier Varela

Montevideo, Diciembre 2016

Resumen

El Cannabis es una planta con múltiples aplicaciones, tanto industriales como medicinales. Sus usos como droga de ritual y con fines terapéuticos datan de hace más de 4.000 años en el continente asiático. Se conocen 109 fitocannabinoides además de terpenos, flavonoides, esteroides entre otros grupos de metabolitos presentes en el cannabis. Actualmente sus usos medicinales han despertado gran interés debido a los continuos descubrimientos de las implicancias que el sistema endocannabinoide presenta en varios procesos fisiológicos. En el sistema cardiovascular existen evidencias sobre la utilidad terapéutica de los cannabinoides en la aterosclerosis y en la protección al daño generado por isquemia-reperfusión. En este trabajo se estudió el perfil de cannabinoides presentes en extractos de inflorescencias femeninas de cuatro fenotipos de *Cannabis sativa* mediante ^1H -RMN en distintas etapas de maduración y su capacidad para inhibir la lipoperoxidación de la proteína de baja densidad (LDL), proceso fuertemente ligado al desarrollo de la aterosclerosis. Se evidenció una acumulación de metabolitos, entre ellos cannabinoides, en los tricomas glandulares durante la etapa final del desarrollo de las flores femeninas. El principal cannabinoide encontrado en los extractos analizados fue el ácido carboxílico Δ^9 -THC (THC-A) y en una proporción mucho menor su producto de descarboxilación, con propiedades psicoactivas, el Δ^9 -THC. Se realizaron análisis espectrofotométricos de los extractos, obteniendo dos máximos de absorción bien definidos a 298 y 257 nm, coincidentes con lo reportado para el THC-A puro, aunque no se obtuvo una correlación directa entre los coeficientes de absorción para esas longitudes de onda y las cuantificaciones por ^1H -RMN, indicando que en el análisis del espectro UV-Vis se están observando además otros compuestos. Por otra parte los extractos analizados presentaron una importante inhibición de la oxidación de LDL, prolongando la fase de latencia (>2 veces) e interrumpiendo las cadenas de propagación de la lipoperoxidación (>30%). Los valores de protección encontrados en la oxidación de LDL no se corresponden de forma lineal con los niveles de THC-A cuantificados por ^1H -RMN, indicando la acción sinérgica de otros compuestos presentes en el cannabis. La identificación de estos compuestos y su acción en conjunto con los cannabinoides sobre procesos de interés biomédico será motivo de investigación futura.

Índice

1. Introducción	4
1.1 Plantas medicinales.....	4
1.2 <i>Cannabis sativa</i>	4
1.3 Cannabinoides.....	7
1.4 Terpenos del cannabis.....	9
1.5 Sistema endocannabinode	10
1.6 Efectos farmacológicos.....	11
1.7 Oxidación de lipoproteínas	12
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo general.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. Materiales y métodos	16
3.1 Extractos de <i>Cannabis sativa</i>	16
3.2 Cuantificación por Resonancia Magnética Nuclear de protón (¹ H-RMN).....	16
3.3 Análisis espectrofotométricos.....	16
3.4 Determinación de la capacidad antioxidante.....	16
3.5 Estadística.....	18
4. Resultados y discusión	19
4.1 Extracciones	19
4.2 Cuantificación por ¹ H-RMN	21
4.3 Análisis espectrofotométrico	23
4.4 Oxidación de LDL	25
5. Conclusiones.....	29
6. Perspectivas	30
7. Referencias.....	31

1. Introducción

1.1 Plantas medicinales

Existe evidencia de que hace más de 60.000 años los Neandertales (*Homo neanderthalensis*) ya hacían uso de plantas por sus propiedades medicinales; en registros arqueológicos de un cementerio en el norte de Iraq (Cueva Shandir) se encontraron grandes cantidades de polen de 7 especies de plantas usadas en la actualidad como tratar dolencias¹. Incluso hay evidencia de chimpancés (*Pan troglodyte* L)² y otros animales que utilizan plantas con fines antiparasitarios y otros no nutricionales³.

Todas las civilizaciones antiguas hacían uso de plantas como medicinas, algunos de los muchos registros escritos son por ejemplo del año 5.000 (AC) los sumerios de la antigua Mesopotamia tenían tablas hechas de barro con listas de cientos de plantas medicinales. Asimismo fue descubierto de la civilización egipcia el “Papiro Ebers” que data del año 1.600 AC, uno de los tratados médicos más antiguos, con información de más de 850 sustancias, la mayoría provenientes del reino vegetal. Escrituras sanscritas de la India que datan del 1.900 AC como el “Rig Veda” y el “Atharva” documentan los conocimientos de utilidades medicinales de plantas⁴. El Cannabis (*Cannabis sativa* L) es mencionado en estos documentos, además existen evidencias de su uso en Asia central como droga de ritual⁵ y registros de su uso en la medicina china datan del año 2.700 AC⁶.

El 50% de los fármacos aprobadas en los últimos 30 años provienen directa o indirectamente de metabolitos secundario de plantas⁷, estos compuestos orgánicos no están directamente relacionados con el crecimiento, desarrollo o reproducción de las mismas, pero si están implicados en mecanismos de defensa y comunicación con otros organismos (otras plantas, patógenos, depredadores, etc). Estos compuestos se clasifican en alcaloides, polifenoles, glicósidos y terpenos. Muchos de estos presentan marcadas acciones fisiológicas lo que les confiere propiedades potencialmente beneficiosas y aptas para la investigación, desarrollo y empleo biotecnológico tanto en animales como en vegetales.

1.2 Cannabis sativa

Esta planta es originaria de Asia central y del subcontinente indio. Pertenece al género *Cannabis* de la familia Cannabaceae y se han descrito 3 subespecies: *Cannabis sativa sativa* (Linneo 1753), *Cannabis sativa indica* (Lamark 1785) y *Cannabis sativa rudelaris* (Janischewski 1942). Es una hierba alta de rápido crecimiento erguido, angiosperma, principalmente dioica y anual, con hojas palmaticompuestas. El primer par de hojas es de un solo foliolo dentado, aumentando gradualmente hasta un máximo de 13 (frecuentemente de 7 a 9), con estipulas y largos peciolos. Cuando comienza el periodo de floración hacia los extremos de los tallos se van reduciendo hasta llegar a 1 foliolo nuevamente. Los pares de hojas inferiores se encuentran opuestas y en las partes más maduras alternas. Plantas con floración de día corto (con excepción de la subespecie *rudelaris* que son de día neutro), flores anemófilas en inflorescencias cimosas axilares y terminales; las flores estaminadas son paniculiformes, las flores pistiladas presentan un cáliz tubular corto y 2 pistilos alargados. Los cálices y las brácteas de las inflorescencias femeninas presentan abundantes pelos secretores con cabezas de 8-16



Figura 1. Ilustración de una planta masculina (A) y una planta femenina (B). Se muestra una flor masculina (1) y sus estambres (2), una flor femenina (3), el ovario (4) y el fruto (5) (Hermann Adolf Köhler 1887).

células denominados tricomas glandulares (Figura 2) donde se sintetizan y acumulan metabolitos secundarios, principalmente fitocannabinoides y terpenos^{8; 9; 10}.

Su fruto es un aquenio que se produce en grandes cantidades, de 0,5-2,5 toneladas por hectárea de cultivo, cosechándose a los 110-150 días de sembrado. Cuenta con excelentes valores nutricionales con un contenido de 30-35% de proteínas de calidad comparable a las provistas por los productos animales y un contenido de 35% de ácidos grasos, siendo el 90% insaturados^{11; 12}, esto le da las cualidades necesarias para ser un excelente alimento tanto para humanos como para la crianza de ganado.

El cáñamo, nombre que reciben los fenotipos de *Cannabis sativa* no psicoactivos, fue una de las primeras plantas utilizadas para la obtención de fibras hace más de 10.000 años¹³. Debido al rápido crecimiento de los tallos y la resistencia de las fibras obtenidas se cultivaba en Inglaterra en el siglo XVI¹⁴. Estas fibras pueden utilizarse para la fabricación de materiales

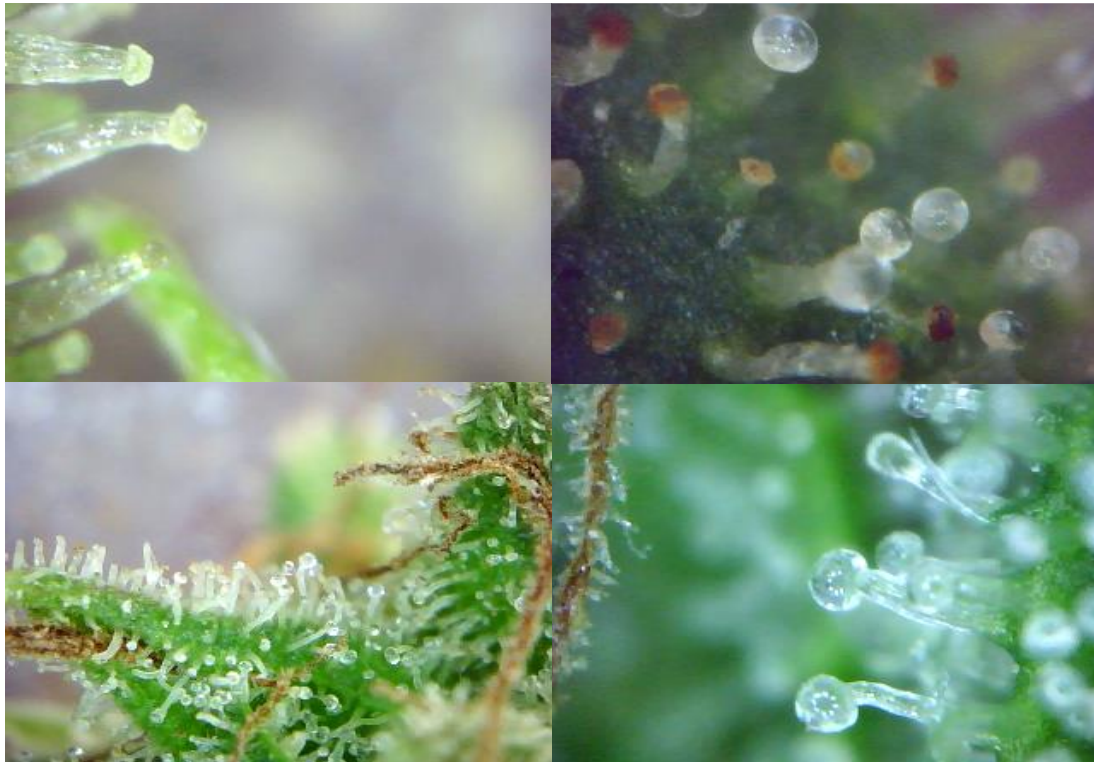


Figura 2: Tricomas glandulares de inflorescencias femeninas de *Cannabis sativa*.

textiles de uso industrial o para vestimenta. El cáñamo puede ser refinado en varios productos de interés comercial como papel, plásticos biodegradables, pinturas, aislantes térmicos, materiales de construcción edilicia y automotriz. También ha demostrado ser muy eficiente para la generación de biocombustibles¹⁵.

El uso con fines recreativos, religiosos o terapéuticos ha sido el más relevante¹⁶. En India era usada para el tratamiento de neuralgias, convulsiones infantiles, calambres y para algunas cefaleas como las migrañas. Por su parte, en la medicina tradicional China preparados de esta planta eran empleados para el tratamiento de la malaria, beri-beri y estreñimiento, describiéndose también sus posibles efectos psicoactivos, denominados “visiones diabólicas”¹⁷. Recién en el siglo XIX comenzó a utilizarse en la medicina occidental. En Inglaterra y en Estados Unidos se utilizaban extractos de resina de cannabis disuelta en etanol (la denominada tintura de cannabis) para el tratamiento del tétanos, rabia, cólera, convulsiones infantiles, reumatismo o delirium tremens¹⁸. Sin embargo, en la primera mitad del siglo XX el empleo medicinal del cannabis desapareció, debido sobre todo a la variabilidad en la potencia de los extractos, a la impredecible respuesta individual que presentaba y a la aparición en terapéutica de alternativas más seguras y sin los efectos adversos psicoactivos que presenta el cannabis¹⁹.

La marihuana (nombre que reciben los fenotipos de *Cannabis sativa* psicoactivos) es una droga recreacional popular alrededor del mundo, solamente detrás del alcohol, la cafeína y el tabaco. Los efectos psicoactivos de la marihuana se sabe que poseen una naturaleza bifásica. Los efectos psicoactivos primarios incluyen un estado de relajación, y en menor grado de euforia, debido a su principal componente psicoactivo, el THC. Los efectos psicoactivos secundarios,

tales como una facilidad para el pensamiento filosófico, la introspección y la metacognición también han sido reportados, así como casos de ansiedad y paranoia²⁰. Finalmente, los efectos psicoactivos terciarios pueden incluir un aumento en el ritmo cardíaco y el hambre, causado por el 11-OH-THC, un metabolito psicoactivo del THC producido en el hígado. La cognición normal se restaura después de aproximadamente tres horas para dosis grandes por vía inhalatoria²⁰. Sin embargo, en el caso de una misma dosis recibida por vía oral genera efectos más duraderos. El cannabidiol (CBD), que no tiene que ningún efecto psicotrópico por sí mismo atenúa o reduce los niveles de ansiedad causados por THC³⁶. Según el análisis realizado por investigadores británicos, la marihuana tiene un factor de riesgo más bajo para la dependencia comparada a la nicotina y al alcohol²¹. Sin embargo, el uso diario de marihuana puede en algunos casos ser correlacionado con síntomas psicológicos de abstinencia tales como irritabilidad, cefalea e insomnio, entre otros²⁰, aunque los síntomas son típicamente suaves y nunca son peligrosos para la vida²².

La prohibición de drogas con cualidades psicotrópicas, estimulantes o estupefacientes, catalogadas por defensores de políticas prohibicionistas como nocivas para la salud humana y de potencial uso problemático y generación de dependencia no han cumplido con su objetivo de reducir el consumo, tráfico y venta de estas sustancias. Asimismo ha evitado que se pueda investigar el uso de muchas de estas con fines terapéuticos. El uso del cannabis con propiedades psicotrópicas fue determinado como ilegal en el “Convenio para la supresión del tráfico ilícito de drogas nocivas. Ginebra, 26 de Junio de 1936”²³. Sin embargo en la actualidad la posesión de pequeñas cantidades, cultivo de pocas plantas y consumo recreativo o para uso medicinal ha sido descriminalizado en países como Holanda, España, Portugal, Canadá e Israel entre otros y algunos estados de Estados Unidos como Oregon, Colorado y Washinton DC. En Uruguay, donde el consumo no era ilegal pero si la producción a partir de la ley 14.294 del 31 de octubre de 1974²⁴. A partir del 10 de diciembre de 2013 quedó aprobada la ley 19.172²⁵ que regula la producción, comercialización, tenencia y los usos recreativos y medicinales de la marihuana, así como también su uso con fines industriales. Con esta ley, Uruguay se convirtió en el primer país del mundo en regular la venta y el cultivo de marihuana en su totalidad. El decreto N° 46/015²⁶ declara que el Instituto de regulación y control del cannabis (IRCCA) promoverá la investigación científica del cannabis y sus usos medicinales.

1.3 Cannabinoides

Desde principios del siglo XX hubo numerosos intentos de aislar y elucidar estructuralmente los compuestos activos de esta planta. En 1940 mediante análisis químicos se descubrió un nuevo grupo de metabolitos secundarios terpenofenólicos, los cannabinoides²⁷. En 1964 fue presentado el aislamiento y elucidación estructural del tetrahidrocannabinol (THC)²⁸, siendo el trans-(Δ 9-tetrahidrocannabinol (Δ 9-THC,) el principal responsable de los efectos psicoactivos²⁷. Actualmente se conocen 109 fitocannabinoides^{29; 30}. Los de mayor abundancia y de conocida actividad biológica son los siguientes: cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), cannabidiol (CBD), ácido cannabidiol (CBD-A), (Δ 9-trans-tetrahidrocannabinol (Δ 9-THC), ácido tetrahidrocannabinol (THC-A), (Δ 8-trans-Tetrahidrocannabinol (Δ 8-THC), cannabinol (CBN), tetrahidrocannabivarin (THCV) (Figura 3).

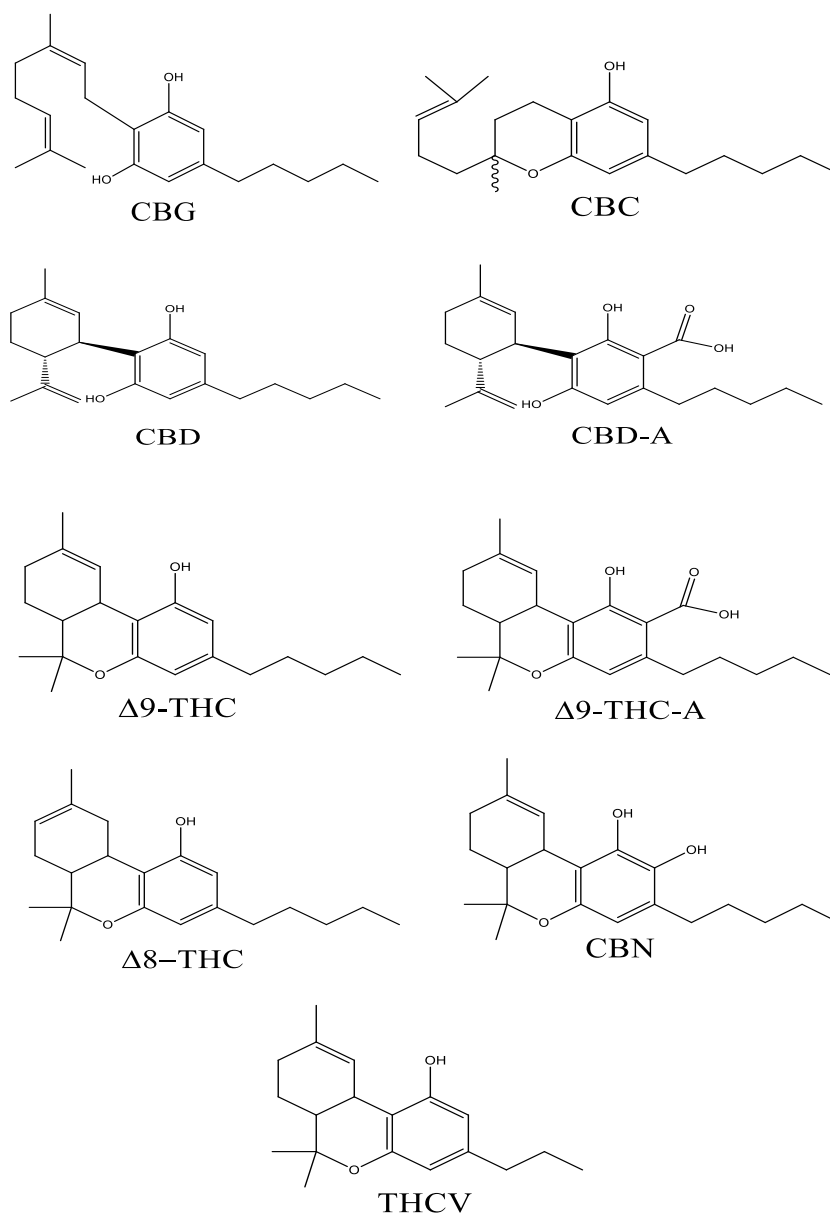


Figura 3. Cannabigerol (CBG), Cannabicromeno (CBC), Cannabidiol (CBD), ácido Cannabidiol (CBD-A), (-)-Δ9-trans-tetrahidrocannabinol (Δ9-THC), ácido Tetrahidrocannabinol (THC-A), (-)-Δ8-trans-Tetrahidrocannabinol (Δ8-THC), Cannabinol (CBN), Tetrahidrocannabivarin (THCV).

Su biosíntesis parte de un metabolito fenólico proveniente de la ruta del ácido shikímico y un metabolito isoprenoide de la ruta del ácido mevalónico (Figura 4). La primera reacción es catalizada por la enzima geranilpirofosfato:olivetolato geraniltransferasa (GOT)³¹. Luego el CBG-A formado puede ser sustrato de tres enzimas que sintetizan sus productos correspondientes: THC-A sintasa, CBD-A sintasa y CBC-A sintasa³². Los demás metabolitos se producen por pérdida espontánea del ácido carboxílico y el CBN se produce por oxidación espontánea por contacto del THC con O₂. Los fitocannabinoides dentro de los tricomas se encuentran mayoritariamente en sus formas ácidas, estos no son psicoactivos y tienen potencial como agentes terapéuticos para diversas patologías^{33, 34}

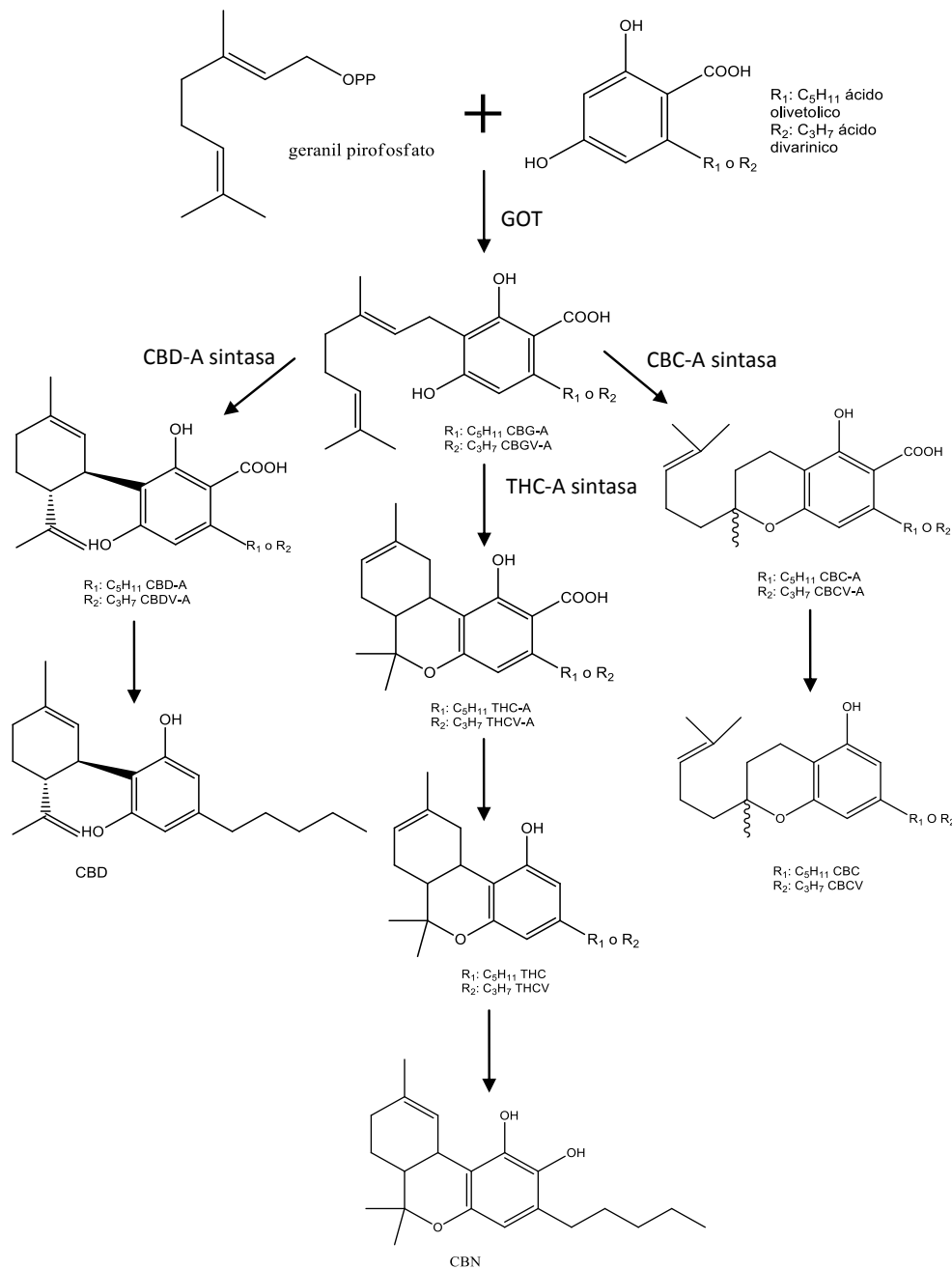


Figura 4. Ruta biosintética de los principales fitocannabinoides.

1.4 Terpenos del cannabis

Otros compuestos descritos en el cannabis incluyen terpenos, azúcares, hidrocarburos, esteroides, flavonoides, compuestos nitrogenados, fenoles no cannabinoides y aminoácidos²⁹. Los terpenos son compuestos que derivan de la síntesis de isoprenos y poseen características organolépticas particulares. Los que frecuentemente se sintetizan y acumulan en los tricomas glandulares del cannabis son: limoneno, mircenol, α -pineno, linalol, β -cariofileno, óxido de cariofileno, nerolidol y fitol (Figura 5) entre otros³⁵.

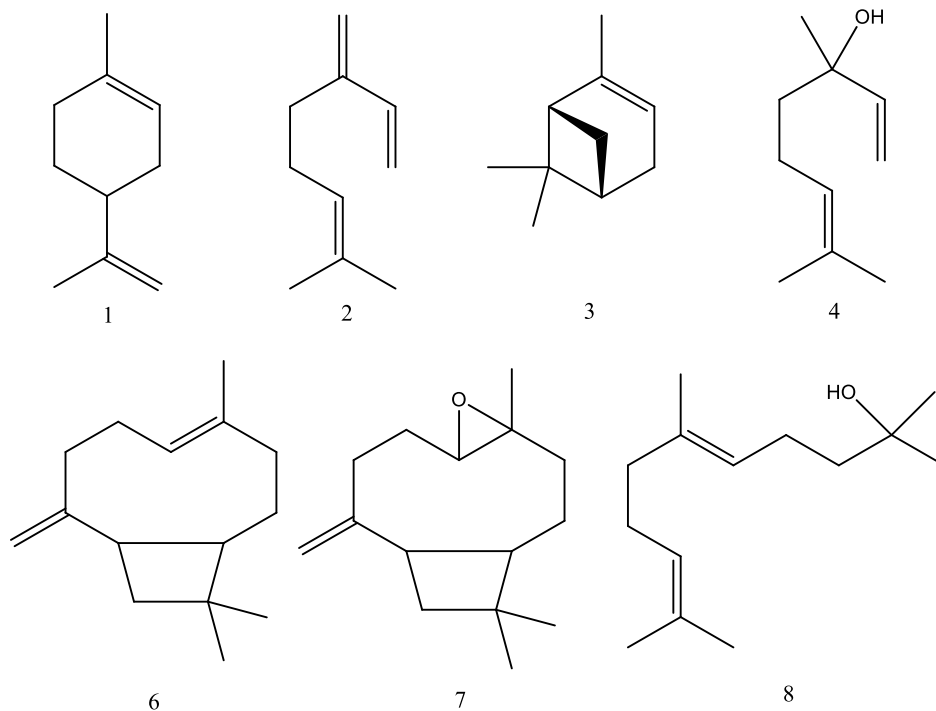


Figura 5. Estructuras químicas de limoneno (1), mircenol (2), α -pineno (3), linalol (4), β -cariofileno (5), óxido de cariofileno (6) y nerolidol (7)

Estudios recientes indican la acción sinérgica entre los fitocannabinoides³⁶ y también con los terpenos del cannabis^{37; 38; 39} mejorando las propiedades medicinales, reduciendo los efectos secundarios negativos.

1.5 Sistema endocannabinoide

El estudio del mecanismo de acción del THC (componente psicotrópico) condujo en 1995 a la identificación de un nuevo sistema de señalización celular, el sistema endocannabinoide (SE)⁴⁰. Este sistema se compone de los endocannabinoides: N-araquidonoiletanolamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) y receptores asociados a proteínas G: CB1 y CB2⁴¹. Estos además están sujetos a la acción de fitocannabinoides y ligandos sintéticos, tanto como agonistas o antagonistas⁴².

Dependiendo del tipo celular, de la intensidad con la que se produzca la interacción, del tipo de cannabinoide y del receptor sobre el que actúen (CB1 o CB2), resultará en la modulación de la actividad de la proteína quinasa C (PKC) y la proteína quinasa A (PKA), por consiguiente modulando la actividad de quinasas activadas por mitógeno (MAPK)⁴², implicadas en la activación de factores nucleares que desencadenan numerosos procesos implicados en respuestas inflamatorias, proliferación, diferenciación y muerte celular programada^{43; 44}.

El SE se encuentra ampliamente distribuido, tanto en el sistema nervioso central y periférico como en órganos y tejidos (Figura 6). Los receptores CB1 se encuentran fundamentalmente a nivel del sistema nervioso central, en regiones del cerebro que regulan las funciones motoras, cognitivas, emocionales y sensoriales. Por tanto la activación de los receptores CB1 centrales

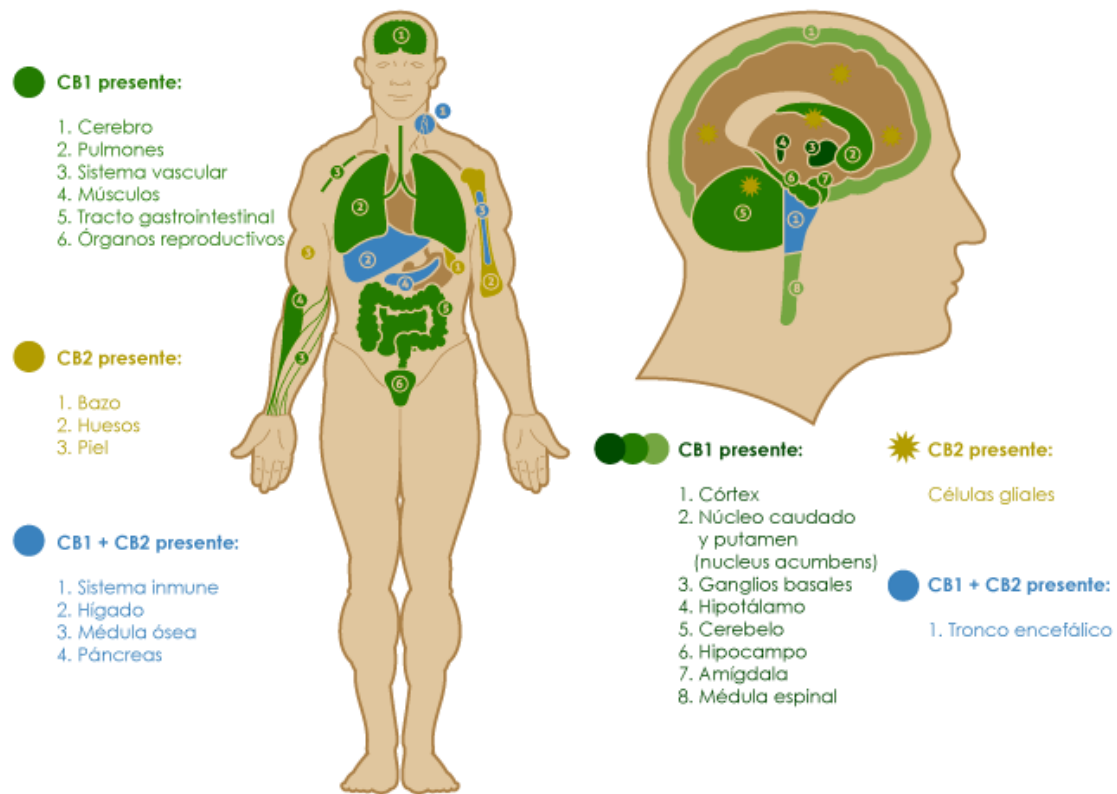


Figura 6. Distribución de los receptores CB1 y CB2 en el cuerpo humano (Kalapa Clinic S.L. Barcelona).

es responsable de la mayoría de los efectos comportamentales y psicotrópicos de los cannabinoides⁴⁵. Estos receptores también se encuentran en el tronco encefálico, el hipotálamo y la glándula pituitaria, afectando la percepción de dolor, la actividad hormonal y la termorregulación, además de la fisiología cardiovascular, gastrointestinal y respiratoria. A nivel periférico los receptores CB1 regulan el balance energético y la reproducción⁴⁶. La regulación del apetito por endocannabinoides ha recibido especial atención, habiéndose desarrollado una serie de terapias, en particular el uso de rimonabat y otros agonistas de CB1, que demostraron un efecto beneficioso para aumentar la sensación de saciedad y promover la pérdida de peso, pero debieron ser retirados del mercado por sus efectos colaterales psiquiátricos^{47; 48}.

En el sistema inmune se ha visto la presencia de receptores CB2, donde participan en la diferenciación de linfocitos T y en la regulación del patrón de citoquinas expresadas⁴⁹. La activación de los receptores CB2 inhibe la activación de linfocitos T_H a linfocitos T CD4⁺⁵⁰, estas células expresan gran densidad de ligando de CD40 (CD40L). La unión de CD40L con el receptor CD40 en células del sistema inmune, sistema nervioso, musculo liso y fibroblastos produce la expresión de moléculas de adhesión, citoquinas proinflamatorias y enzimas que degradan la matriz extracelular⁵¹. Esta función de modulación posiciona al SE como un buen blanco de investigación, en particular para el desarrollo de tratamientos de diversas patologías relacionadas con la inflamación y el daño oxidativo del sistema nervioso central^{52; 53}.

1.6 Efectos farmacológicos

Se ha demostrado que el THC inhibe a la enzima acetilcolinesterasa, evitando la agregación de péptidos β -amiloide, marcador clave de la enfermedad de Alzheimer⁵⁴. El rol de los cannabinoides como inhibidores pre-sinápticos vía señalización retrógrada⁵⁵ le confiere capacidad neuroprotectora, evitando la toxicidad producida por la sobre-excitación neuronal (exitotoxicidad)⁵⁶, neuroinflamación y estrés oxidativo asociado⁵⁷, procesos directamente relacionados con el daño y envejecimiento cerebral⁵⁸. Además se ha visto que sus cualidades neuroprotectoras pueden ser efectivas en tratamientos para la epilepsia; por ejemplo el CBD⁵⁹ y el CBDV⁶⁰ han funcionado con éxito en la terapia anticonvulsivante.

Por otra parte, estudios recientes evidencian el potencial del uso de cannabinoides como agentes antineoplásicos por sus cualidades antiproliferativas y antiangiogénicas *in vitro* e *in vivo* en diferentes modelos de cáncer, actuando a nivel de las rutas de señalización celular implicadas en estos procesos⁶¹. También se conoce la acción como analgésico del CBDA (CI_{50} = 2 μ M) inhibiendo selectivamente la ciclooxigenasa 2 (COX2)⁶². De igual manera el uso de los cannabinoides tiene potencial para la regulación del apetito⁶³ y como paliativo del dolor neuropático crónico y las náuseas de pacientes en quimioterapia⁶⁴, enfermos de VIH⁶⁵ y esclerosis múltiple⁶⁶.

Los receptores de cannabinoides también se han encontrado a nivel del sistema cardiovascular y existen evidencias significativas sobre la utilidad terapéutica de los cannabinoides en patologías cardiovasculares. Bajas dosis orales (menores que las dosis psicoactivas) de THC inhibieron la progresión de aterosclerosis en ratones Apo-E^{-/-}⁶⁷. Por su parte los receptores CB1 y CB2 ha sido implicado en el pre-acondicionamiento a la isquemia inducido por LPS^{68;69} y en el efecto beneficioso de la nitroglicerina y por tanto del NO en la cardioprotección retardada⁷⁰. Las células linfoides aisladas de los ratones tratados con THC demostraron además una capacidad menor de proliferación y secreción de INF- γ . La chemotaxis macrófaga, un paso crucial para el desarrollo de aterosclerosis, también fue inhibida *in vitro* por THC⁶⁷. Además se ha demostrado el efecto protector del cannabis en el daño generado por isquemia-reperfusión, la cual involucra un importante componente de estrés oxidativo⁷¹.

1.7 Oxidación de lipoproteínas

En los procesos inflamatorios los macrófagos y neutrófilos reclutados producen radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁷², estas moléculas son muy reactivas y pueden generar otras especies también fuertemente oxidantes como el radical oxidrilo ($\cdot OH$), radical óxido nítrico y ($\cdot NO$) y peroxinitrito ($ONOO^-$). Estas moléculas a pesar de estar implicadas en procesos de señalización y defensa frente a patógenos⁷³, si la inflamación no se resuelve y persiste, pueden comenzar a reaccionar con componentes endógenos, provocando disfunción endotelial y daño en los tejidos⁷⁴. Son ya conocidas las asociaciones entre la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el desarrollo de la aterogénesis⁷⁵. Las moléculas de LDL retenidas en la túnica íntima (capa subendotelial) sufren modificaciones oxidativas mediadas por las especies reactivas descritas anteriormente y son reconocidas por los receptores scavenger de los macrófagos⁷⁶, estos comienzan a internalizar la LDL oxidada y dan lugar a la formación de células espumosas^{77; 78}, implicadas en la formación de placas de ateroma⁷⁹ (figura 7).

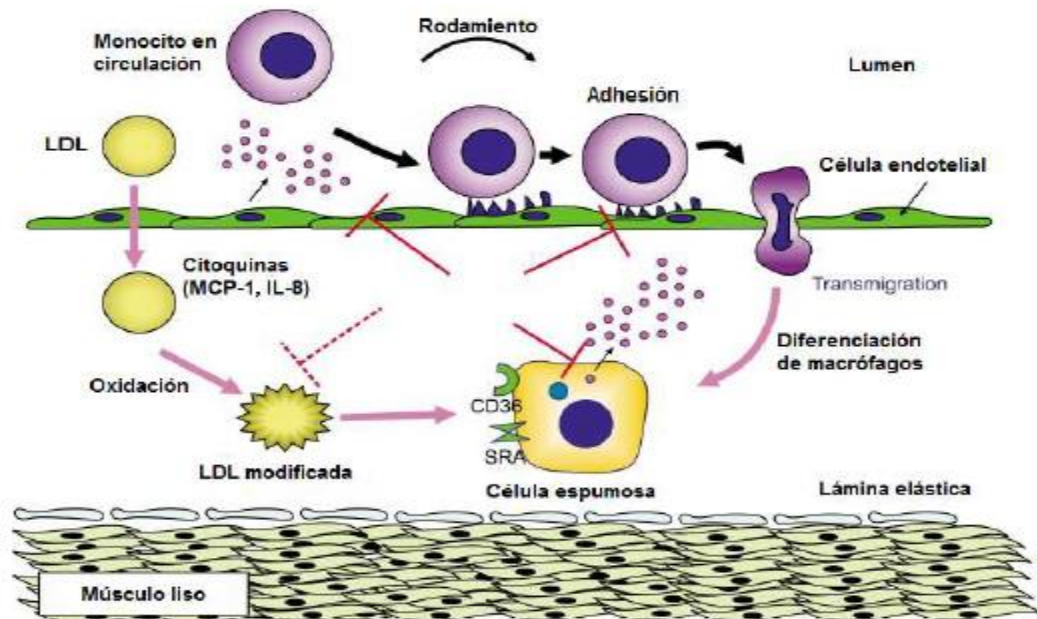


Figura 7. Formación de células espumosas mediante la internalización de LDL oxidada. Proceso relacionado con la formación de placas de aterosclerosis. Adaptado a partir de ⁶⁹.

El interior de la LDL es un centro lipofílico compuesto principalmente por moléculas de ésteres de colesterol y moléculas de triglicéridos, rodeado por una monocapa formada principalmente por fosfatidilcolina y colesterol libre. Alrededor del 50% de los ácidos grasos presentes en la LDL son poliinsaturados, principalmente ácido linoleico (18:2, ω 6). En la capa externa de la partícula se encuentra la apolipoproteína B-100. Además posee diversos antioxidantes como componentes estructurales, entre ellos se destacan el α -tocoferol y el β -caroteno⁸⁰.

La lipoperoxidación es el proceso por el cual el oxígeno molecular es incorporado a las moléculas de lípidos insaturados (LH) para formar hidroperóxidos lipídicos (LOOH)⁸¹. El proceso de ataque oxidativo que sufren los lípidos insaturados se debe a reacciones en cadena mediadas por radicales libres, iniciadas por la abstracción de un átomo de hidrógeno del metileno bis-alílico del lípido insaturado por un radical libre reactivo y seguido por una secuencia de reacciones de propagación. La lipoperoxidación procede a través de tres fases: iniciación, propagación y terminación⁸² (Figura 8). La fase de iniciación, el primer paso crítico, está promovida por algún tipo de iniciador que sobrepasa la energía de disociación del enlace alílico causando la abstracción del hidrógeno y la formación del radical alquilo ($L\cdot$). Una vez que se formó el radical alquilo, grupos adyacentes le proveen estabilización por resonancia, formándose dobles enlaces conjugados (dienos conjugados) que presentan un máximo de absorbancia característico a 234 nm. El oxígeno molecular reaccionará rápidamente con el radical alquilo para formar el radical peróxilo ($LOO\cdot$), este radical es un importante intermediario en la cadena de propagación porque una vez formado, continuará la cadena de reacciones oxidativas abstrayendo un átomo de hidrógeno de otros grupos alquilo cercanos. Este ciclo de reacciones propagadoras se repite a través de la abstracción de hidrógenos y formación del $LOO\cdot$, siempre que se encuentren disponibles suficientes moléculas de O_2 y sustratos lipídicos insaturados. Al evaluar la lipoperoxidación, dependiendo de la técnica, se observará lo que llamamos "fase de latencia" que va a estar dada por la fase de iniciación, la

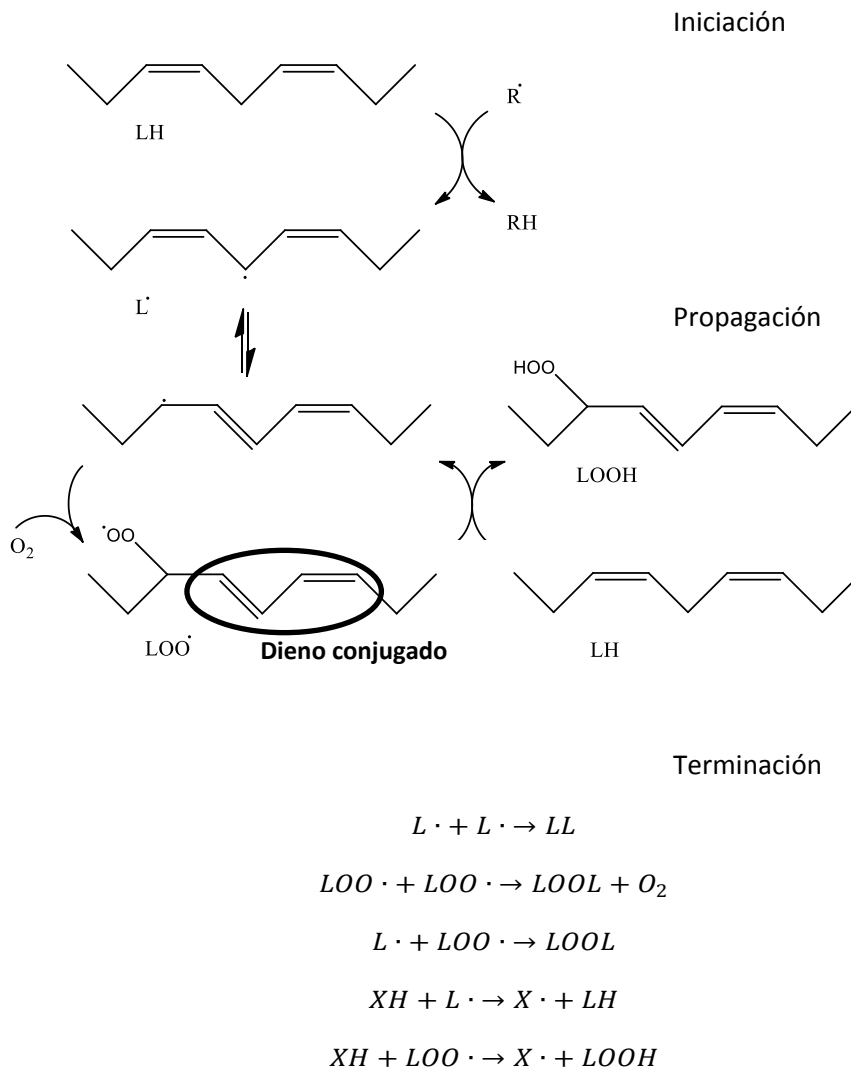


Figura 8. Mecanismo de lipoperoxidación de un ácido graso insaturado. Se muestran las tres etapas: iniciación, propagación y terminación. $R \cdot$: radical iniciador, LH : lípido, $L \cdot$: radical alquilo, $LOOH$: hidropéroxido lipídico, $LOO \cdot$: radical peroxilo, LL : dos moléculas lipídicas unidas covalentemente, $LOOL$: peróxido lipídico, XH : compuesto antioxidante. Modificado a partir de ⁸².

cual está determinada por las características de reactividad de los lípidos involucrados y en el caso de las lipoproteínas plasmáticas de la presencia, concentración y reactividad de los antioxidantes presentes, entre los que se incluyen carotenoides y vitamina E principalmente⁸⁰. La duración del ciclo de reacciones de radicales peroxilo es gobernada por varias reacciones competidoras de terminación, estas incluyen la reacción bimolecular de dos radicales alquilo o de dos radicales peroxilo para formar productos no radicalares reconocidos por los receptores *scavenger* de macrófagos como fue descrito anteriormente. También existe la posibilidad de que algún compuesto antioxidante, ya sea endógeno o no, finalice la cadena de lipoperoxidación. Por este motivo es que en este trabajo se pretendió estudiar el perfil de cannabinoides de cuatro variedades de *Cannabis sativa* y su capacidad de prevenir la oxidación de LDL.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Estudiar el perfil de cannabinoides en extractos de *Cannabis sativa* mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón ^1H -RMN y evaluar la capacidad de los mismos de prevenir la oxidación de LDL mediada por Cu^{2+} .

2.2 Objetivos específicos

1. Preparación de extractos mediante maceración dinámica con cloroformo.
2. Cuantificación de los principales cannabinoides presentes mediante ^1H -RMN de los extractos obtenidos.
3. Estudio de las características espectrofotométricas de dichos extractos.
4. Evaluación *in vitro* de la capacidad de los mismos de prevenir la oxidación de LDL mediada por Cu^{2+} .

3. Materiales y métodos

3.1 Extractos de *Cannabis sativa*

3.1.1 Obtención de las muestras

Se colectaron muestras frescas de las inflorescencias femeninas en distintos momentos del final del periodo de floración de cuatro fenotipos estables de *Cannabis sativa*: White strawberry skunk (SB), Exodus cheese (EC), Magma (Mag) y Money maker (MM) del banco de semillas Green House Seeds (Amsterdam). Las muestras fueron donaciones del Club Cannábico Guidaí Dioí. Se realizaron tres colectas de muestras frescas, entre la primer colecta y la segunda hubo 5 días de diferencia, entre la segunda y la tercera (cosecha final) 10 días. También se obtuvo una cuarta muestra de las partes florales secas obtenidas 30 días después de la cosecha.

3.1.2 Preparación de los extractos

En matraces Erlenmeyer de 200 mL y por duplicado se realizaron maceraciones dinámicas de 20 minutos en cloroformo ($CHCl_3$) de aproximadamente 1 g de muestra con el fin de extraer el contenido de los tricomas glandulares presentes. Se filtró y luego fueron llevados a sequedad mediante la utilización de un evaporador rotatorio.

3.2 Cuantificación por Resonancia Magnética Nuclear de protón (1H -RMN)

En tubos de vidrio se disolvieron aproximadamente 20 mg de los extractos secos en 600 μ L de cloroformo deuterado ($CDCl_3$) y se adicionaron 20 μ L de tetrametilsilano (TMS; 0,25 M concentración final) como estándar interno. Se adquirieron los espectros en un equipo Bruker DPX 400, se aplicaron 64 scans que requieren 10 minutos y 26 segundos de tiempo de adquisición con los siguientes parámetros: 0.16 Hz/punto, ancho de pulso (PW) = 30° (11,3 ms), y tiempo de relajación (RD) = 1,5 s^{8;88}.

3.3 Análisis espectrofotométricos

Para trabajar las muestras se solubilizaron en dimetilsulfóxido (DMSO). Se realizaron espectros UV/Vis (200 a 600 nm) empleando concentraciones crecientes de los extractos de *Cannabis sativa* (en el rango de 0,1-2 mg/mL), diluidos en DMSO:amortiguador fosfato (100 mM, pH 7,4) 1:20 (v:v), contra un blanco que contenía DMSO y buffer en la misma relación.

3.4 Determinación de la capacidad antioxidante

Para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos se procedió a analizar cómo éstos afectan la latencia o fase de iniciación y la velocidad de formación de dienos conjugados en la etapa de propagación de la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados presentes en la LDL.

3.4.1 Purificación de LDL por ultracentrifugación

Se partió de plasma humano fresco, se agregó 0,28 g de KBr por mL de plasma para llevar la solución a una densidad de 1,3 g/L. Se colocaron en los tubos de ultracentrifugación hasta aproximadamente un 40% de su volumen y se adicionó, lentamente por las paredes del tubo

para no romper el gradiente de densidad, hasta completar el tubo una solución de NaCl 0,15 M. Se centrifugó a 300.000 g durante una hora y media a 4°C, luego se colectó la banda de color naranja, a la que se determinó la concentración proteica mediante medida de absorbancia a 280 nm, empleando para el cálculo de concentración un coeficiente de extinción de $1 \text{ (mg/mL.cm)}^{-1}$.

3.4.2 Evaluación de lipoperoxidación mediante medida de formación de dienos conjugados

Se desencadenó la lipoperoxidación a 37°C en solución buffer fosfato (100 mM, pH 7,4) en la fracción de plasma humano enriquecida en LDL (0.01 g/L) mediante la adición de CuSO_4 (0.2mM), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes del extractos de *Cannabis sativa* (0,01-5 $\mu\text{g/mL}$) solubilizados en DMSO. Para todas las reacciones se utilizó exactamente el mismo volumen de DMSO (0,2% volumen final). En estas condiciones no se observó una interferencia significativa con la lectura de absorbancia, como ocurría si se utilizaba una mayor proporción de DMSO. Empleando un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, CA) multicubeta termostaticado a 37°C se procedió a medir la absorbancia a 234 nm debida a la formación de dienos conjugados, contra un blanco que contenía buffer y la misma proporción de DMSO. Además se realizó un control de autooxidación de LDL que prescindía de extracto e iniciador, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Esquema de trabajo para la medida de dienos conjugados

Cuba	Buffer	DMSO	Extracto	LDL	CuSO_4
Reacción	+	-	+	+	+
Blanco	+	+	-	-	-
Control sin extracto	+	+	-	+	+
Control sin iniciador	+	+	-	+	-

Los datos obtenidos se ajustaron a una función sigmoidea mediante la siguiente ecuación:

$$y = \frac{A_1 + (A_2 - A_1)}{(1 + 10^{((\log x_0 - x)^{xP}))}}$$

Donde A_1 y A_2 representan los valores mínimo y máximos a los que tiende la absorbancia respectivamente, mientras que x_0 y P representan $t_{1/2}$ y la pendiente, respectivamente.

Estos parámetros fueron utilizados para calcular la duración de la latencia, considerando que la fase de iniciación termina cuando la absorbancia aumenta a un 10% del total de la absorbancia máxima registrada. La capacidad para interrumpir las reacciones en cadena de la fase de propagación se calculó a partir de la pendiente de esta fase mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Protección} = 100 - \frac{P_e}{P_a} \times 100$$

Donde P_e y P_a representan la pendiente en presencia y ausencia de extracto respectivamente.

3.5 Estadística

Los gráficos se realizaron utilizando el programa OriginPro 8 SR0 (OriginLab Corporation, MA).

Se realizaron ajustes lineales con los valores de absorbancia máxima para obtener los coeficientes de absorción de las muestras.

Para el procesamiento y comparación de los espectros de H-RMN se utilizó el paquete de programas MestreC Nova (Mestrelab Research S.L. La Coruña).

Para determinar la independencia entre parámetros se empleó ANOVA, seguido por Bonferroni post test.

4. Resultados y discusión

4.1 Extracciones

Como era de esperarse, se observó un aumento en los rendimientos de extracción acompañando la maduración de las muestras, denotando una acumulación de metabolitos en el periodo final de la maduración de la flor (Tabla 2), como ya ha sido reportado⁸. Asimismo se evidencia este aumento de metabolitos en los tricomas glandulares debido a cambios en la coloración que presentan estos; los cuales comienzan siendo mayoritariamente transparentes, pasando a un color blanco más denso, y finalizando en una tonalidad ámbar (Figura 9).

Se puede apreciar un aumento importante en el rendimiento para las extracciones realizadas sobre muestras secas (SB4, EC4, Mag4 y MM4), lo que era de esperarse ya que en el secado el material vegetal pierde cerca el 80% del agua presente (Tabla 2).

Tabla 2: Rendimiento de las extracciones.

Extracto	Rendimiento (%)*
SB1	11
SB2	13
SB3	16
SB4	26
EC1	8
EC2	13
EC3	15
EC4	26
Mag1	10
Mag2	16
Mag3	21
Mag4	31
MM1	16
MM2	20
MM3	22
MM4	24

*El rendimiento de las extracciones se expresó como el porcentaje de la masa obtenida respecto a la masa de partida, en las extracciones realizadas por duplicado de las muestras en los distintos momentos de maduración.

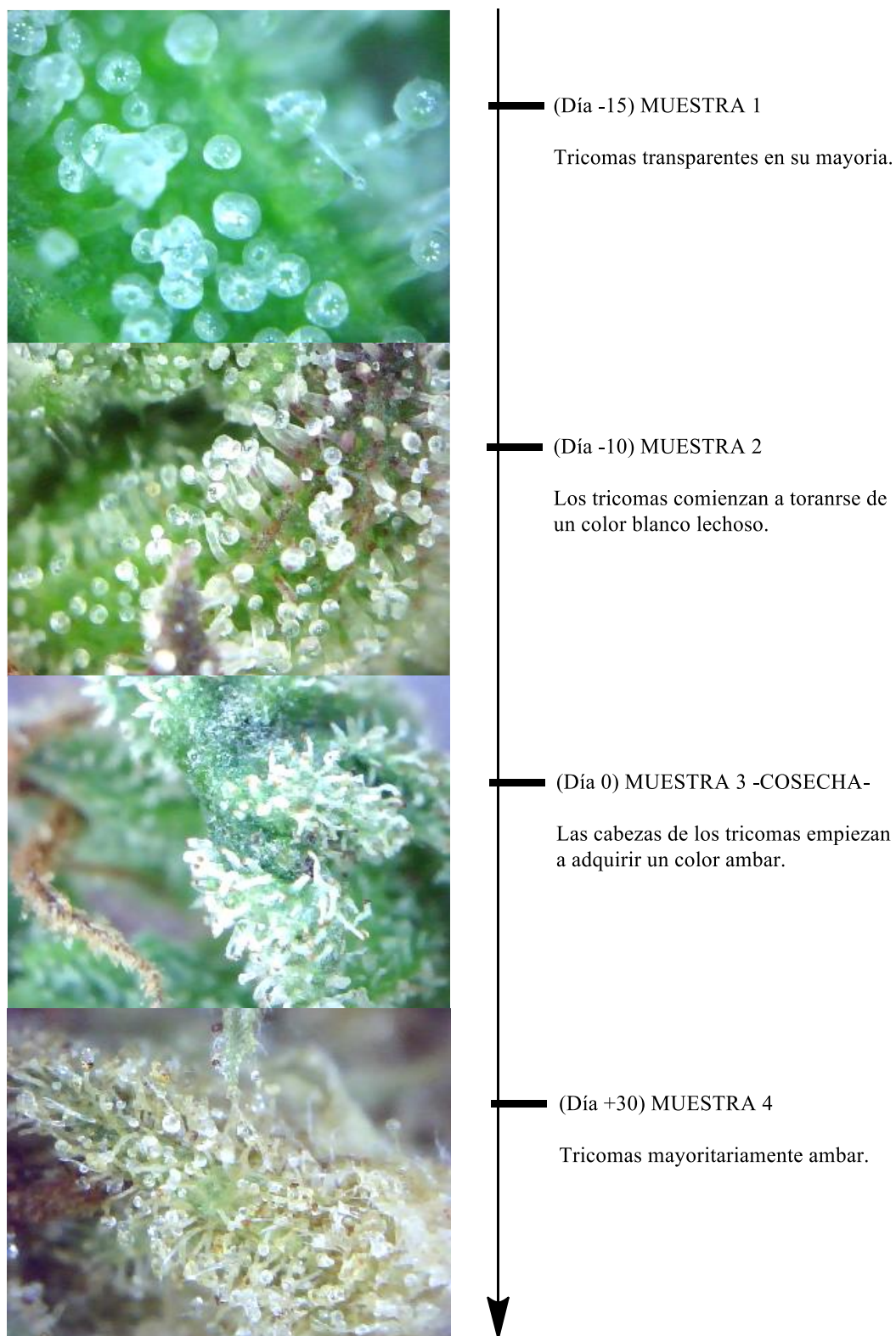
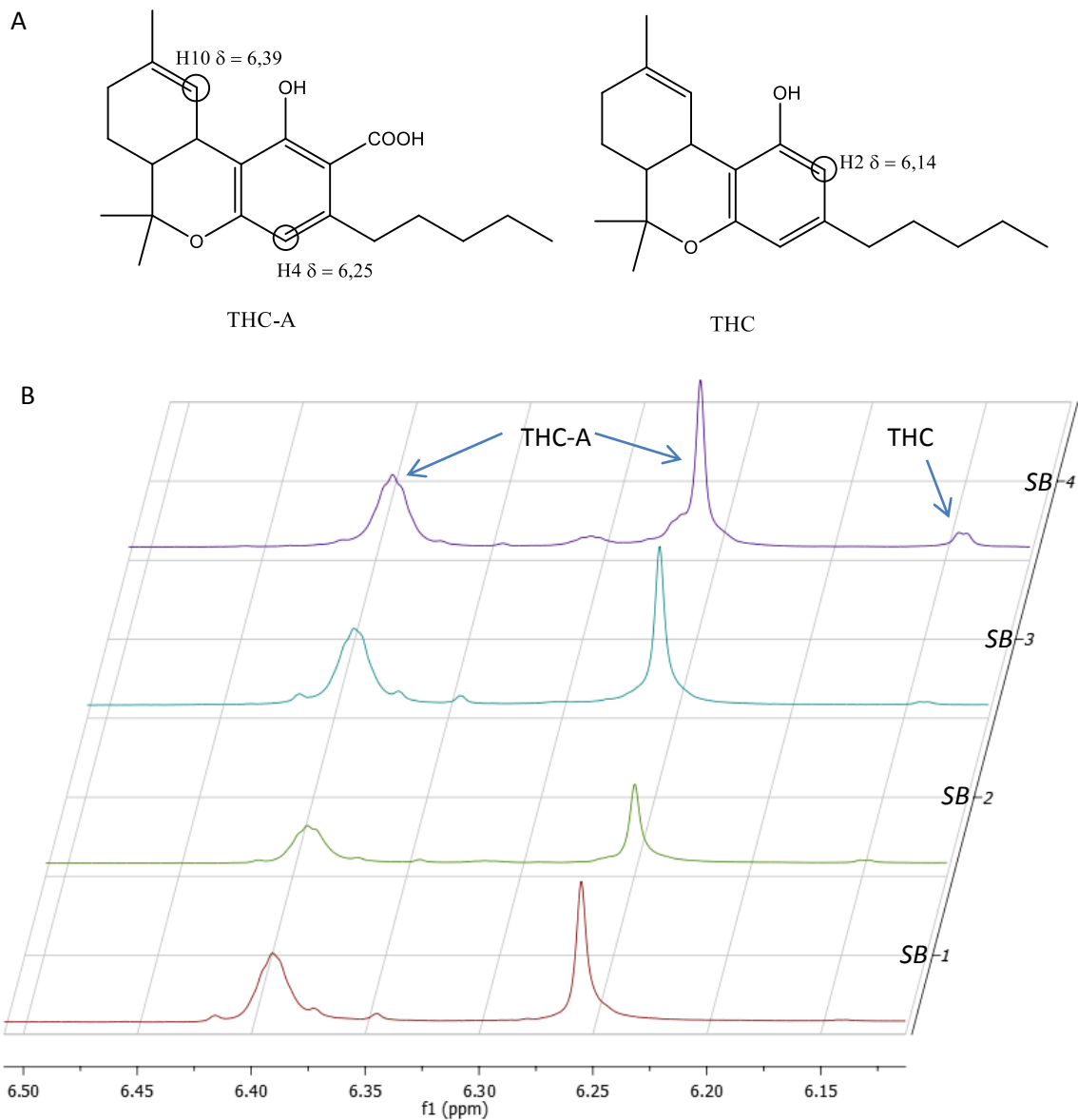


Figura 9: Maduración de los tricomas glandulares con el paso del tiempo. Capturas realizadas con microscopio digital.

4.2 Cuantificación por ^1H -RMN

Utilizando las señales en los espectros de ^1H -RMN específicas para los fitocannabinoides que en cloroformo deuterado aparecen entre 5,5-6,8 ppm^{8; 83; 88} se realizó la cuantificación de los mismos. Se integró el área bajo los picos con un desplazamiento químico de 6,25 y 6,39 ppm para el THC-A y 6,14 ppm para el THC (Figura 10 A), utilizando como estándar interno TMS (tetrametilsilano) a una concentración conocida. No se registraron señales significativas que permitieran la cuantificación de otros fitocannabinoides como ser el cannabinoil (CBN, H-4 $\delta=6,44$ ppm), cannabidiol (CBD, H-2 $\delta=6,18$ ppm), el ácido carboxílico cannabidiol (CBD-A, H-10 $\delta=5,57$ ppm) o el ácido cannabicromeno (CBC-A, H-8 $\delta=6,74$ ppm) en los extractos de los fenotipos



analizados.

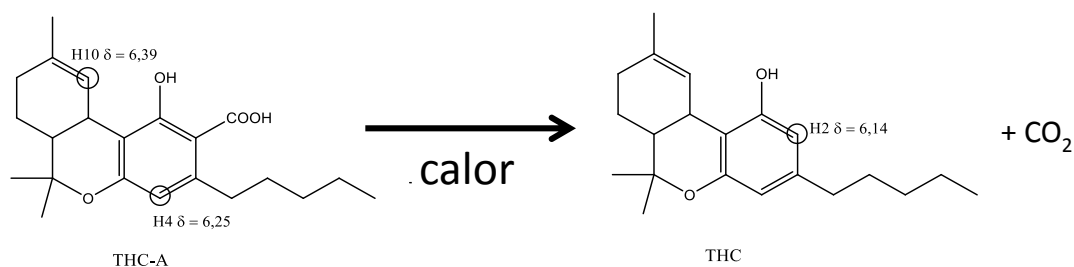


Figura 11. Reacción de descarboxilación de THC-A

Como ya ha sido reportado⁸⁴, en los extractos frescos el cannabinoide predominante es el ácido carboxílico THC (THC-A) y en una proporción muy baja su producto de descarboxilación, el THC. Las relaciones se mantienen entre las distintas variedades analizadas. Dado que el THC se genera por la pérdida espontánea del grupo carboxilo del THC-A en forma de CO₂ (Figura 11), es coherente ver una acumulación significativa de este metabolito en los extractos de las muestras secas.

Además se observa un incremento en la cantidad de cannabinoides de los extractos a medida que la maduración de las muestras avanza, concordante con los valores de rendimientos obtenidos en el punto anterior. Es coincidente también con lo que reporta un grupo de investigadores, ellos encuentran un incremento significativo en la acumulación de cannabinoides en las dos últimas semanas antes de la cosecha, asociado a el aumento en la

Tabla 3. Contenido de cannabinoides en los extractos.

Extracto	THC-A (%)*	THC (%)*
SB1	13,2 ± 0,3	0,1
SB2	13,6 ± 1,1	0,4 ± 0,1
SB3	16,2 ± 0,5	0,3 ± 0,03
SB4	15,3 ± 0,3	1,1 ± 0,08
EC1	8,3 ± 0,1	0,1
EC2	8,0 ± 0,3	0,2 ± 0,02
EC3	13,6 ± 0,2	0,2
EC4	13,9 ± 0,4	0,9 ± 0,03
Mag1	11,4 ± 0,2	0,1
Mag2	5,8 ± 0,3	0,1 ± 0,001
Mag3	-	-
Mag4	15,4 ± 0,6	1,1 ± 0,08
MM1	9,3 ± 0,03	0,2
MM2	3,6 ± 0,5	0,2 ± 0,06
MM3	11,8 ± 0,3	0,4
MM4	15,2 ± 0,8	1,2 ± 0,2

*Los valores de THC-A y THC de las diferentes plantas (SB, EC, Mag y MM) en las diferentes etapas de maduración (1-4) se expresan en porcentaje de la masa calculada a partir de la integración de los picos en los espectros de ¹H-RMN de los metabolitos corregida por la masa del extracto analizado.

expresión de los genes que codifican para la síntesis de las enzimas ácido olivetólico ciclasa (OAC) y olivetol sintasa (OLS), necesarias para la síntesis del precursor fenólico en la síntesis de los cannabinoides⁸.

Los valores de los extractos Mag2 y MM2 no siguen las tendencias esperadas, esto puede explicarse por no haber tomado esas muestras de los mismos cúmulos florales que las demás muestras para las extracciones. Respecto a la muestra Mag3, no fue posible la realización del espectro debido a un incidente en la manipulación.

4.3 Análisis espectrofotométrico

Como se muestra en la Figura 12, se obtuvieron espectros de absorción UV-Vis de los extractos que mostraron dos máximos de absorción bien definidos, uno a 298 y el otro a 257 nm, coincidente con los resultados publicados empleando THC-A puro⁸³, lo que confirma los resultados de los perfiles de cannabinoides obtenidos por ¹H-RMN. Realizando ajustes lineales se obtuvieron los valores de los coeficientes que relacionan la absorbancia con la concentración del extracto para esas longitudes de onda (Tabla 4).

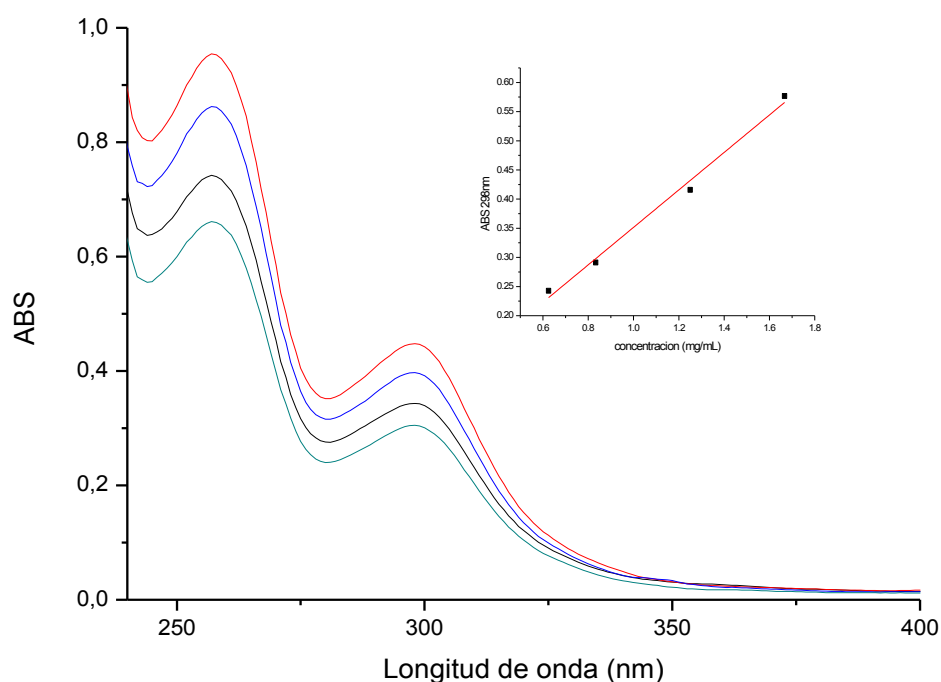


Figura 12. Características espectrales UV-Vis de los extractos de *cannabis sativa*. A modo de ejemplo se muestra el espectro de absorción UV-Vis del extracto SB3 entre 240 y 400 nm (los espectros se continuaron hasta los 600 nm mostrando un perfil plano cercano a cero). Las concentraciones utilizadas fueron: 0,625; 0,833; 1,25; 1,667 mg/mL. En el inserto se muestra el ajuste lineal ($R^2 = 0,987$) realizado para el máximo de absorbancia a 298nm.

Tabla 4: Coeficientes de absorción a 298 y 257 nm de los extractos.

Extracto	298 nm			257 nm		
	coeficiente de absorción (mg/mL) ⁻¹ cm ⁻¹	Ordenada en el origen y(x=0)	R ²	coeficiente de absorción (mg/mL) ⁻¹ cm ⁻¹	Ordenada en el origen y(x=0)	R ²
SB 1	0,36	0,006	0,999	0,82	0,028	0,999
SB 2	0,32	-0,02	0,994	0,71	-0,02	0,994
SB 3	0,32	0,03	0,987	0,73	0,06	0,99
SB 4	0,43	0,011	0,999	0,96	0,036	0,999
EC 1	0,32	0,06	0,999	0,68	0,19	0,998
EC 2	0,33	0,05	0,991	0,74	0,09	0,993
EC 3	0,43	0,06	0,998	1,054	0,067	0,999
EC 4	0,39	0,02	0,994	0,88	0,06	0,994
Mag 1	0,389	0,01	0,998	0,84	0,05	0,998
Mag 2	0,25	0,02	0,994	0,522	0,066	0,999
Mag 3	0,45	-0,01	0,989	0,73	-0,01	0,981
Mag 4	0,241	-0,03	0,972	0,53	-0,06	0,969
MM 1	0,47	0,05	0,979	1,08	0,02	0,985
MM 2	0,15	-0,03	0,948	0,3	-0,03	0,954
MM 3	0,47	0,02	0,976	1,01	0,1	0,977
MM 4	0,49	0,01	0,97	1	0,04	0,978

Los coeficientes de correlación obtenidos (R²) fueron relativamente altos (>0,97) señalando una relación lineal entre la absorbancia y la concentración para todos los extractos analizados, con excepción de MM2 que mostró una relación más pobre (0,95), coincidente con los resultados de RMN que fueron discordantes con el resto de las muestras, por lo que su efecto en las siguientes aproximaciones se descartó. Por su parte, las pendientes fueron similares, con una mediana de 0,39 (rango 0,24-0,49) (mg/mL)⁻¹cm⁻¹ a 298 nm y 0,82 (rango 0,52-1,08) (mg/mL)⁻¹cm⁻¹ a 257 nm, demostrando una consistencia apreciable en la composición de los diferentes extractos. A pesar de no contar aún con los compuestos puros ni con un valor de coeficiente de correlación fiable de la literatura, y debido a que el valor de la ordenada en el origen fue muy cercano a cero nos hizo sospechar que la presencia en los extractos de otros compuestos diferentes de THC-A debería ser muy escasa. Los carotenoides entre los que se incluyen la luteína, el β-caroteno y el licopeno muestran máximos de absorbancia entre 400 y 550 nm, con coeficientes de extinción en el rango de 200-300 (mg/mL)⁻¹cm⁻¹ (dependiendo del tipo específico y del solvente)⁸⁵, por lo que aun a baja concentración deberían ser espectrofotométricamente evidenciables. Tampoco habrían evidencias espectrales sobre la presencia de flavononas como quercetina y rutina (λ_{max} ~ 250 y 370 nm) o ácidos fenólicos como el cafeico y el clorogénico (λ_{max} ~ 325 nm), con coeficientes de extinción en el rango de 10-35 mM⁻¹ cm⁻¹ o 18-62 (mg/mL)⁻¹cm⁻¹⁸⁶.

Para analizar la relación entre los coeficientes de absorción determinados espectrofotométricamente y la concentración de cannabinoides determinada por ¹H-RMN se realizó el gráfico de correlación (Figura 13), el cual no mostró una correlación directa entre los

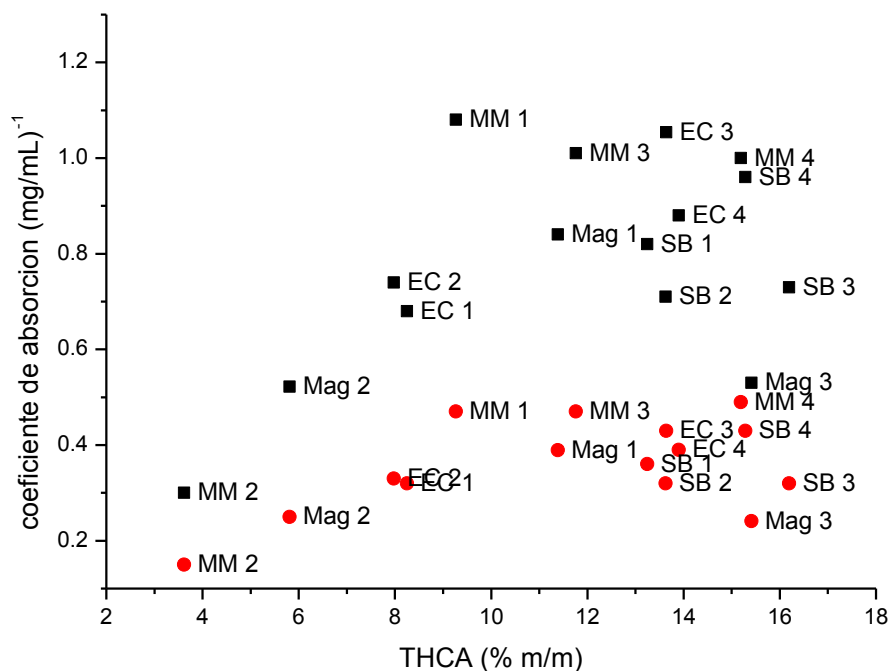


Figura 13. Correlación entre los niveles de THC-A (porcentaje masa/masa de THC-A en el extracto) y los coeficientes de absorción a 298nm (negro) y 257nm (rojo) de los extractos analizados.

datos, indicando que si bien el análisis del espectro UV-Vis mostró una marcada prevalencia de los cannabinoides, en esa técnica se están observando además otros compuestos. La investigación de estos compuestos va a ser motivo de estudio en la etapa de maestría, así como la posibilidad de analizar la potencial descarboxilación del THC-A a su forma psicoactiva, ya que estas especies presentan espectros de absorción muy distintos, con desaparición de la banda a 298 nm⁸³, siendo de relevancia esta información para aplicaciones medicinales.

4.4 Oxidación de LDL

A continuación pasamos a analizar la capacidad de los extractos de Cannabis Sativa de prevenir la oxidación de LDL, para ello evaluamos la generación de dienos conjugados a 234 nm en presencia de la lipoproteína expuesta a CuSO₄ (0.2mM). En la Figura 14 se muestra la curva obtenida al medir las absorbancias a 234 nm registradas durante la reacción de lipoperoxidación tomada como control -sin el agregado de extracto de *Cannabis sativa*- (Figura 14 A) y utilizando concentraciones crecientes del extracto SB3 (Figura 14 B).

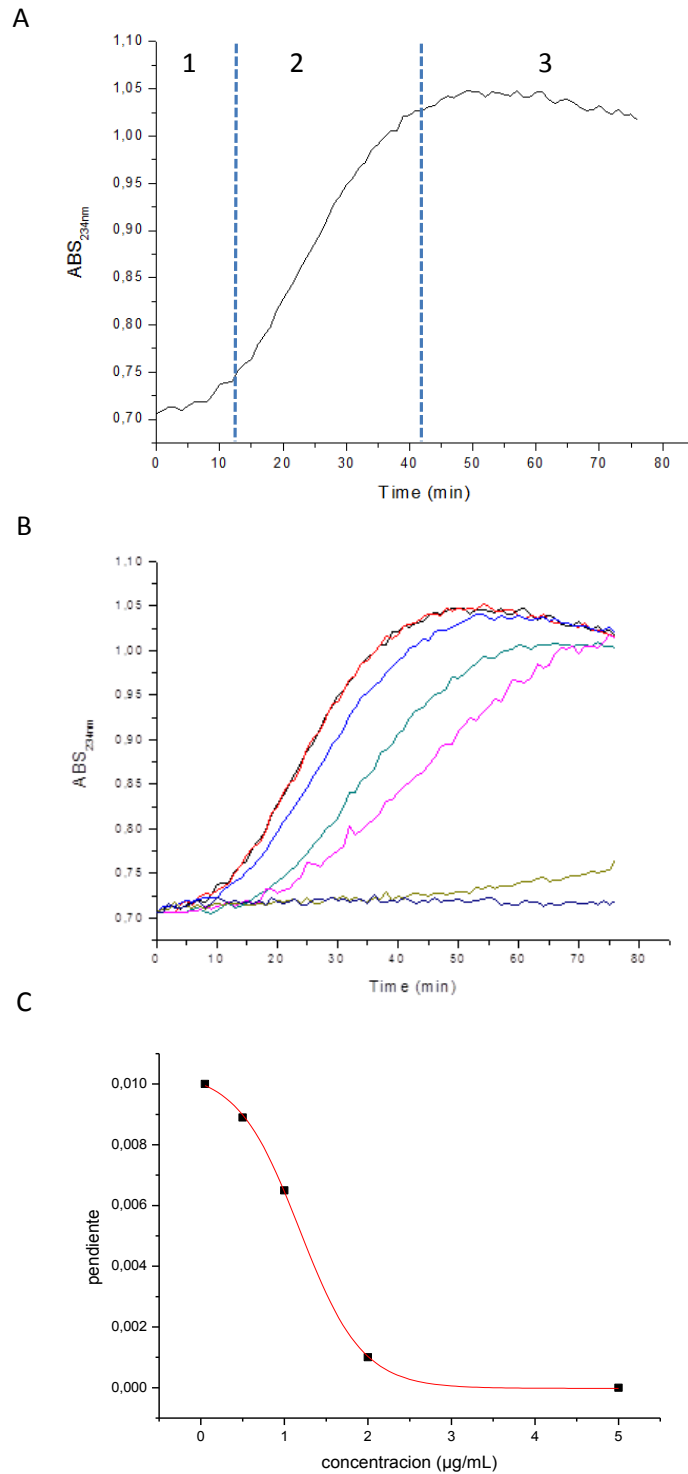


Figura 14. A. Curva obtenida al incubar LDL con Cu^{2+} . La sección (1) del gráfico se corresponde con la fase de iniciación, la (2) con la de propagación y la (3) con la fase de terminación. **B.** Generación de dienos conjugados por el sistema LDL/ Cu^{2+} en ausencia (línea negra) y en presencia de concentraciones crecientes del extracto SB3: 0,01 (línea roja); 0,05 (línea azul); 0,5 (línea celeste); 1 (línea rosada); 2,5 (línea verde oliva) y 5 (línea azul marino) $\mu\text{g/mL}$. **C.** Gráfico dosis respuesta para SB3 realizado a partir de las pendientes de la fase de propagación de la figura B.

Tomando como referencia la concentración de 1 µg/mL, que para SB3 estaba en el orden de la Cl_{50} (Figura 14 C), se procedió a analizar los extractos provenientes de las plantas SB y EC ajustando las concentraciones utilizadas para que todos los ensayos tengan la misma concentración de THC-A. No se estudió el efecto de los extractos Mag y MM debido a los resultados inconsistentes obtenidos en los análisis de los puntos anteriores. De este modo se obtuvieron importantes inhibiciones de la lipoperoxidación de LDL. En primer lugar los extractos mostraron una importante capacidad antioxidante, es decir de actuar como dadores de hidrógeno, y de este modo retardaron el inicio de la señal proveniente de la formación de dienos conjugados. En efecto, la fase de latencia aumentó entre 2,6 y 2,2 veces en presencia de los extractos de SB y EC respectivamente, provenientes de la primera recolección. Además la fase de propagación también se vio afectada por la presencia de estos mismos extractos, con una disminución muy significativa en la pendiente, del orden de 40 y 30% para SB y EC respectivamente, evidenciando su capacidad de interrumpir las cadenas de lipoperoxidación.

Por un lado, las inhibiciones de oxidación lipídica inducidas por los extractos SB parecen no presentar diferencias para los distintos estadios de maduración (Figura 15 A y B). Por otro lado,

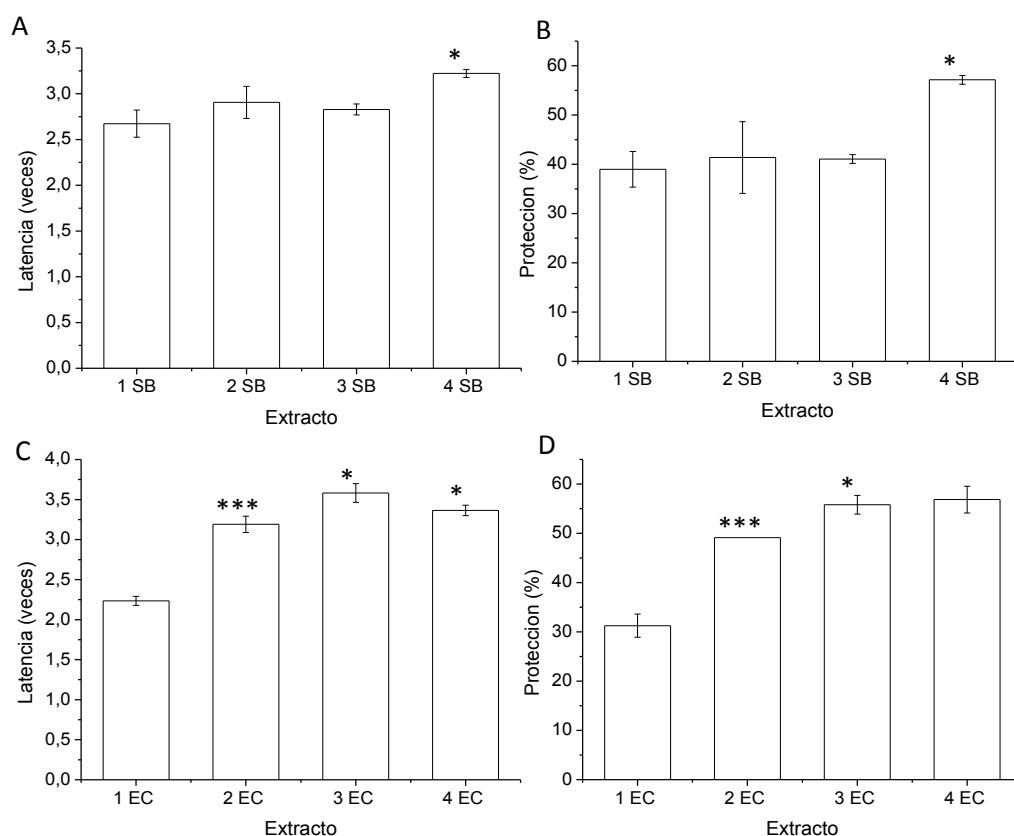


Figura 15. Inhibición de la lipoperoxidación. El efecto de los extractos SB y EC sobre la fase de latencia (A y C, respectivamente) y de propagación (B y D, respectivamente) de la lipoperoxidación. Esta última se representó como se describe en la Sección Materiales y Métodos. La latencia se expresa como veces respecto al control (***) <math><0.001</math>, * <math><0.05</math>).

los extractos EC provenientes de las colectas posteriores mostraron un aumento significativo en la latencia (Figura 15 C), así como también se observa la misma tendencia en la protección correspondiente a la fase de propagación (Figura 15 D). La maduración de esta planta parece llevar a un aumento en los componentes capaces de disminuir la oxidación lipídica.

La tendencia al aumento de la inhibición de la oxidación lipídica cuanto más maduras las muestras EC y el hecho de haber realizados ajustes para nivelar la cantidad de THC-A en los ensayos estaría indicando que el efecto de protección estaría dado no solo por el cannabinoide presente (THC-A). Esto es coherente con el hecho de que el extracto entero posee también otros compuestos presentes en el cannabis como los son los terpenos, que poseen propiedades antioxidantes⁸⁷, pudiendo estar actuando en sinergismo con el THC-A³⁰.

5. Conclusiones

- En la etapa final del desarrollo del período de floración, se produce una acumulación de metabolitos secundarios, entre ellos fitocannabinoides, en los tricomas glandulares de las inflorescencias femeninas de *Cannabis sativa*.
- En los extractos enteros de los fenotipos de *Cannabis sativa* analizados, el principal fitocannabinoides encontrado fue el Δ^9 -tetrahidrocannabinol en su forma ácida (THC-A) no psicoactiva.
- La falta de correlación entre la concentración de cannabinoides obtenidos mediante estudios de H-RMN y los resultados de espectrofotometría UV/Vis señalan la presencia de otros compuestos que absorben en el mismo rango del espectro.
- Los extractos enteros presentan la cualidad de inhibir la lipoperoxidación de LDL mediada por Cu^{2+} .

6. Perspectivas

- Empleo de otras técnicas de extracción de los compuestos bioactivos: maceración con etanol y extracción con CO₂ supercrítico.
- Profundizar en el estudio de los cambios en los perfiles químicos de los extractos mediante análisis de ¹H-RMN durante el periodo de floración, haciendo énfasis en los cannabinoides y terpenos presentes, aumentando número y diversidad de muestras de *Cannabis sativa*.
- Complementar los estudios de metabolómica mediante HPLC y espectrometría de masas.
- Continuar con los estudios de la capacidad de los extractos de prevenir la oxidación de LDL y/o su internalización mediada por receptores *scavenger* celulares.
- Evaluar la capacidad de los extractos de inhibir la activación de monocitos/macrófagos inducida por LDL oxidada.
- Estudio de la correlación entre la variabilidad del perfil químico y la actividad biológica.

7. Referencias

- 1- Solecki, R. (1975). "Shanidar IV, a Neanderthal Flower Burial in Northern Iraq". *Science*. 190 (4217): 880–881
- 2- Huffman, M.A., Page, J.E., Sukhedo, M.V.K., Gotob, S., Kalunde, M.S., Chandrasiri, T., Towers, G.H.N. (1996). Leaf –swallowing by chimpanzees: A behavioural adaptation for the control of strongyle nematode infections. *Acta. Oecol.*, **17** (4), 475-503.
- 3- Sumner, J. (2000). *The Natural History of Medicinal Plants*. Timber Press, Portland, Oregon. 145-161.
- 4- Sumner, Judith (2000). *The Natural History of Medicinal Plants*. Timber Press, Portland. 17-18.
- 5- Russo, E. B., Jiang, H. E., Li, X., Sutton A., Carboni, A., del Bianco F, Mandolino, G., Potter, D. J., Zhao Y.-X., Bera, S. Zhang Y.- B., Lü, E.-G., Ferguson, D. K., Hueber, F., Zhao, L.-C., Liu C.-J., Wang, Y.-F., Li. C.-S., 2008. Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J. Exp. Bot.* **59** (15) 4171-4182.
- 6- Mechoulam, R. Hanuš, L. (2000) A historical overview of chemical research on cannabinoids. **108**, Issues 1–2, 1–13.
- 7- Veeresham, C. (2012). Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, **3**(4), 200–201.
- 8 Happyana, N., & Kayser, O. (2016). Monitoring Metabolite Profiles of *Cannabis sativa* L . Trichomes during Flowering Period Using ¹H NMR- Based Metabolomics and Real-Time PCR. *Planta Medica*, 1–7.
- 9- Ross, R. A. and ElSohly, M. A. (1996) The volatile oil composition of fresh and air-dried buds of *Cannabis sativa* L. *J. Nat. Prod.* **59**, 49–51.
- 10- Potter, D. J. (2009). The propagation, characterisation and optimisation of *Cannabis sativa* L as a phytopharmaceutical, **255**.
- 11- Talbot, Geoff. (2015). *Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition: Properties, Processing and Applications*. Elsevier Science. **39**
- 12- Callaway, J. C. (2004-01-01). Hempseed as a nutritional resource: An overview". *Euphytica*. Kluwer Academic Publishers. **140** (1–2): 65–72.

-
- 13- Tourangeau, Wesley (2015), "Re-defining Environmental Harms: Green Criminology and the State of Canada's Hemp Industry", *Canadian Journal of Criminology & Criminal Justice*, **57** (4): 528–554,
- 14- R. H. W. Bradshaw, P. Coxon, J. R. A. Greig, A. R. (1981). New Fossil Evidence for the Past Cultivation and Processing of Hemp (*Cannabis sativa* L.) in Eastern England Author. *New Phytologist*. **89** (3). 503-510
- 15- Keller, NM (2013), The Legalization of Industrial Hemp and What it Could Mean for Indiana's Biofuel Industry. *International & Comparative Law Review*, **23**(3): 555.
- 16- Kalant, H. (2011). Medical use of cannabis: history and current status. *Pain Res Manage*, **6**(2), 80–91.
- 17-Touw, M. (1981). The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *Journal of Psychoactive Drugs*, **13**(1), 23–34.
- 18- Mikuriya, T. H. (1969). Marijuana in medicine: past, present and future. *California Medicine*, **110**(1), 34–40.
- 19- Mechoulam, R., & Parker, L. a. (2011). The Endocannabinoid System and the Brain. *Annual Review of Psychology*, **64**(1).
- 20 - https://www.erowid.org/plants/cannabis/cannabis_effects.shtml
- 21- Nutt, D; King, L; Saulsbury, W; Blakemore, C. (2007). Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *The Lancet*. **369**(9566): 1047–53.
- 22- Borgelt, LM. Franson, KL. Nussbaum, AM. Wang, GS. (2013). The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. *Pharmacotherap*. **33** (2): 195–209.
- 23-
http://www.oas.org/juridico/spanish/tratados/sp_conve_supre_trafi_ilici_drog_noci_gine.pdf
- 24-
http://www.cicad.oas.org/fortalecimiento_institucional/legislations/PDF/UY/ley_14294.pdf
- 25- http://www.correo.com.uy/otrosdocumentos/pdf/Ley_19.172.pdf
- 26- http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/decreto_46-015.pdf
- 27- Pertwee, R. G. (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *International journal of obesity*. **30**, 513-518.
- 28- Mechoulam, R., Shani, A., Edery, H., & Grunfeld, Y. (1970). Chemical basis of hashish activity. *Science*, **169**(3945), 611-612.

-
- 29- ElSohly, M. A., & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, **78**(5), 539–548.
- 30- Radwan, M. M., ElSohly, M. A., Slade, D., Ahmed, S. A., Khan, I. A., & Ross, S. A. (2009). Biologically active cannabinoids from high-potency *Cannabis sativa*. *Journal of natural products*, **72**(5), 906-911.
- 31- Fellermeier, M. Zenk, M.H. (1998). "Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol". *FEBS Letters*. **427** (2): 283–5.
- 32- Sirikantaramas, S. Taura, F. Morimoto, S. Shoyama Y. (2007) Recent advances in *Cannabis sativa* research: biosynthetic studies and its potential in biotechnology. *Curr Pharm Biotechnol*. (4):237-43.
- 33- Izzo, A. Borrelli, F. Capasso, R. Di Marzo, V. & Mechoulam, R. (2009). Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in Pharmacological Sciences*, **30**(10), 515–527.
- 34- Burstein, S. (1999). The cannabinoid acids: Nonpsychoactive derivatives with therapeutic potential. *Pharmacology and Therapeutics*, **82**(1), 87–96.
- 35- Fishedick, J. T., Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, **71**(17–18).
- 36- Russo, E. & Guy, G. (2005). A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical Hypotheses*, **66**(2), 234–246.
- 37- Russo, E. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, **163**(7), 1344–1364.
- 38- Mcpartland, J. M., & Russo, E. B. (2001). Cannabis and Cannabis Extracts: Greater Than the Sum of Their Parts? *Journal of Cannabis Ther-Apeutics*, **14**(3), 103–132.
- 39- Romano, L. L., & Hazekamp, A. (2013). Cannabis Oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine. *Cannabinoids*, **1**(1), 1–11.
- 40- Maccarrone, M. I, Bab. Bíró, T. Cabral, G. Dey, S. Di Marzo, V. Konje, J. Kunos, G. Mechoulam, M. Pacher, P. Sharkey, K. and Zimmer, A. (2015) Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends in Pharmacological Science*, **36** (5) 277.
- 41- Pertwee, R. G. (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *International journal of obesity*, **30**, 513-518.

-
- 42- Sarne, Y., Asaf, F., Fishbein, M., Gafni, M., & Keren, O. (2011). The dual neuroprotective–neurotoxic profile of cannabinoid drugs. *British Journal of Pharmacology*. **163**(7), 1391–1401.
- 43- McCudden, C. R., Hains, M. D., Kimple, R. J., Siderovski, D. P., & Willard, F. S. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**(5), 551–577.
- 44- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1813**(9), 1619–1633.
- 45- Patel KD, Davison JS, Pittman QJ, Sharkey KA. (2010). Cannabinoid CB(2) receptors in health and disease. *Curr Med Chem*. **17**(14):1393-410.
- 46- Cunha P, Romão AM, Mascarenhas-Melo F, Teixeira HM, Reis F. (2011). Endocannabinoid system in cardiovascular disorders - new pharmacotherapeutic opportunities. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. **3**(3):350-360.
- 47- Fong, T. M., Guan, X., Marsh, D. J., Shen, C., Stribling, D. S., Rosko, K. M., ... Shearman, L. P. (2007). Antiobesity Efficacy of a Novel Cannabinoid-1 Receptor in Rodents. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **321**(3), 1013–1022.
- 48- Addy, C., Wright, H., Van Laere, K., Gantz, I., Erondou, N., Musser, B. J., ... Heymsfield, S. B. (2008). The Acyclic CB1R Inverse Agonist Taranabant Mediates Weight Loss by Increasing Energy Expenditure and Decreasing Caloric Intake. *Cell Metabolism*, **7**(1), 68–78.
- 49- Tanasescu, R., & Constantinescu, C. S. (2010). Cannabinoids and the immune system: An overview. *Immunobiology*, **215**(8), 588–597.
- 50- Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M (2000). Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol*. 396: 141-149.
- 51- Schonbeck U, Libby P (2001). The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*. 58: 4-43.
- 52- Pacher, P., Bátkai, S., & Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, **58**(3), 389–462.
- 53- Hill, A. J., Williams, C. M., Whalley, B. J., & Stephens, G. J. (2012). Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, **133**(1), 79–97.
- 54- Eubanks, L. M., Rogers, C. J., Iv, A. E. B., Koob, G. F., Arthur, J., Dickerson, T. J., & Janda, K. D. (2008). A Molecular Link Between the Active Component of Marijuana and Alzheimer's Disease Pathology. *Mol Pharm*. **3**(6): 773–777.

-
- 55- Freund TF, Katona I, Piomelli D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* **83**(3):1017-66.
- 56- van der Stelt, M., Veldhuis, W. B., Bär, P. R., Veldink, G. a, Vliegenthart, J. F., & Nicolay, K. (2001). Neuroprotection by Delta9-tetrahydrocannabinol, the main active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, **21**(17), 6475–6479.
- 57- Bilkei-Gorzo, A. (2012). The endocannabinoid system in normal and pathological brain ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **367**(1607), 3326–3341.
- 58- Mechoulam D.;Shohami E., R. ;Panikashvil. (2002). Editorial: Cannabinoids and brain injury: Therapeutic implications. *TRENDS in Molecular Medicine*, **8**(2), 58–61.
- 59- Devinsky, O., Cilio, M. R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., ... Friedman, D. (2014). Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, **55**(6), 791–802.
- 60- Amada, N., Yamasaki, Y., Williams, C. M., & Whalley, B. J. (2013). Cannabidivarin (CBDV) suppresses pentylenetetrazole (PTZ)-induced increases in epilepsy-related gene expression. *PeerJ*, **1**, e214.
- 61- Chakravarti, B., Ravi, J., & Ganju, R. K. (2014). Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. *Oncotarget*, **5**(15), 5852–72.
- 62- Takeda, S., Misawa, K., Yamamoto, I., & Watanabe, K. (2008). Cannabidiolic acid as a selective cyclooxygenase-2 inhibitory component in cannabis. *Drug Metabolism and Disposition*, **36**(9), 1917–1921.
- 63- Farrimond, J. A., Mercier, M. S., Whalley, B. J., & Williams, C. M. (2011). Cannabis sativa and the endogenous cannabinoid system: therapeutic potential for appetite regulation. *Phytother Res*, **25**(2), 170–188.
- 64- Tramèr, M. R., Carroll, D., Campbell, F. A., Reynolds, D. J., Moore, R. A., & McQuay, H. J. (2001). Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, **323**(7303), 16–21.
- 65- Ellis, R. J., Toperoff, W., Vaida, F., Van Den Brande, G., Gonzales, J., Gouaux, B., ... Atkinson, J. H. (2009). Smoked Medicinal Cannabis for Neuropathic Pain in HIV: A Randomized, Crossover Clinical Trial. *Neuropsychopharmacology*, **34**(12), 672–680.
- 66- Ben Amar, M. (2006). Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, **105**(1–2), 1–25.

-
- 67- Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, Karsak M, Zimmer A, Frossard JL, Mach F. (2005). Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* **434**, 782-786
- 68- Lagneux C, Lamontagne D. (2001) Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol.* 132:793–6.
- 69 - Joyeux M, Arnaud C, GodinRibuot D, Demenge P, Lamontagne D, Ribuot C. (2002).Endocannabinoids are implicated in the infarct sizeducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res.* 55:619–25.
- 70- Wagner JA, Abesser M, HarveyWhite J, Ertl G.(2006). 2Arachidonylglycerol acting on CB1 cannabinoid receptors mediates delayed cardioprotection induced by nitric oxide in rat isolated hearts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 47:650–5.
- 71- Defer N, Wan J, Souktani R, Escoubet B, Perier M, Caramelle P, Manin S, Deveaux V, Bourin MC, Zimmer A, Lotersztajn S, Pecker F, Pavoine C. (2009).The cannabinoid receptor type 2 promotes cardiac myocyte and fibroblast survival and protects against ischemia/reperfusion-induced cardiomyopathy. *FASEB J.* **23**(7):2120-30.
- 72- Iles KE, Forman HJ. Macrophage signaling and respiratory burst. (2002). *Immunol Res.* **26** (1-3):95-105.
- 73- Brüne, B., Dehne, N., Grossmann, N., Jung, M., Namgaladze, D., Schmid, T., ... Weigert, A. (2013). Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxidants & Redox Signaling*, **19**(6), 595–637.
- 74- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, **20**(7), 1126–67.
- 75- Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, **105**(9), 1135–1143.
- 76- Canton, J., D. Neculai, and S. Grinstein. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol.* 13 (9): 621-34.
- 77- Aviram M. (1998) Macrophage foam cell formation during early atherogenesis is determined by the balance between pro-oxidants and anti-oxidants in arterial cells and blood lipoproteins. *J Atheroscler Thromb.* **5**(2):66-75.
- 78- Choi, J.H., J.Y. Yoo, S.O. Kim, S.E. Yoo, and G.T. Oh. (2012). KR-31543 reduces the production of proinflammatory molecules in human endothelial cells and monocytes and attenuates atherosclerosis in mouse model. *Exp Mol Med.* **44**(12): p. 733-9.
- 79- Hurtubise J, McLellan K, Durr K, Onasanya O, Nwabuko D, Ndisang JF. (2016) The Different Facets of Dyslipidemia and Hypertension in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* **18**(12):82.

80- Schuster, B., R. Prassl, F. Nigon, M.J. Chapman, and P. Laggner. (1995) Core lipid structure is a major determinant of the oxidative resistance of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci.* **92**(7): p. 2509-13.

81- Dillard, C.J. A.L. Tappel. (1989). Lipid peroxidation products in biological tissues. *Free Radic Biol Med.* **7**(2): p. 193-6.

82- Trostchansky, A., Trujillo, M. Castro, L. y Rubbo, H. Estudio de las modificaciones oxidativas de la lipoproteína de baja densidad (LDL): análisis de la oxidación del componente lipídico y protéico. (2007). Actividad práctica UTI-DREMR Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, UdelaR.

83- Hazekamp, A., Peltenburg, A., Verpoorte, R., & Giroud, C. (2005). Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **28** 2361–2382.

84- Verhoeckx, K. C. M., Korthout, H. A. A. J., Van Meeteren-Kreikamp, A. P., Ehlert, K. A., Wang, M., Van Der Greef, J., ... Witkamp, R. F. (2006). Unheated *Cannabis sativa* extracts and its major compound THC-acid have potential immuno-modulating properties not mediated by CB1 and CB2 receptor coupled pathways. *International Immunopharmacology*, **6** (4), 656–665.

85 - Egeland, E. Specific absorption coefficients for major algal chlorophylls, bacteriochlorophylls and carotenoids. In *Carotenoids. The Physiology of Microalgae Volume 6* of the series *Developments in Applied Phycology*. 507-563. Springer.

86- <http://photobiology.info/Solovchenko.html>

87- González, E. Gómez, MP. (2012). Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr Med Chem.* **19**(31):5319-41.

88- Hazekamp, A., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2004). Quantitative analysis of cannabinoids from *Cannabis sativa* using ¹H-NMR. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* **52**(6), 718–721.