

UNIVERSIDAD NACIONAL

Campus Omar Dengo

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE QUÍMICA

“ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPTLC) PARA LA DETERMINACIÓN DE CANNABIDIOL (CBD) EN MATRICES COMERCIALES PRESENTES EN EL MERCADO NACIONAL”

Proyecto de graduación en la modalidad de pasantía sometido a consideración del Tribunal

Examinador de la Escuela de Química, como requisito parcial para optar por el grado de

Licenciatura en Química Industrial

Bach. Keilor Morales Alfaro

Tutora:

Ph.D. Ana Francis Carballo Arce

Asesores:

Ph.D. José Ángel Rodríguez Corrales

Ph.D. Gabriel Zamora Fallas

Heredia

Julio, 2024

“Este trabajo de graduación fue _____ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química Industrial”

Miembros del Tribunal Examinador del Trabajo Final de Graduación:

	<u>NOMBRE</u>	<u>FIRMA</u>
Representante del Decano	_____	_____
Representante de la Dirección	_____	_____
Tutora	Ph.D. Ana Francis Carballo Arce	_____
Asesor	Ph.D. José Ángel Rodríguez Corrales	_____
Asesor	Ph.D. Gabriel Zamora Fallas	_____
Lector	_____	_____

RESUMEN

En los últimos años, la formulación y comercialización de productos derivados de cáñamo ha presentado un incremento debido a las propiedades terapéuticas y fisiológicas atribuidas a los fitocompuestos contenidos en la planta, entre los cuales destaca el cannabidiol (CBD) por su actividad en el sistema endocannabinoide humano. Por lo tanto, debido al aumento en la demanda de este tipo de productos, surge la necesidad de disponer de técnicas analíticas adecuadas para brindar controles de calidad a estos productos.

En el presente trabajo, se implementó una metodología para la determinación del contenido de CBD en productos derivados de cáñamo por cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC), para lo cual, se evaluaron los parámetros de desempeño de estabilidad, límites de detección y cuantificación, ámbito, linealidad, especificidad, precisión intermedia, repetibilidad y exactitud. Por su parte, durante la implementación de metodología analítica se analizaron muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo para estudiar el comportamiento de la metodología bajo su uso previsto. De la misma forma, se elaboraron una serie de protocolos y procedimientos para la verificación del correcto desempeño de la técnica y la futura oferta del servicio de análisis.

Entre los principales resultados obtenidos se encuentran el cumplimiento satisfactorio de los criterios de aceptación definidos para los parámetros de desempeño evaluados y la detección de que el 80 % de muestras analizadas presentaban diferencias superiores al ± 10 % de la cantidad de CBD descrita por el fabricante en el etiquetado del producto. Adicionalmente se realizó la identificación preliminar de otros fitocannabinoides contenidos en las muestras comerciales analizadas (e.g., CBN y CBG), la confirmación de la presencia de Δ^9 -THC en líquidos para cigarrillos electrónicos elaborados con CBD, así como el análisis de aceites con CBD cuyo extracto de cáñamo fue aislado del material vegetal dentro del territorio nacional, donde para estas últimas la concentración de CBD no fue detectable.

Con base en los resultados obtenidos, se establece que el método implementado presenta un comportamiento adecuado para la cuantificación de CBD en aceites enriquecidos con extracto de cáñamo por HPTLC. Por su parte, considerando las discrepancias observadas entre la información declarada por los fabricantes en el etiquetado de estos productos y los hallazgos experimentales adquiridos, se evidencia la necesidad de realizar un control de los productos comerciales derivados de cáñamo disponibles en el mercado nacional.

RECONOCIMIENTOS

A la Ph.D. Ana Francis Carballo Arce, el Ph.D. José Ángel Rodríguez Corrales y el Ph.D. Gabriel Zamora Fallas por conformar mi grupo asesor y por toda la ayuda brindada durante el desarrollo de la pasantía, a los cuales les atribuyo el éxito del desarrollo y culminación de este proyecto.

DEDICATORIA

A mi familia por toda la ayuda y apoyo brindado durante mi desarrollo personal, formación académica y profesional, especialmente a mis padres por inculcarme los valores del trabajo duro, perseverancia, integridad, superación y la búsqueda del cumplimiento de metas y objetivos.

AGRADECIMIENTOS

A la Ph.D. Ana Francis Carballo Arce, el Ph.D. José Ángel Rodríguez Corrales y el Ph.D. Gabriel Zamora Fallas por la tutela brindada.

A los profesores M.Sc. Víctor Álvarez Valverde y Ph.D. Luis Roberto Villegas Peñaranda por el apoyo y la asesoría externa ofrecida durante el desarrollo de la pasantía.

Al Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas. (IRET-UNA) por permitirme formar parte de la fuerza de trabajo del centro de investigación.

Al Programa Infantes y Salud Ambiental (ISA) del IRET coordinado por la Ph.D. Berna van Wendel de Joode, por recibirme como estudiante asistente graduado durante los últimos dos años y por contribuir a mi realización personal y profesional al ayudar en el monitoreo, extracción y análisis de agroquímicos utilizados en regiones vulnerables del territorio nacional.

Al M.Sc Clemens Ruepert, la M.Sc Karla Solano Díaz y la Lic. Melania Ramírez Quesada del Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas (LAREP) del IRET por toda la ayuda brindada y el aprendizaje adquirido.

Al personal de la Escuela de Química y la Sede Interuniversitaria Alajuela (SIUA) de la Universidad Nacional de Costa Rica por lo impartido durante el transcurso de la carrera y por establecer los pilares fundamentales de mi formación profesional.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS	xii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes y justificación.....	1
1.2 Marco teórico.....	3
1.2.1 <i>Cannabis sativa L.</i>	3
1.2.2 Taxonomía.....	3
1.2.2.1 Cáñamo.....	4
1.2.3 Principales compuestos químicos presentes en las plantas de cáñamo	5
1.2.4 Cannabinoides	5
1.2.5 Principales propiedades de los cannabinoides.....	8
1.2.6 Productos comerciales derivados del cáñamo	9
1.2.7 Aceites para consumo humano.....	10
1.2.8 Técnicas analíticas para la determinación de cannabinoides.....	10
1.2.9 Cromatografía de capa fina de alto desempeño (HPTLC)	11
CAPITULO II. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo general	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
2.3 Actividades e indicadores de logro.....	14
CAPITULO III. METODOLOGÍA.....	16
3.1 Metodología.....	16
3.2 Materiales y equipos.....	16

3.3	Preparación de la disolución de trabajo de CBD y pretratamiento de las muestras comerciales	17
3.4	Procedimiento y condiciones de trabajo durante el análisis de muestras y estándares.....	17
3.5	Evaluación de los parámetros de desempeño	19
3.5.1	Estabilidad	19
3.5.2	Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	19
3.5.3	Ámbito.....	20
3.5.4	Linealidad.....	20
3.5.5	Especificidad	20
3.5.6	Precisión intermedia	20
3.5.7	Repetibilidad.....	20
3.5.8	Exactitud.....	21
3.6	Definición de los criterios de aceptación.....	21
3.7	Análisis estadístico de los resultados obtenidos	22
3.8	Elaboración de plantillas de referencia para la elaboración de informes con base en los estándares planteados por la ECA para uso del LIB.....	24
3.9	Análisis de muestras comerciales.....	24
3.10	Sistematización de los análisis realizados a las cinco muestras comerciales de aceites comerciales utilizando la plantilla generada.....	25
3.11	Recomendación de controles de calidad para la verificación periódica del método analítico	25
3.12	Diseño del material didáctico y de apoyo empleado para impartir el taller de formación profesional.....	26
3.13	Un taller de capacitación impartido de forma presencial, en modalidad teórico práctico a estudiantes y personal de la Escuela de Química.....	27
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		27

4.1	Evaluación de los parámetros de desempeño durante la implementación de la metodología analítica.....	28
4.1.1	Estabilidad	29
4.1.2	Límite de detección y límite de cuantificación.....	31
4.1.3	Ámbito.....	32
4.1.4	Linealidad.....	33
4.1.5	Especificidad	35
4.1.6	Precisión intermedia y repetibilidad.....	36
4.1.7	Exactitud.....	37
4.1.8	Comparación de los resultados obtenidos contra otras metodologías de análisis de cannabinoides por HPTLC reportadas en la literatura	38
4.2	Documentos y procedimientos elaborados durante la pasantía	40
4.3	Análisis de muestras comerciales	41
4.3.1	Cuantificación de la concentración de CBD en aceites enriquecidos con extracto de cáñamo.....	43
4.4	Taller de capacitación teórico-práctico sobre la metodología implementada	46
4.5	Pruebas y análisis adicionales realizados durante el desarrollo de la pasantía.....	46
4.5.1	Caracterización de los fitocannabinoides adicionales contenidos en los aceites enriquecidos con extracto de cáñamo analizados.....	47
4.5.2	Análisis de líquidos con CBD para vapeadores y cigarros electrónicos	49
4.5.3	Análisis de muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo elaboradas en Costa Rica	53
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		56
CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		58
ANEXOS		68

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Limitaciones sobre el análisis de compuestos fitoquímicos por medio de las técnicas de cromatografía de gases y cromatografía líquida de alto desempeño	13
Cuadro 2. Actividades propuestas e indicadores de logro para el cumplimiento de los objetivos específicos.....	15
Cuadro 3. Criterios de aceptación definidos para cada uno de los parámetros de desempeño evaluados durante la implementación del método analítico.....	21
Cuadro 4. Comparación de los criterios de aceptación definidos para cada parámetro de desempeño evaluado contra los resultados obtenidos durante la implementación del método... ..	28
Cuadro 5. Determinación del ámbito de trabajo con base en la cantidad esperada del analito....	32
Cuadro 6. Resultados obtenidos durante la evaluación de la linealidad del método	34
Cuadro 7. Resultados obtenidos durante la evaluación de la especificidad del método	36
Cuadro 8. Resultados obtenidos durante la evaluación de precisión del método como precisión intermedia y repetibilidad	37
Cuadro 9. Resultados obtenidos durante la evaluación de la exactitud del método.	38
Cuadro 10. Comparación de resultados obtenidos en procesos de validación de metodologías para el análisis de cannabinoides por HPTLC.....	39
Cuadro 11. Documentación confeccionada durante el desarrollo de la pasantía para el cumplimiento de los objetivos planteados.....	41
Cuadro 12. Información de las muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo analizadas	42
Cuadro 13. Resultados obtenidos en la determinación de la concentración de CBD en muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo.	44
Cuadro 14. Comparación de resultados respecto al estado del etiquetado de aceites con CBD obtenidos en distintos países en los últimos dos años	45

Cuadro 15. Indicadores de logro relacionados al diseño y ejecución del taller de capacitación teórico-práctico sobre la metodología de análisis de CBD por HPTLC.....	46
Cuadro 16. Información de las muestras de líquidos para vapeadores y cigarros electrónicos (e-liquids) analizados.....	49
Cuadro 17. Información de las muestras comerciales de aceites formulados con extracto de cáñamo aislado por una empresa costarricense dentro del territorio nacional	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras moleculares de los cannabinoides ácidos y descarboxilados más comunes.....	6
Figura 2. Diagrama estructural de una planta de cáñamo.....	7
Figura 3. Sistema endocannabinoide humano	8
Figura 4. Diagrama general del proceso de análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo	19
Figura 5. Comparación de fotografías adquiridas durante la evaluación del parámetro de estabilidad con la 2D TLC.....	30
Figura 6. Comparación de cromatogramas obtenidos a 210 nm durante la verificación del límite de detección.....	32
Figura 7. Comparación de cromatogramas obtenidos a 210 nm durante la evaluación del límite superior del ámbito de trabajo.....	33
Figura 8. Ejemplo de una de las curvas de calibración obtenidas con su respectivo diagrama de dispersión de los residuales.....	35
Figura 9. Cromatogramas integrados obtenidos a 210 nm durante la cuantificación del contenido de CBD en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.....	43
Figura 10. Caracterización de muestras comerciales analizadas.....	47
Figura 11. Análisis de líquidos para vapeadores y cigarros electrónicos (e-liquids) con CBD.....	50
Figura 12. Cromatograma integrado obtenido a 210 nm para un overspot de referencias de Δ^9 -THC y CBD.....	51
Figura 13. Mecanismo de conversión del CBD en isómeros de THC.....	52
Figura 14. Análisis de muestras comerciales elaboradas en Costa Rica	55

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Procedimiento de pretratamiento de muestras de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo para su análisis en HPTLC (LIB.SG.P002).....	68
Anexo 2. Diagrama de causa y efecto para la preparación de las disoluciones de trabajo elaboradas a partir de un material de referencia certificado.	71
Anexo 3. Plantilla informes de validación análisis de CBD por HPTLC LIB LIB.SG.P001.....	72
Anexo 4. Plantilla informe de resultados LIB análisis de CBD en aceites (LIB.SG.P003) .	74
Anexo 5. Diagrama de causa y efecto para la determinación de la concentración de CBD en aceites enriquecidos con extracto de cáñamo por la técnica de HPTLC.	76
Anexo 6. Ejemplo de informe de resultados elaborado con los resultados obtenidos del análisis de una muestra comercial utilizando la plantilla confeccionada.	77
Anexo 7. Protocolo de verificación del método de análisis de CBD por HPTLC LIB.SG.P004..	79
Anexo 8. Programa del taller de la capacitación teórica práctica sobre el uso del sistema HPTLC impartida.	89
Anexo 9. Presentación PowerPoint utilizada durante la sesión teórica de la capacitación impartida sobre uso del sistema HPTLC.	93
Anexo 10. Unidad académica elaborada con los contenidos de la capacitación teórica. práctica sobre el uso del sistema HPTLC.....	110
Anexo 11. Evidencia fotográfica sobre la ejecución de la capacitación bimodal teórica práctica sobre el uso del sistema HPTLC.....	128
Anexo 12. Respuestas obtenidas por los participantes de la capacitación teórica práctica sobre el uso del sistema HPTLC al formulario de participación.....	130

LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

<u>%</u>	Porcentaje
<u>%CV</u>	Coefficiente de variación
<u>°C</u>	Grado centígrados
<u>2D-TLC</u>	Cromatografía de capa fina en dos dimensiones
<u>a.C</u>	Antes de Cristo
<u>AU</u>	Absorbance units
<u>ACS</u>	American Chemical Society
<u>AOAC</u>	Association of Analytical Communities
<u>b</u>	Intercepto con el eje y
<u>C21</u>	Esqueleto compuesto de 21 átomos de carbono
<u>C22</u>	Esqueleto compuesto de 22 átomos de carbono
<u>CAGR</u>	Crecimiento Anual Promedio
<u>CAMAG</u>	Casa desarrolladora del sistema HPTLC
<u>CB1</u>	Receptor 1 del sistema endocannabinoide
<u>CB2</u>	Receptor 2 del sistema endocannabinoide
<u>CBC</u>	Cannabicromeno
<u>CBCA</u>	Ácido cannabicroménico
<u>CBD</u>	Cannabidiol
<u>CBDA</u>	Ácido cannabidiólico
<u>CBE</u>	Cannabielsoína
<u>CBG</u>	Cannabigerol
<u>CBGA</u>	Ácido cannabigerólico
<u>CBHA</u>	Ácido de cannabigerol
<u>CBL</u>	Cannabiciclol
<u>CBN</u>	Cannabinol
<u>CBNA</u>	Ácido cannabinólico
<u>CBND</u>	Cannabinodiol
<u>CBNDA</u>	Ácido cannabinodiólico
<u>CBT</u>	Cannabitriol
<u>cm</u>	Centímetro

<u>CP 47,497</u>	Cannabinoide sintético del grupo de los ciclohexilfenoles
<u>DAD</u>	Detección de arreglo de diodos
<u>DE</u>	Desviación estándar
<u>ECA</u>	Ente Costarricense de Acreditación
<u>e-liquids</u>	Electronic liquid (liquido de cigarrillo electrónico)
<u>EUROLAB</u>	European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical Laboratories
<u>F₂₅₄</u>	Indicador de fluorescencia a 254 nm
<u>FDA</u>	Food and Drug Administration
<u>GC</u>	Cromatografía de gases
<u>HPLC</u>	Cromatografía líquida de alta eficacia
<u>HPTLC</u>	Cromatografía de capa fina de alta resolución
<u>HU-331</u>	CBD-hidroquinona
<u>ICH</u>	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
<u>ISO/IEC</u>	International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission
<u>LAFIT</u>	Laboratorio de Fitoquímica
<u>LAPRONEB</u>	Laboratorio de Productos Naturales y Ensayos Biológicos
<u>LASEQ</u>	Laboratorio de Análisis y Servicios Químicos
<u>LC</u>	Límite de cuantificación
<u>LD</u>	Límite de detección
<u>LIB</u>	Laboratorio de Investigación en Biorrefinería
<u>LIDETEQ</u>	Laboratorio de Desarrollo de Tecnología Química
<u>Lot.</u>	Lote
<u>m</u>	Pendiente de la curva de calibración
<u>MC#</u>	Muestra comercial
<u>mg</u>	Miligramo
<u>mg/mL</u>	Miligramo por mililitro
<u>min</u>	Minuto
<u>mL</u>	Mililitro

<u>mm</u>	Milímetro
<u>MR</u>	Material de referencia certificado
<u>MS</u>	Espectrometría de masas
<u>ng</u>	Nanogramo
<u>ng/μL</u>	Nanogramo por microlitro
<u>nm</u>	Nanómetro
<u>Pcn</u>	Precisión
<u>pH</u>	Potencial de hidrógeno
<u>PROCOMER</u>	Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica
<u>R</u>	Coefficiente de correlación
<u>R_F</u>	Factor de retención
<u>R_{pt}</u>	Repetibilidad
<u>S_y</u>	Desviación estándar de los residuales
<u>S_{XO}</u>	Desviación estándar del proceso
<u>TCM</u>	Triglicéridos de cadena media
<u>THC</u>	Tetrahidrocannabinol
<u>THCA</u>	Ácido tetrahidrocannabinólico
<u>TLC</u>	Cromatografía de capa fina
<u>U</u>	Incertidumbre expandida del promedio
<u>UNODC</u>	United Nations Office on Drugs and Crime
<u>USP</u>	U.S. Pharmacopeia
<u>UV</u>	Ultravioleta
<u>Uv-Vis</u>	Ultravioleta-Visible
<u>V_{XO}</u>	Valor relativo de la desviación estándar del proceso
<u>\bar{x}</u>	Valor promedio de la variable independiente
<u>XHDa</u>	Fase móvil p-xileno:n-hexano:dietilamina
<u>Δ^8-THC</u>	delta-8-tetrahidrocannabinol
<u>Δ^9-THC</u>	delta-9-tetrahidrocannabinol
<u>μm</u>	Micrómetro
<u>μL</u>	Microlitro

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes y justificación

Cannabis sativa L. (comúnmente llamada cannabis) es una planta herbácea que pertenece al género *Cannabis* y a la familia cannabáceas.¹ El género *Cannabis* abarca plantas silvestres y formas de cultivo que son morfológicamente similares, generando confusión y controversia sobre el orden taxonómico de las mismas.¹ Algunos autores han propuesto un único género monotípico, *Cannabis sativa*, mientras que otros han argumentado que *Cannabis* se compone de dos subespecies principales derivadas de *Cannabis sativa L.*, *C. sativa* subsp. *sativa* (comúnmente conocido como cáñamo) y *C. sativa* subsp. *Indica* (generalmente conocida como marihuana), que varían según características estructurales, región de origen y su respectivo perfil fitoquímico.²

El auge de la investigación sobre el cáñamo es relativamente reciente, ya que tradicionalmente se usa con fines industriales. Debido a las semejanzas entre el cáñamo y la marihuana, la producción de cáñamo fue ilícita en la mayoría de los países, terminando con siglos de aprendizaje y recursos genéticos.³ Gracias a su naturaleza no psicoactiva, su contenido rico en nutrientes y el fácil acceso en varios países, se produjo un incremento en las indagaciones sobre los efectos positivos para la salud derivados al uso del cáñamo y sus productos, con lo cual, el cáñamo ha captado cada vez más la atención de las personas que se encuentra en la búsqueda de obtener dichos beneficios.³

El mercado industrial del cáñamo abarca principalmente el uso de las fibras y los productos elaborados a partir del aceite extraído de las flores o las semillas de la planta. Se estima que el mercado del cáñamo engloba más de 25.000 productos, que van desde textiles, prendas de vestir, cuerdas, muebles para el hogar, aceites industriales, cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos.⁴ La durabilidad y las propiedades de alta resistencia de la fibra rica en celulosa obtenida del tallo la convierten en un producto valioso para la confección de materiales de refuerzo y construcción, papel y cuerdas.⁵ Por su parte, las semillas de cáñamo poseen un alto valor nutricional y propiedades farmacológicas, donde en la última década, los productos de semillas de cáñamo se han difundido para incluir una gama de alimentos y bebidas, suplementos nutricionales y productos farmacéuticos.⁵

Según el estudio “*Caracterización de alternativas de comercialización internacional del cáñamo industrial*”, realizado en el 2020 por la Promotora del Comercio Exterior de

Costa Rica (PROCOMER), a nivel nacional se logra identificar segmentos de productos derivados del cáñamo a los cuales se podría ingresar, entre los que se destacan los obtenidos a partir de CBD (cannabidiol) como suplementos, soluciones tópicas, bebidas o como aditivo en alimentos; productos de aplicación industrial y cuidado personal.⁴

El incremento en la comercialización de este tipo de productos se evidencia en observaciones realizadas para el 2020, donde el mercado de los productos con CBD como suplementos y bebidas se estimó en \$ 1.928 millones con un aumento de 57 % durante el periodo 2016 - 2020.⁴ Por su parte, el mercado de textiles se estimó en \$ 1.248 millones con un acrecentamiento de 7 % y el de aplicaciones industriales en \$1.099 millones con un incremento de 16 %.⁴ Además, se muestran estimaciones según el crecimiento anual promedio (CAGR), donde para el año 2025 se proyectan ventas globales de productos a base de cáñamo por \$ 14.646 millones, de los cuales \$ 2.074 millones equivalen al comercio dentro de América Latina.⁴

El miércoles 02 de marzo del año 2022 se firmó la “*Ley del Cannabis para uso Medicinal y Terapéutico y del Cáñamo para uso Alimentario e Industrial*” N°10.113, en la que se regula y permite el acceso y el uso del cannabis y sus derivados exclusivamente para uso medicinal y terapéutico y la autorización respecto a la producción, industrialización y comercialización del cáñamo de uso industrial y alimentario, lo que puede traer consigo la consolidación de nuevas empresas en el territorio costarricense.⁶ Posteriormente, por medio del decreto ejecutivo N° 43689-MP-MAG-S se estableció el reglamento del cáñamo para uso alimentario e industrial, donde además mediante el decreto ejecutivo N° 43724-MP-S-MAG se instauró el respectivo reglamento del *Cannabis* para uso medicinal y terapéutico, en los cuales se establecen una serie de pautas e indicaciones para el cultivo y comercialización de productos derivados de plantas del género *Canabis* en Costa Rica.^{7,8}

Por lo tanto, considerando el auge y las proyecciones respecto a la comercialización de productos como aceites enriquecidos con extractos de cáñamo, la aprobación de ley mencionada, los reglamentos respectivos que buscan promover la elaboración y mercadeo de dichos productos y la necesidad de disponer de herramientas analíticas que permitan determinar el contenido real de CBD en los mismos, el presente trabajo final de graduación buscó implementar en la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Costa Rica un método analítico para la determinación del cannabinoide CBD en aceites comerciales

enriquecidos con extractos de cáñamo, con lo que a su vez, la ejecución del proyecto puede servir como precedente para la validación completa y acreditación del método, así como la futura extensión del alcance para otras matrices de interés legal y comercial.

1.2 Marco teórico

1.2.1 *Cannabis sativa* L

La familia *Cannabaceae*, consiste en un grupo de plantas con flores, que incluye aproximadamente 170 especies agrupadas en unos 11 géneros distintos. Las hojas son a menudo palmeadas lobuladas o palmeadas compuestas y estipuladas.⁹ Entre los géneros de plantas pertenecientes a esta familia, se encuentra el género *Cannabis*, que engloba una serie de especies silvestres cultivadas de diversas formas que son morfológicamente variables, resultando en confusión y controversia sobre la organización taxonómica de estas, llegando a ser considerado un género politípico (grupo taxonómico que posee varias subespecies y variedades) que con base en estudios morfológicos, anatómicos, fitoquímicos y genéticos, generalmente se considera que tiene una sola especie altamente polimórfica, *Cannabis sativa* L.¹⁰

La especie de plantas *Cannabis sativa* L. pueden ser encontrada en una variedad de hábitats y altitudes, que abarcan desde el nivel del mar hasta las estribaciones alpinas del Himalaya, en la cual posiblemente se originó.¹¹ El uso y cultivo de estas plantas poseen una antigüedad de 5000 a 6000 años, lo que dificulta precisar el origen de esta especie.¹¹

1.2.2 Taxonomía

El número de especies del género *Cannabis* ha sido objeto de un largo debate a través de los años. Los taxónomos han caracterizado de diversas formas el género *Cannabis* en función de su naturaleza politípica.¹¹ En su clasificación original de 1753, el naturalista sueco Carl Linnaeus identificó solo una especie, *Cannabis sativa*, no obstante, el primer indicio de discrepancia taxonómica se produjo en el año 1785 cuando el biólogo, Jean-Baptiste Lamarck, recibió algunos especímenes de plantas recolectados en regiones de la India.² Considerando las variaciones físicas como tallos firmes, corteza delgada y la forma de sus hojas y flores, Lamarck consideró que debían distinguirse de *C sativa*.² En consecuencia, definió una nueva especie, *C indica*.² La descripción de Lamarck de *C. indica* difería de su descripción de *C. sativa* por ocho caracteres morfológicos en los tallos, hábito de

ramificación, folíolos y flores.² Lamarck también describió diferencias quimiotaxonómicas según propiedades sensoriales como producción de un olor fuerte y efectos psicoactivos por parte de *C. indica* y por variaciones fitoquímicas debido a la diferente proporción de compuestos químicos denominados cannabinoides encontradas en ambas especies.²

En una revisión extensa y detallada del problema de las especies de cannabis, dos botánicos estadounidenses, Arthur Cronquist y Ernest Small, en el año 1976 definieron una nueva nomenclatura basada en un concepto taxonómico de dos pasos, el primero reconoce dos subespecies basadas en el contenido del cannabinoide psicoactivo THC (tetrahidrocannabinol) en seco en las sumidades florecientes femeninas, con un 0,3 % de THC como parámetro distintivo y el segundo paso reconoce dos variedades dentro cada subespecie, en función de su fase de domesticación, derivando en la siguiente clasificación:²

- *C. sativa* subsp. *sativa* var *sativa* (bajo THC, rasgos de domesticación)
- *C. sativa* subsp. *sativa* var *spontanea* (bajo THC, rasgos de tipo salvaje)
- *C. sativa* subsp. *indica* var. *indica* (alto THC, rasgos de domesticación)
- *C. sativa* subsp. *indica* var. *kafiristanica* (alta THC, rasgos de tipo salvaje)

1.2.2.1 Cáñamo

El cáñamo es un cultivo herbáceo que a través de los años ha sido utilizado para la obtención de fibras, formulación de alimentos y fines medicinales.⁵ El cultivo de cáñamo se remonta a China alrededor del 2700 a.C. y se cree que posteriormente se propagó por el continente asiático, llegando a Europa hace 2000-2200 años.⁵ Debido a su naturaleza no psicoactiva, contenido rico de nutrientes y accesibilidad en varios países, el cáñamo ha abarcado cada vez más la atención del público y está siendo comercializado y consumido como productos que promueven y benefician la salud.³ Por su parte, la semilla de cáñamo ya sea cruda, cocida o prensada para la obtención de aceite, ha sido bien documentada como una fuente primitiva de fibra, proteína y grasa.⁵

Como se mencionó anteriormente, existe confusión sobre las plantas derivadas del género *Cannabis*, por su parte el cáñamo y la marihuana pertenecen a la misma especie de planta de *Cannabis sativa*, aunque se diferencian botánicamente en un nivel de subespecie como *C. sativa* subsp. *sativa* (cáñamo) y *C. sativa* subsp. *indica* (marihuana).⁵ Legalmente, estas variaciones se diferencian según el límite superior permisible del contenido de THC. La Unión Europea limita los niveles de Δ^9 -THC en cáñamo al 0,2 % en peso seco, mientras

que la Ley de Comercialización Agrícola de EE. UU. de 1946 restringe el Δ^9 -THC a menos del 0,3 % en peso seco.³ Por su parte, en Costa Rica mediante la legislación anteriormente mencionada, se definió como *Cannabis psicoactivo* a los especímenes del género *Cannabis* cuyo contenido de Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, Δ^{10} -THC o cualquier otro componente psicoactivo, sea igual o mayor al 1% en peso seco.⁸

1.2.3 Principales compuestos químicos presentes en las plantas de cáñamo

En las plantas del género *Cannabis* se produce una gran cantidad de constituyentes adicionales o metabolitos secundarios, entre los cuales se encuentran incluidos principalmente cannabinoides, terpenoides y fenilpropanoides, donde en especímenes de *C. sativa* se han encontrado más de 750 compuestos naturales de diferentes clases químicas.¹²

En este tipo de plantas, se ha identificado la presencia de 50 hidrocarburos, 27 compuestos nitrogenados, 25 fenoles no cannabinoides, 23 ácidos grasos, 23 flavonoides, 20 ácidos simples, 13 cetonas simples, 13 ésteres y lactonas simples, entre otros.¹² Por su parte, estos terpenos y compuestos fenólicos poseen un amplio espectro de propiedades farmacológicas y pueden contribuir a los efectos observados en la ingestión o combustión e inhalación de productos derivados del cannabis, además de ser los responsables de múltiples propiedades organolépticas pertinentes a los especímenes pertenecientes al género.¹³

1.2.4 Cannabinoides

Los cannabinoides representan un grupo de compuestos terpenofenólicos C₂₁ o C₂₂ (para las formas carboxiladas) que se producen mayoritariamente en plantas del género *Cannabis*, no obstante, también se han detectado en plantas de los géneros *Radula* y *Helichrysum*.¹³ Se han reportado más de 100 cannabinoides diferentes en la literatura, aunque algunos de estos son productos de descomposición, generalmente se clasifican en 10 subclases:¹³ cannabigeroles (CBG), cannabicromenos (CBC), cannabidioles (CBD), Δ^9 -tetrahidrocannabinoles (Δ^9 -THC), Δ^8 -tetrahidrocannabinoles (Δ^8 -THC), cannabicicloles (CBL), cannabielsoínas (CBE), cannabinoles (CBN), cannabinodiolos (CBND), cannabitrioles (CBT) y otros varios cannabinoides.¹⁴ Los compuestos mayoritarios son el THCA (ácido tetrahidrocannabinólico), el CBDA (ácido cannabidiólico) y el ácido cannabínólico (CBNA), seguidos del ácido cannabigerólico (CBGA), el ácido cannabicroménico (CBCA) y el ácido cannabiniódico (CBNDA), en la figura 1 se pueden

observar las estructuras moleculares de los cannabinoides más comunes en sus formas ácidas y descarboxiladas.¹³ El THCA es el cannabinoide principal en el cannabis psicoactivo, mientras que el CBDA predomina en el cáñamo de tipo fibra.¹³ Los cannabinoides se acumulan en la cavidad secretora de los tricomas glandulares, que se localizan principalmente en las flores femeninas y en la mayoría de las partes aéreas de las plantas, también se han detectado en baja cantidad en otras partes de las plantas, incluidas las semillas y el polen.¹³

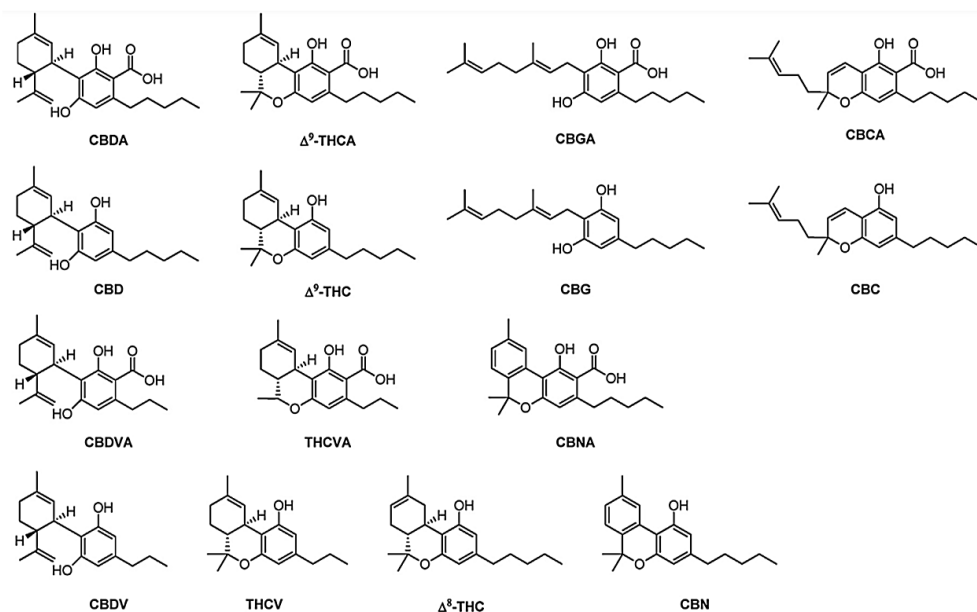


Figura 1. Estructuras moleculares de los cannabinoides ácidos y descarboxilados más comunes.¹⁵

Usualmente, la población en general se encuentra más familiarizada con los cannabinoides neutros como el CBD y el Δ^9 -THC, no obstante, los cannabinoides existen en las plantas en su forma ácida, lo que significa que contienen un ácido carboxílico unido al anillo aromático.^{12,14} Los cannabinoides poseen una cadena lateral de tipo alquilo que varía de uno a cinco carbonos, donde la longitud de dicha cadena es un sitio común de variabilidad estructural generando diversos tipos de compuestos, donde los orcinoides contienen un carbono, los varinoides tres y los olivetoides cinco.^{12,14}

Los cannabinoides más abundantes en la especie *C. sativa* contienen cadenas laterales de n-pentilo, pero también se han identificado cadenas laterales de n-butilo, n-propilo, etilo y metilo en menor proporción.¹² Los extractos de *C. sativa* no son psicoactivos hasta que se suministra suficiente calor para inducir una reacción química conocida como descarboxilación.¹² Esta reacción de los ácidos cannabinoides, la cual ocurre rápidamente

por encima de los 105 °C, propicia la formación de sus correspondientes formas neutras de las cuales algunas poseen efectos psicotrópicos.¹² Asimismo, el calentamiento, la exposición a la luz o el envejecimiento pueden generar degradación oxidativa, en la que se produce la conversión de Δ^9 -THC en CBN, así como la isomerización de Δ^9 -THC en Δ^8 -THC, que también es psicoactivo, pero es menos abundante en *C. sativa* y menos potente que el Δ^9 -THC.^{16,17}

El Δ^9 -THC es uno de los cannabinoides más famosos del mundo, considerado el cuarto compuesto químico de uso narcótico más popular después de la cafeína, el alcohol etílico y la nicotina, todos los cuales son adictivos.^{16,17} De la misma forma, el CBD, cannabinoide principal en el cáñamo, es conocido como una sustancia farmacológicamente activa y se está volviendo cada vez más importante para aplicaciones medicinales e industriales.^{16,17}

La producción de cannabinoides en plantas de cáñamo puede verse afectada por diversos factores bióticos y abióticos, tales como el sexo y la madurez de la planta, la cantidad de luz diaria, la temperatura ambiente, los nutrientes del medio de cultivo y la intensidad de la luz ultravioleta.¹⁷ En el cáñamo, se ha encontrado que el contenido de cannabinoides se distribuye en proporciones heterogéneas en las partes de la planta, donde el porcentaje mayoritario se localiza en las células secretoras dentro de los tricomas glandulares (donde se puede encontrar un 60 %), en las flores femeninas no polinizadas antes de la senescencia (hasta un 30 %), en flores polinizadas (30 %), en hojas (0,05 %) y en menor cantidad en el tallo (0,02 %), véase la figura 2.¹⁷

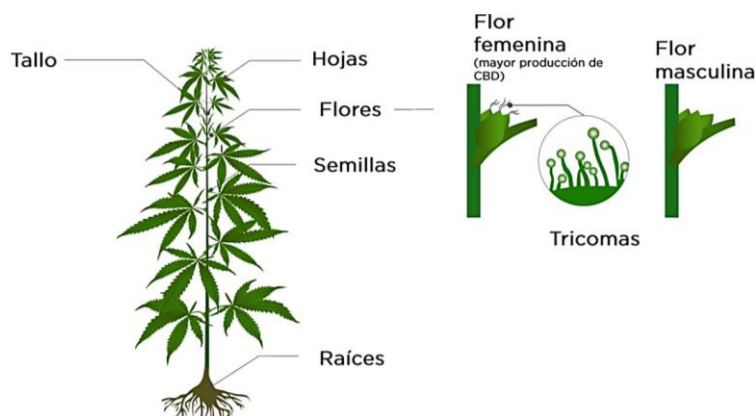


Figura 2. Diagrama estructural de una planta de cáñamo.⁴

1.2.5 Principales propiedades de los cannabinoides

Gran parte de la actividad biológica asociadas con los cannabinoides se basa en sus respectivas interacciones con el sistema endocannabinoide humano.¹³ El sistema endocannabinoide es un sistema de señalización completo que abarca una serie de ligandos endógenos (endocannabinoides como la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG)), receptores de cannabinoides (CB1 y CB2) y enzimas responsables de la biosíntesis e inactivación de ligandos.¹⁸

Los THC, son agonistas parciales de los receptores CB1 y CB2 del sistema endocannabinoide, presentando una mayor afinidad por el receptor CB1, el cual desempeña un papel en las propiedades del sistema endocannabinoide y su actividad neural.¹⁴ Además de encontrarse en el sistema nervioso central y en todo el cerebro, los receptores CB1 también se encuentran en las células del sistema inmunológico, tejidos del tracto gastrointestinal, sistema reproductivo, glándulas suprarrenales, el corazón, los pulmones y otros lugares donde los cannabinoides también pueden actuar para ejercer diferentes efectos sobre los organismos vivos.¹⁴ En la figura 3 se muestra un diagrama representativo del sistema endocannabinoide humano, sus componentes, distribución a nivel corporal e interacciones con los respectivos ligandos.

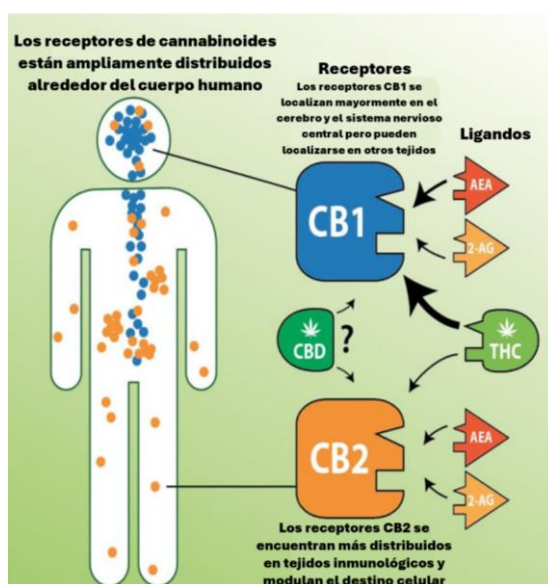


Figura 3. Sistema endocannabinoide humano. Figura adaptada de la literatura consultada al español.¹⁹

Por su parte, se cree que los receptores CB2 tienen un impacto en las células pertenecientes al sistema inmunológico, están fuertemente involucrados en la regulación del

sistema inmune y desempeñan un papel en reacciones de inflamación.¹² No obstante, el THC tiene más objetivos moleculares que solo los receptores CB1 y CB2, mostrando potentes efectos antiinflamatorios, antitumorales, analgésicos, relajantes musculares, antioxidantes y antiespasmódicos. Sin embargo, el THC también se ha asociado con una serie de efectos secundarios, que incluyen ansiedad, déficits colinérgicos e inmunosupresión.¹³

Por otra parte, el CBD tiene una gama de propiedades farmacológicas que se han subestimado durante muchos años en comparación con el THC.^{13,18} El CBD puede aumentar la seguridad de los extractos de cáñamo debido a que puede reducir los efectos secundarios relacionados al THC contenido en los productos.^{13,18} Los estudios in vitro y en animales han demostrado que el propio CBD tiene propiedades ansiolíticas, antieméticas, antiinflamatorias, antipsicóticas e inmunomoduladoras, entre otras.^{13,18} Este cannabinoide ha sido considerado prometedor ya que también ha mostrado potencial como agente terapéutico en modelos preclínicos de enfermedades del sistema nervioso central como la epilepsia, enfermedades neurodegenerativas, esquizofrenia, esclerosis múltiple, trastorno afectivo y regulación central de la conducta alimentaria.^{13,18} Curiosamente, el CBD posee potentes propiedades antifúngicas y antibacterianas, que lo hacen potente contra la bacteria *Staphylococcus aureus*, el cual es resistente a antibióticos como la meticilina.^{13,18}

1.2.6 Productos comerciales derivados del cáñamo

El renacimiento del interés comercial en el cultivo de cáñamo se puede atribuir a la demanda de prácticas agrícolas sostenibles junto con el conocimiento del contenido de fibra y el perfil nutricional del cáñamo, así como la formulación de nuevas leyes que propicien el cultivo y comercialización de productos derivados de este.⁵

En la actualidad, todas las partes de la planta, con excepción de la raíz, están siendo aprovechadas comercialmente.²⁰ Se calcula que el mercado del cáñamo abarca más de 25.000 productos, que van desde textiles, cuerdas, muebles para el hogar, aceites industriales, alimentos, productos farmacéuticos entre otros.²⁰ Las propiedades de alta resistencia de la fibra del tallo que es rica en celulosa la convierten en una buena opción para la fabricación de materiales de refuerzo y construcción.²⁰

En la industria de los alimentos, la materia prima más explotada son las semillas del cáñamo, las cuales, en la última década, su uso se ha ampliado para incluirla en la formulación de una gama de alimentos y bebidas funcionales, suplementos nutricionales, así

como alternativas de proteínas.^{5,20} Por su parte, el aceite obtenido de la semilla de cáñamo posee un elevado valor nutricional y contiene ácidos grasos poliinsaturados.^{5,20} Otro de los productos derivados del cáñamo que ha presentado un auge en los últimos años es el aceite extraído de las plantas de cáñamo, ya que es usado en todo el mundo debido a sus propiedades medicinales.²¹

1.2.7 Aceites para consumo humano

El aceite de cáñamo ha sido objeto de estudio utilizando un enfoque multidisciplinario para evaluar sus diversas propiedades medicinales y actividades no psicoactivas, antioxidantes, paliativas, antiinflamatorias, inhibición enzimática, antimicrobiana, antineoplásicas, quimiopreventivas, que a su vez propician que, con el transcurso del tiempo, mayor cantidad de personas que desean beneficiarse de sus propiedades los consuman.^{21,22}

Por lo tanto, el aceite esencial de cáñamo podría ser un producto de interés para las industrias farmacéutica, nutracéutica y cosmética.²³ Este aceite se produce en los tricomas capitados que son particularmente abundantes en las inflorescencias y, en menor medida, en las hojas.²³ El aceite esencial de cáñamo es un producto llamativo que se compone de una mezcla compleja formada por terpenos y cannabinoides, entre los cuales se encuentran monoterpenos (alfa-pineno, mirceno y terpinoleno), sesquiterpenos (alfa-humuleno, (*E*)-cariofileno y cariofileno) y cannabinoides como el CBD en mayor proporción, con THC en niveles muy bajos o nulos, y además pueden contener ácidos grasos esenciales tales como ácido linoleico y ácido alfa-linoleico.^{23,24}

El aceite de cáñamo puede ser ingerido en formas medicinales como tabletas, cápsulas, tinturas y gotas, así como en forma de aditivo en alimentos funcionales como bebidas energéticas, refrescos, chocolates y productos horneados.²¹

1.2.8 Técnicas analíticas para la determinación de cannabinoides

A medida que el consumo de productos derivados de plantas del género *Cannabis* se acepta progresivamente, se vuelve cada vez más importante implementar métodos de control de calidad para que los consumidores obtengan los efectos deseados asegurando homogeneidad en el perfil de cannabinoides y el contenido de los productos derivados de cannabis.²⁵ Con el transcurso del tiempo, se han desarrollado para el estudio cualitativo y cuantitativo de cannabinoides, así como otros compuestos en la planta de cannabis, una

variedad de técnicas analíticas entre las cuales se encuentran las herramientas cromatográficas basadas en la separación de los tipos de componentes de una matriz según las propiedades fisicoquímicas y afinidades de dichos componentes.²⁵

La técnica de cromatografía de gases (GC) ha sido la principal técnica analítica utilizada con fines normativos y toxicológicos federales para determinar cannabinoides en muestras de fluidos y tejidos en el cuerpo humano a pesar de la labilidad térmica de las moléculas que se encuentran en su respectiva forma ácida.²⁶ Durante el proceso de análisis por esta técnica, debido a la alta temperatura a la que se exponen los compuestos durante la corrida cromatográfica, se genera la descarboxilación de los cannabinoides ácidos en su forma neutra.^{26,27} Por lo tanto, cuando se analizan cannabinoides por este método, los resultados comúnmente son reportados como cannabinoides totales, donde en la magnitud reportada hace referencia a la cantidad combinada de su forma ácida y su pertinente forma neutra que se encontraban originalmente en la matriz analizada.²⁶

La cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) es una de las herramientas de separación cromatográfica más utilizada, modernas, eficiente y versátil que se emplean comúnmente para la separación, identificación y cuantificación de compuestos pertinentes a mezclas complejas, así como para determinar los perfiles químicos o huellas dactilares de mezclas crudas.²⁸

Se pueden utilizar varios métodos de detección combinados con cromatografía líquida de alta resolución para el análisis de cannabinoides.²⁵ Los métodos de detección más comunes incluyen detectores de espectrometría de masas (MS), absorción ultravioleta (UV) (190 a 400 nm) y detección de arreglo de diodos (DAD).²⁵ Por su parte, al utilizar la detección de arreglo de diodos, se puede adquirir más información sobre las sustancias en comparación a los detectores UV ya que generan un espectro Uv-Vis, consiguiendo una mejora en la especificidad debido a que los cannabinoides ácidos y neutros poseen espectros de absorción diferentes, alrededor de 270 nm - 310 nm y 210 nm - 220 nm respectivamente.²⁵

1.2.9 Cromatografía de capa fina de alto desempeño (HPTLC)

Para la determinación de cannabinoides de forma cualitativa se destaca el método de cromatografía de capa fina (TLC), que es considerado como un método de confirmación requerido por la *United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)* para la evaluación cualitativa del perfil de cannabinoides.²⁶ Los avances recientes en esta técnica, concretamente

el desarrollo de la cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC), han hecho de la TLC una técnica muy atractiva para la determinación cuantitativa de los constituyentes pertinentes a diversos fitofármacos.²⁹

HPTLC es considerado como un método poderoso y adecuado para la ejecución de tareas analíticas cualitativas y cuantitativas, donde su uso moderno, asistido de la aplicación de muestras de forma automatizada, así como el uso de escaneo densitométrico, le atribuye el potencial de descartar errores sistemáticos durante el análisis, efectuando con la recomendación NAS 2009 5: "minimizar el potencial sesgo y fuentes de error humano en la práctica forense".³⁰⁻³²

De la misma forma, diversos autores han informado que HPTLC ofrece una excelente separación para análisis cuantitativo y cualitativo de un amplio espectro de compuestos químicos, como los que forman parte de la formulación de suplementos dietéticos herbales y botánicos, nutraceuticos, medicinas tradicionales occidentales, chinas y ayurvédicas (indias), entre otros.³⁰

La caracterización de los cannabinoides por esta técnica, generalmente se basa en la comparación del valor del factor de retención (R_F) para cada cannabinoide separado contra el de los estándares auténticos, mientras que la evaluación visual se obtiene aplicando un agente derivatizante (solución de Fast Blue B) por inmersión o rociado sobre la placa de HPTLC que ocasiona una tinción selectiva para los cannabinoides.³³ La determinación de cannabinoides por este método es comparable con un pequeño grado de error ($\pm 0,5\%$) a los resultados obtenidos mediante método validado de HPLC para el mismo objetivo.³⁴

El uso de HPTLC para el análisis de compuestos presenta una serie de ventajas en comparación con otras técnicas, como HPLC y GC, donde algunas de estas son:^{35,36}

- Permite realizar la separación de múltiples muestras en paralelo en la misma placa (alcanzando el análisis simultaneo de 15 muestras), lo que ofrece un alto rendimiento, así como un análisis rápido y económico.
- Se pueden hacer uso de reactivos derivatizantes que adjudican colores específicos y permiten diferenciar compuestos según la reacción de estos frente al agente colorante.
- HPTLC puede utilizar diferentes modos de evaluación, lo que conlleva a la caracterización de compuestos que poseen diferentes propiedades de absorción ante distintas longitudes de onda.

- Las placas de HPTLC son desechables, por lo cual, no es necesario procesos de regeneración ni limpieza de estas. Cabe destacar que, posterior al descarte, el soporte de la placa puede ser enviado a reciclaje y la fase estacionaria tener una disposición final en una planta de tratamiento de residuos químicos.
- La cantidad requerida de fase móvil es pequeña, lo que minimiza el costo de compra y eliminación de solventes.
- La exactitud y precisión adquirida durante la cuantificación es elevada debido a que tanto las muestras como los estándares se miden en las mismas condiciones en una misma placa.

Considerando las ventajas anteriormente mencionadas, así como algunas de las limitantes e inconvenientes que poseen técnicas analíticas convencionales como GC y HPLC, las cuales se muestran en el cuadro 1, HPTLC se ha posicionado como el instrumento más potente para el control de calidad de compuestos fitoquímicos debido a su simplicidad y confiabilidad.^{32,37} Por lo tanto, el desarrollo y disposición de métodos analíticos modernos que emplean el uso de HPTLC, pueden ser empleados como una herramienta para la identificación, autenticación y cuantificación de fitocompuestos en productos comerciales.^{32,37}

Cuadro 1. Limitaciones sobre el análisis de compuestos fitoquímicos por medio de las técnicas de cromatografía de gases y cromatografía líquida de alto desempeño.^{38,39}

Técnica cromatográfica	Limitaciones
Cromatografía de gases (GC)	No es aplicable para analizar compuestos termolábiles
	Compuestos no volátiles necesitan reacciones de derivatización para su análisis
	Puede ser difícil comparar espectros de compuestos derivatizados contra una base de datos existente
Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)	Las muestras pueden requerir limpieza previa
	Emplea elevados volúmenes de disolventes
	Las columnas carecen de reproducibilidad a largo plazo al igual que en GC
	Necesidad de regeneración de la columna

CAPITULO II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar habilidades prácticas enfocadas en el proceso de validación de métodos analíticos para el control de calidad de cannabinoides en productos comerciales presentes en el mercado nacional.

2.2 Objetivos específicos

Evaluar los parámetros de desempeño de un método analítico para la determinación de cannabidiol (CBD) en aceites enriquecidos con extractos de cáñamo mediante el uso de HPTLC.

Preparar y analizar muestras comerciales de aceites enriquecidos con extractos de cáñamo por la técnica de HPTLC.

Elaborar un procedimiento de laboratorio para el análisis de CBD en muestras comerciales de aceites enriquecidos con extractos de cáñamo y los parámetros relacionados de control de calidad para la metodología propuesta.

2.3 Actividades e indicadores de logro

Cuadro 2. Actividades propuestas e indicadores de logro para el cumplimiento de los objetivos específicos.

Objetivo específico	Actividad	Indicadores de logro
Evaluar los parámetros de desempeño de un método analítico para la determinación de cannabidiol (CBD) en aceites enriquecidos con extractos de cáñamo mediante el uso de HPTLC.	Evaluación de parámetros de desempeño: Estabilidad, Limite de detección, Limite de cuantificación, Ámbito, Linealidad, Especificidad, Precisión intermedia, Repetibilidad, Exactitud.	Nueve parámetros de desempeño evaluados, reportados en una base de datos.
	Análisis estadístico de los resultados obtenidos.	Un informe del análisis estadístico de los resultados obtenidos.
	Elaboración de una plantilla de referencia para la elaboración de informes con base en los estándares planteados por la ECA para uso del Laboratorio de Investigación en Biorrefinería (LIB).	Una plantilla para la elaboración de informes finales de validación. Una plantilla para la confección de informes de resultados.
Preparar y analizar muestras comerciales de aceites enriquecidos con extractos de cáñamo por la técnica de HPTLC.	Preparación de las muestras comerciales de aceites enriquecidos con extractos de cáñamo para su análisis por HPTLC.	Un protocolo para la extracción de CBD de aceites de uso comercial.
	Análisis de las muestras comerciales por HPTLC.	Cinco muestras de aceite de cáñamo extraídas y analizadas por HPTLC.
	Sistematización de los análisis realizados a las cinco muestras comerciales de aceites comerciales utilizando la plantilla generada.	Cinco informes, uno por cada muestra analizada, utilizando la plantilla generada en el marco del proyecto.
Elaborar un procedimiento de laboratorio para el análisis de CBD en muestras comerciales de aceites enriquecidos con extractos de cáñamo y los parámetros relacionados de control de calidad para la metodología propuesta	Recomendación de controles de calidad para la verificación periódica del método analítico.	Un protocolo para la verificación del adecuado funcionamiento del método analítico implementado.
	Diseño del material didáctico y de apoyo que será empleado para impartir el taller de formación profesional sobre el método en HPTLC.	Una presentación de diapositivas con el contenido del taller de capacitación. Un programa con el contenido del taller. Una unidad didáctica que contenga el material utilizado en el taller a desarrollar.
	Un taller de capacitación impartido de forma presencial, en modalidad teórico práctico a estudiantes y personal de la Escuela de Química.	Un formulario que verifique la asistencia al taller por parte del personal de los laboratorios, así como evidencia fotográfica de la misma.

CAPITULO III. METODOLOGÍA

3.1 Metodología

Con la finalidad de cumplir con los objetivos establecidos del proyecto, así como alcanzar los indicadores de logro asociados a los mismos, durante el desarrollo de la pasantía se realizaron un total de 560 horas en el transcurso de 35 semanas efectuadas a partir del 28 de enero de 2023. El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Desarrollo de Tecnología Química (LIDETEQ) de la Universidad Nacional de Costa Rica, en el cual se encuentra localizado el sistema HPTLC-CAMAG. En las siguientes secciones de este capítulo se describe de forma detallada las estrategias metodológicas empleadas para el desarrollo de las actividades estipuladas del proyecto.

3.2 Materiales y equipos

Equipos:

- Agitador Vórtex
- Balanza analítica Sartorius AX224
- Micropipeta 1 – 5 mL BOECO Germany ME906759
- Sistema de módulos HPTLC-CAMAG (*TLC Visualizer 2, Automatic TLC Sampler 4, Automatic Developing Chamber 2, TLC Scanner 4*)

Materiales de referencia:

- MR#A: 300 mg Natural Tincture (cbdMD, Lot. 20911S1) con certificado de análisis de laboratorio acreditado ISO/IEC 17025:2017
- MR#B: 500 mg Isolate Tincture (cbdistillery, Lot. 3221860) con certificado de análisis de laboratorio acreditado ISO/IEC 17025:2017
- MR#C: (-)-trans- Δ^9 -THC 1,0 mg/mL en metanol (Supelco, Lot. FE09162102)
- MRC CBD: cannabidiol 1,0 mg/mL en metanol (Supelco, Lot. FE01112103)

Reactivos y consumibles:

- Aceite TCM
- Acetato de etilo (J.T.Baker, Lot. K20C62)
- Agua desionizada
- Diclorometano (Merck, Lot. K51753844 940)
- Dietilamina

- Metanol (J.T.Baker, Lot. M13C59)
- Muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo
- Muestras comerciales de líquidos para cigarrillos electrónicos (e-liquids) con CBD
- n-Hexano (Merck, Lot. K49712191747)
- p-Xileno (Merck, Lot. S23997827)
- Placas HPTLC Silica gel 60 F254 20 cm × 10 cm. (Merck, Lot. HX17228442)
- Placas TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 20 cm × 10 cm
- Placas TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 10 cm × 10 cm
- Sal Fast Blue B (Sigma Aldrich, Lot. MKCK4645)
- Viales de inyección 2 mL.

3.3 Preparación de la disolución de trabajo de CBD y pretratamiento de las muestras comerciales

El procedimiento de elaboración de las disoluciones de trabajo del analito de interés, así como el tratamiento previo de las muestras comerciales antes de su análisis por HPTLC consistió en una doble dilución gravimétrica con disolventes orgánicos. Para lo cual se toma como base las indicaciones detalladas en la nota de aplicación A108.1 emitida por CAMAG “*Identification and quantification of different cannabinoids in Cannabis sativa*”, al cual se le realizaron modificaciones con base en el comportamiento observado durante el desarrollo e implementación de la metodología de análisis.⁴⁰ Con la finalidad de estandarizar el procedimiento utilizado para el pretratamiento de muestras y preparación de disoluciones de trabajo, se confeccionó un documento con las indicaciones detalladas del proceso, dichas directrices pueden consultarse en el anexo 1. Cabe destacar que, con el objetivo de verificar la concentración del material de referencia utilizado para confeccionar las curvas de calibración (MR#A), una disolución del mismo fue analizada un total de diez veces haciendo uso del material de referencia certificado de CBD (MRC CBD) bajo el método implementado.

3.4 Procedimiento y condiciones de trabajo durante el análisis de muestras y estándares.

De la misma forma, se siguió la metodología secuencial de análisis descrita en el artículo científico “*High performance thin-layer chromatography (HPTLC) analysis of*

cannabinoids in cannabis extracts” y las condiciones operacionales denotadas en la nota de aplicación mencionada.^{31,40} A continuación, se detallan las etapas que conforman el procedimiento de análisis de CBD por HPTLC empleado:

- *Documentación imagen de fondo*: inicialmente se colocó una placa limpia y sin imperfecciones estructurales en el *TLC Visualizer 2* para tomar una fotografía de esta con luz blanca, longitudes de onda de 254 nm y 366 nm.
- *Deposición de las muestras sobre las placas*: se utilizó el *Automatic TLC Sampler 4* para rociar las muestras y las referencias sobre la placa en forma de banda, con un número máximo de 15 siembras por placa.
- *Revelado de las placas*: se empleó el módulo *Automatic Developing Chamber 2* para desarrollar las placas posterior a la aplicación de las muestras. La fase móvil utilizada se basó en una composición de p-xileno:n-hexano:dietilamina (25:10:1).
- *Visualización de placas reveladas*: haciendo uso del *TLC Visualizer 2*, se visualizaron las placas desarrolladas y se adquirieron fotografías con luz blanca, longitudes de onda de 254 nm y 366 nm.
- *Determinación de la intensidad de los compuestos separados*: por medio del *TLC Scanner 4*, se escaneó la intensidad de las bandas separadas en las placas a 210 nm y 280 nm.
- *Derivatización de la placa desarrollada*: se utilizó el módulo *Derivatizer* para rociar la placa revelada con 2 mL de una solución de sal Fast Blue B.
- *Visualización de la placa derivatizada*: posterior al proceso de derivatización, la placa se transfirió al *TLC Visualizer 2* para adquirir fotografías utilizando luz blanca, longitudes de onda de 254 nm y 366 nm.
- *Manipulación del equipo y análisis de los resultados*: se utilizó el software *VisionCATS CAMAG HPTLC* para controlar, documentar y analizar los datos obtenidos de los experimentos.

En la figura 4 se muestra un diagrama secuencial sobre el proceso utilizado. De la misma forma, en la sección 6 del anexo 10, se muestra una serie de cuadros con las condiciones operacionales para cada módulo en las distintas etapas del proceso.



Figura 4. Diagrama general del proceso de análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

3.5 Evaluación de los parámetros de desempeño

El estudio sobre desempeño del método se realizó tomando como guía la directrices descritas por *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* en la guía “*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*” y el artículo científico “*Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods*”.^{41,42}

3.5.1 Estabilidad

Inicialmente, se evaluó la estabilidad del analito en disolución y en la placa como un prerrequisito de validación, para lo cual se realizó una 2D-TLC con una disolución de concentración 1370 ng/μL del material de referencia A (MR#A) preparada con tres meses de antigüedad respecto al momento de hacer el análisis (MR#1 D10 26/01/23).

3.5.2 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Estos parámetros fueron determinados por medio de los resultados obtenidos de las mediciones de las curvas de calibración. Para lo cual, se establecieron como la relación de la desviación estándar de los residuales (S_y) entre la pendiente de la curva de calibración (m) multiplicados por un factor numérico de 3,33 para el LD y de 10 para el LC, los cuales son definidos por el ICH en la guía de validación ya mencionada.

3.5.3 Ámbito

Para el presente método se definió el ámbito de trabajo como un mínimo de 80 % al 120 % de la cantidad esperada del analito para muestras comerciales disponibles en el mercado nacional al momento del inicio del proyecto, esto posterior al respectivo proceso de pretratamiento. De la misma forma, se realizaron pruebas para la definición del valor máximo del ámbito de trabajo, analizando cantidades elevadas del analito y estudiando la respuesta obtenida para cada una de estas.

3.5.4 Linealidad

Para la evaluación de la linealidad del método se realizó una dilución gravimétrica del MR#A para la elaboración de una disolución de trabajo de concentración 115,4 ng/μL denominada como MR#A D100, usada para la confección de las curvas de calibración de cinco niveles abarcando un ± 20 % de la concentración esperada del analito en las muestras comerciales.

3.5.5 Especificidad

El parámetro de la especificidad se evaluó analizando la respuesta de 5 siembras de una disolución de un material de referencia y 10 siembras en cantidades similares de disoluciones de muestras comerciales que contenían el analito, determinando los factores de retención (R_F) del analito (el R_F máximo en el pico pertinente) con sus desviaciones estándar. De la misma forma, se determinaron los R_F máximos de las sustancias ajenas al ensayo cercanas al analito con sus respectivas desviaciones estándar.

3.5.6 Precisión intermedia

Por su parte, la precisión intermedia se evaluó haciendo uso de los resultados obtenidos al analizar la cantidad de CBD contenida en tres muestras comerciales. Para cada una de estas, se recopilaron ocho mediciones durante cuatro días distintos.

3.5.7 Repetibilidad

Para la evaluación de la precisión como repetibilidad, se analizaron por triplicado 3 disoluciones (MR#B Rpt A, MR#B Rpt B, MR#B Rpt C) de concentraciones conocidas del MR#B. Dichas disoluciones se prepararon de manera que MR#B Rpt A sea una concentración baja conocida (177,2 ng/μL), MR#B Rpt B sea una concentración intermedia conocida (442,6 ng/μL) y MR#B Rpt C sea una concentración alta conocida (708,2 ng/μL),

esto respecto al punto inferior y superior de la curva de calibración al sembrar por triplicado 2 μ L cada una de la disoluciones en la placa.

3.5.8 Exactitud

Por su parte, el parámetro de exactitud se evaluó como el porcentaje de recuperación del analito a tres distintas concentraciones (baja, media y alta) dentro del rango de la curva de calibración en muestras enriquecidas respecto a la misma muestra sin enriquecer. Para lo cual, se utilizaron las tres disoluciones de concentración conocida empleadas en la prueba de repetibilidad y una disolución de una muestra comercial (MC#C). Se analizaron por triplicado repeticiones de MC#C enriquecidas en cada nivel, una repetición de MC#C sin enriquecer y la respectiva curva de calibración.

3.6 Definición de los criterios de aceptación

Los criterios de aceptación para los parámetros operacionales evaluados se definieron con base en los valores y recomendaciones descritas en la guía de validación del ICH anteriormente mencionada, el libro “*HPTLC: High-Performance Thin-Layer Chromatography*” (capítulo 3, página 52), el artículo “*Validation and Quality Assurance of Planar Chromatographic Procedures in Pharmaceutical Analysis*” y el apéndice F de “*Guidelines for Standard Method Performance Requirements*” publicados por *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*.^{32,43,44} Dichos valores se muestran en el cuadro 3, donde además se adjunta la referencia respectiva para cada uno de ellos.

Cuadro 3. Criterios de aceptación definidos para cada uno de los parámetros de desempeño evaluados durante la implementación del método analítico.

Parámetro evaluado	Criterio de aceptación	Referencia
Estabilidad	No haya degradación visual del analito	42
LD	-	-
LC	-	-
Ámbito	80 % al 120 % de la concentración esperada	32,41,43
Linealidad	R > 0,998	32,42
	% CV de la curva de calibración dada por el software < 5 %	32,45
	Valor relativo de la desviación estándar del proceso (V_{XO}) < 5 %	
	Ausencia de tendencia en los residuales	32,42
Especificidad	No se crucen los ámbitos de las sustancias cercanas al analito	42
Precisión intermedia	%CV < 3 %	32,42
Repetibilidad	%CV < 2 %	32,42
Exactitud*	Porcentaje de recuperación 95 % – 105 %	44

*Rango respectivo para analitos en concentración entre 0,01 % y 0,1 % m/m.

3.7 Análisis estadístico de los resultados obtenidos

Una vez obtenidos los resultados de la evaluación de los parámetros de desempeño, se realizó el respectivo análisis de datos estadístico para la verificación del cumplimiento de los criterios de aceptación para cada uno de ellos, los cuales se muestran en cuadro 3.

Para la verificación de la estabilidad del analito se estudió la ausencia de degradación del mismo en la 2D-TLC realizada con la fase móvil propuesta para el método, esto por medio de una inspección visual de los resultados obtenidos.

En el caso del límite de detección y límite de cuantificación, como se mencionó anteriormente, se determinó la relación de la desviación estándar de los residuales entre el valor de la pendiente de la curva de calibración medida en la secuencia “Metodo_CBD_20230515_Placa Especificidad”. Dicha relación se multiplicó por un factor de 3,3 para el LD y un factor de 10 para el LC según lo descrito por el ICH en la guía de validación.

Definido el ámbito esperado del analito (167 ng a 1333 ng), se realizaron los experimentos de linealidad donde se incluyera el ± 20 % de cantidad esperada (133 ng a 1600

ng), para lo cual, la curva de calibración utilizada durante la implementación del método contempló el rango de 115,4 ng a 1730,7 ng.

Para el parámetro de desempeño de la linealidad, se estudiaron los valores del coeficiente de correlación (R), el coeficiente de variación de la curva de calibración dado por el equipo en cada prueba, la ausencia de una tendencia al graficar los residuales y el cálculo del valor relativo de la desviación estándar del proceso (V_{XO}), dichos valores fueron calculados con base en los resultados obtenidos de las curvas de calibración medidas para el análisis de las muestras comerciales.

En la evaluación de la especificidad, se determinó el R_F promedio con su respectivo valor de desviación estándar del analito y de las sustancias cercanas ajenas al ensayo, con el objetivo de verificar que el ámbito de la respuesta de la referencia ($R_F \pm DE\ CBD$) no se cruce con los ámbitos de las respuestas de los “contaminantes”. Para esta prueba se definieron las “sustancias ajenas al ensayo cercanas al analito” como las señales detectadas en un rango de $\pm 25\%$ del R_F de la referencia, ya que en las guías de validación consultadas no se define dicho parámetro.

Para la precisión intermedia, se determinó el coeficiente de variación para los resultados obtenidos del análisis de muestras comerciales en días distintos. De la misma forma, para la evaluación de la precisión como repetibilidad, con los resultados obtenidos, se determinó el coeficiente de variación para cada nivel evaluado.

Por su parte, para el parámetro de desempeño de exactitud, se tomaron las cantidades del analito en cada nivel de enriquecimiento y la cantidad del analito en la muestra sin enriquecer para determinar el porcentaje de recuperación respectivo.

Con los valores adquiridos durante la dilución gravimétrica de los materiales de referencia para la elaboración de las soluciones de trabajo, se determinó las incertidumbres de estas con base en las recomendaciones del documento “*Guía CG 4 EURACHEM / CITAC Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas*” y el manual “*Química Analítica Experimental*” utilizado en los laboratorios de química analítica de la Universidad Nacional de Costa Rica.^{46,47} Con base en la literatura ya mencionada, se elaboró un diagrama de causa y efecto (diagrama de Ishikawa) con las principales contribuciones a la incertidumbre de la concentración de las soluciones de trabajo, dicho diagrama se muestra en el anexo 2.

3.8 Elaboración de plantillas de referencia para la elaboración de informes con base en los estándares planteados por la ECA para uso del LIB

Para la confección de la plantilla de informes finales de validación del método propuesto (véase anexo 3), se tomaron como base algunas de las directrices estipuladas por el ECA en ECA-MC-C18 “*CRITERIOS PARA EVALUACIÓN Y ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS BAJO LA NORMA INTE-ISO/IEC 17025:2017*”, para lo cual se toma como referencia la información solicitada en el requisito 7.2.2.4 de la norma.⁴⁸

De la misma forma, con el objetivo de generar informes de resultados por parte del LIB hacia clientes que deseen adquirir el servicio de análisis del contenido de CBD en aceites comerciales, se elaboró una plantilla con base en el apartado 7.8.2 *Requisitos comunes para los Informes (ensayo, calibración o muestreo)* de la norma INTE-ISO/IEC 17025:2017, dicho machote puede consultarse en el anexo 4, al final de este documento.⁴⁹

3.9 Análisis de muestras comerciales

Con la finalidad de evaluar el desempeño de la metodología implementada frente a los posibles aceites comerciales enriquecidos con extracto de cáñamo a los cuales esta podría ser sometida, de forma preliminar, se realizó un pequeño estudio de mercado para determinar cuáles presentaciones, formulaciones, y potencias en términos de miligramos de CBD eran los más comunes. Por lo tanto, se realizó la visita a diez farmacias y diez macrobióticas localizadas en el centro de las provincias de Heredia y Alajuela, así como la consulta de páginas web que ofrecen la venta de este tipo de productos, donde la formulación más común fue la mezcla del extracto de cáñamo con aceite triglicéridos de cadena media de coco (TCM) en potencias dentro del rango de 250 – 8000 mg de CBD. Con lo cual, se determinó el tipo de matriz de interés y el rango de la cantidad esperada del analito, a su vez se adquirió una muestra que se encontraba conformada por varios tipos de aceites, donde su análisis se realizó con el objetivo de evaluar de forma preliminar la posible influencia de otros tipos de aceites al TCM sobre el compuesto de interés.

La información de las muestras comerciales adquiridas se muestra en el cuadro 12 localizado en el apartado 4.2 de la sección de resultados y discusión, las cuales fueron compradas con base el precio de las mismas y los fondos disponibles, con lo que las muestras con potencias superiores a los 4000 mg de CBD no pudieron ser adquiridas.

Ahora bien, obtenidas las diluciones de las muestras comerciales, estas se analizaron en el sistema HPTLC según la metodología descrita en la sección “*Procedimiento y condiciones de trabajo durante el análisis de muestras y estándares*”, obteniendo entre seis y ocho mediciones para cada muestra comercial durante la ejecución de las pruebas de especificidad y de caracterización de extractos.

Con base en los resultados de la determinación de la concentración de CBD en las muestras comerciales analizadas, al igual que para las soluciones de trabajo, se determinó la incertidumbre combinada expandida del promedio con un factor de cobertura $k = 2$ al resultado contemplando las principales fuentes de contribución, las cuales se muestran en el respectivo diagrama de Ishikawa en el anexo 5. Cabe destacar que para esta determinación se añadieron factores adicionales relacionados a los errores sistemáticos y aleatorios del análisis, para lo cual además de la literatura descrita al final del apartado 3.7 de este documento, se tomaron como guía las recomendaciones emitidas por *European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical Laboratories (EUROLAB)* en el documento “*Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation*”.⁵⁰

3.10 Sistematización de los análisis realizados a las cinco muestras comerciales de aceites comerciales utilizando la plantilla generada

Elaborada la plantilla de referencia para la emisión de informes de resultados, se tomaron los resultados obtenidos con sus respectivas incertidumbres y se realizaron los informes respectivos para cada una de las muestras comerciales analizadas, esto con la finalidad de sistematizar los hallazgos realizados durante el proceso de análisis. En el anexo 6, se muestra uno de los informes elaborados.

3.11 Recomendación de controles de calidad para la verificación periódica del método analítico

Con base en el desarrollo del método analítico implementado, así como la aplicación de este en muestras comerciales, se definieron una serie de pautas y directrices para la comprobación periódica de la metodología propuesta, donde por medio del estudio de una serie de parámetros de desempeño y los resultados obtenidos de la evaluación de los mismos, se logre establecer si el método funciona adecuadamente posterior al proceso de

implementación del método. En el anexo 7 de este documento, se adjunta el protocolo elaborado para la verificación del método.

Para la confección de esta guía se tomó como base las recomendaciones de parámetros de desempeño a evaluar durante la verificación de métodos químicos cuantitativos descritos por UNODC en el manual “*Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*” y por *Food and Drug Administration (FDA)* en el documento “*ORA Lab Manual Vol. II - Methods, Method Verification and Validation (ORALAB.5.4.5)*”.^{51,52}

3.12 Diseño del material didáctico y de apoyo empleado para impartir el taller de formación profesional

Con la finalidad de compartir los hallazgos del método implementado, así como la demostración práctica del mismo, se impartió una capacitación bimodal teórica-práctica a estudiantes de las carreras de Bachillerato en Ingeniería en Bioprocesos Industriales, Licenciatura en Química Industrial y personal docente de la Universidad Nacional de Costa Rica, relacionados al Laboratorio de Investigación en Biorrefinería (LIB), el Laboratorio de Fitoquímica (LAFIT), el Laboratorio de Productos Naturales y Ensayos Biológicos (LAPRONEB) y el Laboratorio de Análisis y Servicios Químicos (LASEQ). Por lo tanto, se elaboraron una serie de materiales didácticos para desarrollar de forma pedagógica las actividades de formación profesional.

Primeramente, se elaboró un programa del taller en el cual se mostraba la información del taller, objetivos de la actividad, contenidos del taller y referencias bibliográficas pertinentes a material de consulta valioso al momento de trabajar con la técnica HPTLC (véase anexo 8). De la misma forma, se preparó una presentación PowerPoint con los fundamentos teóricos de la técnica, videos sobre el funcionamiento de cada uno de los módulos del sistema, algunos resultados obtenidos durante la implementación de la metodología, esto junto con una serie de cuidados y recomendaciones a tener en consideración durante el uso del HPTLC-CAMAG, la cual puede ser consultada en el anexo 9. Finalmente, con el objetivo de recopilar la información abarcada durante el taller teórico-práctico y ponerla a disposición de los participantes, se confeccionó una unidad didáctica con capturas de pantalla del paso por paso sobre la manipulación del software, visualización y

evaluación de los resultados obtenidos, soluciones a posibles errores que pueden presentar los módulos, así como la preparación de las muestras comerciales, fase móvil y agente derivatizante utilizados (véase anexo 10).

3.13 Un taller de capacitación impartido de forma presencial, en modalidad teórico práctico a estudiantes y personal de la Escuela de Química.

Inicialmente se realizó una presentación virtual sobre el equipo utilizado, metodología, parámetros de desempeño evaluados, resultados obtenidos y recomendaciones. Dicha presentación virtual fue impartida por medio de la plataforma de Microsoft Teams, la cual fue grabada con la finalidad de que posteriormente pueda ser compartida con estudiantes y profesores que se encuentren interesados en el uso de la técnica.

Seguidamente, se procedió a formar dos grupos de cinco participantes cada uno para la demostración práctica del método analizando muestras comerciales, una curva de calibración, blancos de matriz y blancos de disolventes. Cabe destacar que, durante la ejecución de la metodología, se explicó de forma detallada la correcta manipulación de cada uno de los módulos que conforman el sistema HPTLC-CAMAG, esto con la finalidad de propiciar un uso adecuado del mismo.

Con el propósito de conocer la opinión de los participantes del taller teórico práctico sobre la actividad, así como identificar oportunidades de mejora para futuras actividades de la misma índole, se elaboró un formulario de Google Forms el cual fue compartido por medio de la plataforma Microsoft Teams.

En el anexo 11 al final de este documento, se muestra evidencia fotográfica sobre la ejecución de dichas actividades. De la misma forma, en el anexo 12 se adjunta las preguntas del formulario anteriormente mencionado junto con las respectivas respuestas emitidas por los participantes del taller.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de los parámetros de desempeño durante la implementación de la metodología analítica.

Como se describió en el apartado metodológico de este documento, durante la implementación de la técnica analítica para la determinación de CBD por HPTLC, se evaluaron un total de nueve parámetros de desempeño, en el cuadro 4, se muestran los resultados obtenidos para cada uno de estos. Por su parte, en las siguientes secciones se procederá a discutir los principales hallazgos relacionados a cada uno de los parámetros evaluados.

Cuadro 4. Comparación de los criterios de aceptación definidos para cada parámetro de desempeño evaluado contra los resultados obtenidos durante la implementación del método.

Parámetro evaluado	Criterio de aceptación	Resultado obtenido durante la implementación del método.
Estabilidad	No haya degradación visual del analito	No se observó degradación visual del analito
LD	-	22 ng
LC	-	68 ng
Ámbito	80 % al 120 % de la concentración esperada	115,4 ng - 1730,7 ng (69 % al 130 % de la concentración esperada)
Linealidad	R > 0,998	0,99989 - 0,99996
	%CV de la curva de calibración < 5 %	0,52 % - 1,1 %
	Valor relativo de la desviación estándar del proceso (V_{XO}) < 5 %	0,74 % - 1,2 %
	Ausencia de tendencia en los residuales	Los residuales presentan un comportamiento aleatorio en torno a cero.
Especificidad	No se crucen los ámbitos de las sustancias cercanas al analito	No se cruzan los $R_F \pm DE$ de las referencias y las sustancias cercanas al analito
Precisión intermedia	%CV < 3 %	0,90 % - 1,6 %
Repetibilidad	%CV < 2 %	0,32 % (Concentración baja)
		0,45 % (Concentración media)
		0,13 % (Concentración alta)
Exactitud	Porcentaje de recuperación 95 % – 105 %	Concentración baja = 101 %
		Concentración media = 101 %
		Concentración alta = 99 %

Los datos desglosados que fueron obtenidos durante el estudio de los parámetros de desempeño, así como el respectivo análisis de los mismos, puede ser consultado en el siguiente enlace que contiene las hojas de cálculo pertinentes al informe de análisis estadístico: <https://agd.una.ac.cr/share/s/2puhZKuOQOe-BugzqyhLeQ>

4.1.1 Estabilidad

Inicialmente, como un prerrequisito de validación se estudió la estabilidad del analito en disolución y en el tipo placas utilizadas durante el análisis por HPTLC, para la cual se realizó un prueba 2D-TLC con una placa de TLC 10 cm x 10 cm con una fase estacionaria de sílica gel 60 F₂₅₄ muy similar en tamaño de partícula y de poro a la utilizada en las placas de HPTLC 20 cm x 10 cm con el mismo tipo de soporte. Como se muestra en la figura 5.b), se realizó la siembra de la referencia de CBD en las ubicaciones 1, 2, 3, y se procedió a desarrollar la placa en ambas direcciones (eje Y la primera, eje X la segunda) con la fase móvil p-xileno:n-hexano:dietilamina (XHDa) 25:10:1. El CBD no es visible a 366 nm, para lo cual, con el objetivo de detectar posibles degradaciones del analito, se procedió a derivatizar la placa con una solución de Fast Blue B salt, el cual es un agente derivatizante específico para cannabinoides formando complejos coloreados visibles a 366 nm y luz blanca. En las secciones b), c) y d) de la figura 5, se indica por medio de cuadros color rojo las señales pertinentes al CBD, en color morado el aceite TCM del material del MR#A el cual avanza con el frente de disolvente y en color negro posiblemente un excedente del analito sembrado que avanzó con el frente de disolvente.

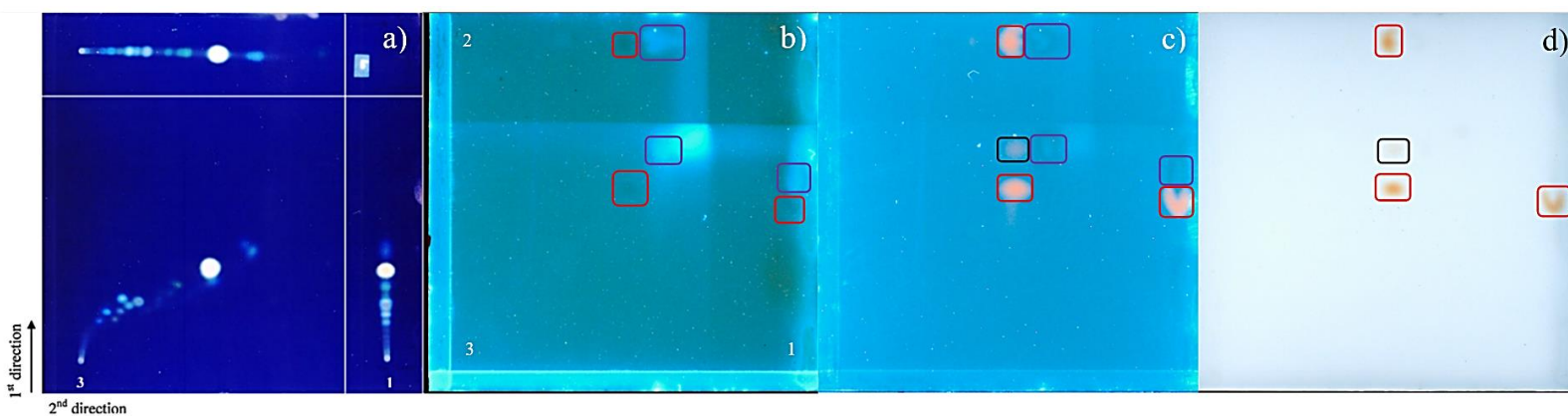


Figura 5. Comparación de fotografías adquiridas durante la evaluación del parámetro de estabilidad con la 2D TLC. a) ejemplo de degradación de analito,⁴² b) placa desarrollada visualizada a 366 nm, c) placa derivatizada visualizada a 366nm, d) placa derivatizada visualizada bajo luz blanca.

Por su parte en la sección a) de la figura 5, se muestra un ejemplo de una 2D-TLC en la cual si se presentó una degradación del analito, lo cual se denota debido a que los componentes de la muestra en la siembra 3, la cual al desarrollar la placa en las direcciones de los ejes X y Y corre en dirección perpendicular, se genera una dispersión no lineal de los

mismos. Por lo tanto, debido a que no se observaron señales adicionales a la del CBD mediante la inspección visual de las fotografías obtenidas, se establece que el analito es estable en la placa y en disolución, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, ya que se ha observado que las disoluciones de los cannabinoides son estables por 12 meses si estas se almacenan a temperaturas menores a 5 °C en condiciones de oscuridad, lo cual se realizó en el presente estudio.⁵³

4.1.2 Límite de detección y límite de cuantificación

Los parámetros de desempeño del límite de detección y límite de cuantificación se determinaron con base en las recomendaciones del ICH en su guía de validación, para lo cual, fueron establecidos por medio de la relación de la desviación estándar de los residuales entre el valor de la pendiente de la curva de calibración multiplicada por un factor de 3,3 para el LD y un factor de 10 para el LC. Se utilizaron los resultados obtenidos de la primera prueba de especificidad, de la cual se obtuvo una pendiente de 9,94E-06 AU/ng y se calculó una desviación estándar de los residuales (S_y) de 6,77E-05 AU, con lo cual se estableció un LD de 22 ng y un LC de 68 ng. De la misma forma, la guía de validación del ICH recomienda analizar de forma experimental con la metodología en estudio, cantidades del analito cercanas al valor del límite de detección cuando este es determinado por medio de cálculos, para lo cual, se realizó un experimento con dicho objetivo.

Se preparó una disolución de trabajo de 11,6 ng/ μ L de CBD y se sembraron por duplicado volúmenes entre 1 μ L - 8 μ L, abarcando desde 11,6 ng hasta 92,8 ng, esto junto con dos réplicas de un blanco de matriz elaborado por medio de una dilución de una alícuota de aceite TCM (aceite principal utilizado en la formulación de las muestras comerciales analizadas, véase cuadro 12) en metanol. En la figura 6, se muestran una sobreposición de los cromatogramas obtenidos a 210 nm para el blanco de matriz, 11,6 ng y 23,2 ng del analito, donde se observa que a concentraciones cercanas a 22 ng (23,2 ng), el software del equipo logra diferenciar la señal del analito respecto al ruido y que a su vez, a concentraciones menores a 22 ng (11,6 ng) el equipo no logra realizar dicha diferencia, al igual que lo hace con un blanco de matriz.

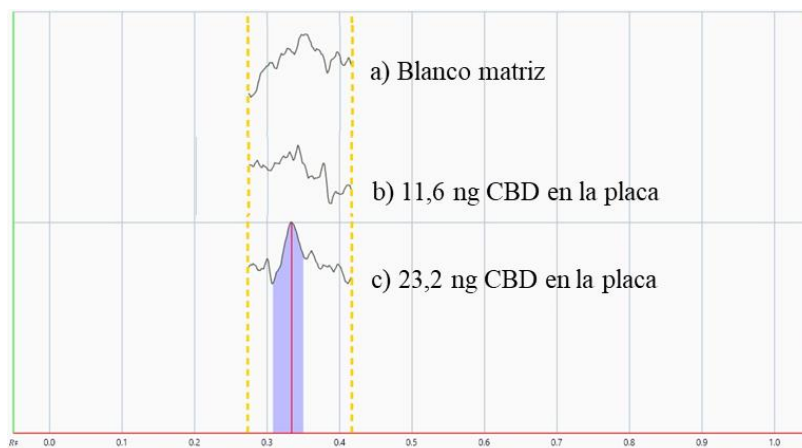


Figura 6. Comparación de cromatogramas obtenidos a 210 nm durante la verificación del límite de detección.

4.1.3 **Ámbito**

Para la evaluación del ámbito de la metodología implementada, se tomó como referencia la recomendación del ICH de evaluar un rango de concentraciones donde el procedimiento analítico proporciona un grado aceptable de linealidad, exactitud y precisión para el análisis de productos terminados, donde se recomienda abarcar al menos un $\pm 20\%$ de la concentración esperada. Conociendo los valores del LD y el LC, la potencia de los posibles productos comerciales a los cuales podría ser sometida la metodología analítica para su futuro uso previsto y la necesidad de un adecuado pretratamiento de la muestra, se establecieron una serie de factores de dilución con base en los miligramos de CBD del producto, definiendo así las cantidades esperadas del analito, véase cuadro 5.

Cuadro 5. Determinación del ámbito de trabajo con base en la cantidad esperada del analito.

Rango según cantidad de miligramos (mg) de CBD descritos en la etiqueta del producto	Factor de dilución recomendado	Cantidad del analito esperada en la placa (ng)*	Cantidad del analito esperada en la placa $\pm 20\%$ (ng)	Rango de la curva de calibración (ng)	Rango de la concentración esperada abarcada en la curva de calibración (%)
[250 - 1500[50	167 - 800			
[1500 - 3000[100	500 - 1000	133 - 1600	115 - 1731	69 - 130
[3000 - 8000]	200	583 - 1333			

*Cantidades esperadas con base en una siembra de 1 μ L de las muestras diluidas.

Con la finalidad de determinar el límite superior del ámbito de trabajo, se desarrolló una prueba utilizando una disolución de la referencia de 1147,8 ng/μL con la cual se realizaron 15 siembras del analito en cantidades entre 1492 ng y 5280 ng, donde como se muestra en la figura 7, en cantidades superiores a 1836 ng (señal del track 2), la señal del analito obtenida en el cromatograma, comienza a presentar deformaciones perdiendo la forma gaussiana del mismo resultando, en las siembras de mayor cantidad de CBD, en el desdoblamiento de la señal. El fenómeno anteriormente mencionado ocurre debido a que la cantidad del analito supera la capacidad de la fase estacionaria de retener el mismo, ocasionando que el excedente avance con la fase móvil durante el desarrollo de la placa generando el ensanchamiento de la señal obtenida, por lo tanto, se decidió trabajar en cantidades menores a los 1836 ng.³²

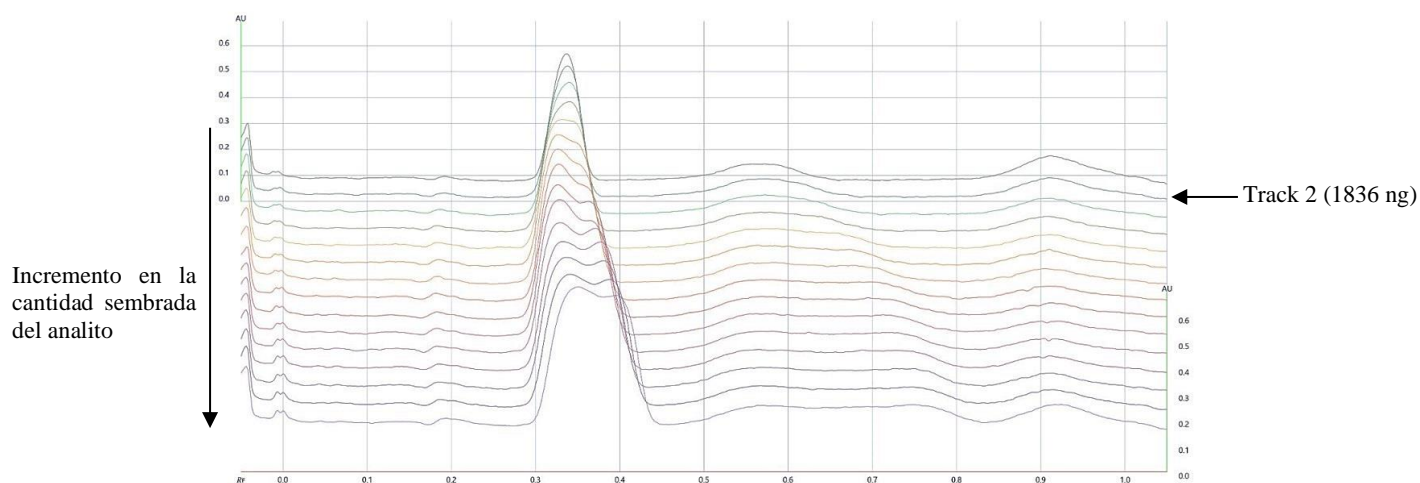


Figura 7. Comparación de cromatogramas obtenidos a 210 nm durante la evaluación del límite superior del ámbito de trabajo.

Posteriormente con base en los respectivos estudios de los parámetros de linealidad, precisión y exactitud, se definió el rango de concentraciones de la curva de calibración en el cual se obtiene un desempeño aceptable, denotando que efectivamente, se abarca al menos un $\pm 20\%$ de la cantidad esperada del analito, como se muestra en el cuadro 5.

4.1.4 Linealidad

El estudio de la linealidad de la metodología propuesta se basó en la evaluación de la respuesta obtenida de una serie de cinco puntos de cantidades diferentes del analito, para lo cual, se preparó una disolución de trabajo de $115,4 \pm 6,5$ ng/μL del MR#A. Conociendo el

valor del LC (66 ng), el límite superior del ámbito de trabajo (1836 ng) y la recomendación del grupo asesor del proyecto de utilizar volúmenes de siembra enteros sin decimales, se definió la curva de calibración empleando 1, 5, 8, 12 y 15 μL de la disolución de trabajo, obteniendo un rango de masas del analito de 115,4 ng a 1731 ng. Al realizar análisis cuantitativos utilizando el software del sistema HPTLC (visionCATS), durante la evaluación de los resultados se debe seleccionar el modelo de regresión (lineal, polinomial o Michaelis-Menten) y el modo de integración (área o altura), para lo cual, en el presente estudio se seleccionó el modelo de regresión lineal-2 y la integración por medio del área, esto debido al comportamiento de la respuesta obtenida por parte de la referencia y a la literatura consultada.

Con el objetivo de determinar la relación lineal entre la absorbancia generada por el CBD y la cantidad del mismo, se estudiaron cuatro parámetros con los resultados de las curvas de calibración utilizadas durante el análisis de las muestras comerciales de los aceites enriquecidos con extractos de cáñamo, en el cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos.

Cuadro 6. Resultados obtenidos durante la evaluación de la linealidad del método.

Curva de calibración	Coeficiente de correlación		Pendiente (AU/ng)	Intercepto (AU)	CV CAMAG (%)	V _{xo} (%)	Tendencia de los residuales
	R	R ²					
1	0,9999	0,9999	1,23E-03	1,30E-05	0,64	0,90	No
2	0,9999	0,9998	7,69E-06	1,39E-05	1,14	1,17	No
3	1,0000	0,9999	9,94E-06	1,92E-03	0,52	0,74	No
4	0,9999	0,9998	9,26E-04	1,23E-05	1,03	1,24	No
5	0,9999	0,9999	8,26E-04	1,12E-05	0,67	0,96	No
Promedio	0,9999	0,9998	5,99E-04	3,95E-04	0,80	1,00	No

Primeramente, se estudió el coeficiente de correlación, el cual en todos los casos se determinaron valores $R \geq 0,9999$ demostrando de forma preliminar el alto grado de linealidad del método. Según la literatura, la evaluación de la linealidad únicamente con base en el valor de R, es una práctica ambigua, con lo cual, se recomienda calcular la desviación estándar relativa del proceso (V_{xo}), véase las ecuaciones 1 y 2, donde se recomienda que dicho valor no exceda el 5%. El tercer criterio evaluado durante el estudio de la linealidad fue un

parámetro desarrollado por CAMAG llamado desviación estándar residual del punto estándar o coeficiente de variación de la función de calibración, utilizado para expresar el ajuste de la curva de calibración para HPTLC por medio del uso de su software, donde cuanto menor sea el valor, más cerca están los puntos de la curva. Dicho valor lo determina el equipo durante el proceso de la evaluación de los resultados (véase la figura 9 del anexo 10). Finalmente, para cada curva de calibración se graficaron los residuales contra la cantidad del analito, los cuales, al presentar un comportamiento aleatorio alrededor de la variable independiente, se correlaciona con el comportamiento lineal de las regresiones y, las magnitudes pequeñas de los residuales denotan la elevada precisión del método.⁵⁴ En la figura 8 se muestra un ejemplo de las curvas de calibración obtenidas con su respectivo diagrama de dispersión de los residuales.

$$(1) S_{XO} = \frac{S_y}{b} \quad (2) V_{XO} = \frac{S_{XO}}{\bar{X}} \times 100 \%$$

Ecuación 1 y 2. Fórmula de la desviación estándar relativa del proceso (V_{XO}).³²

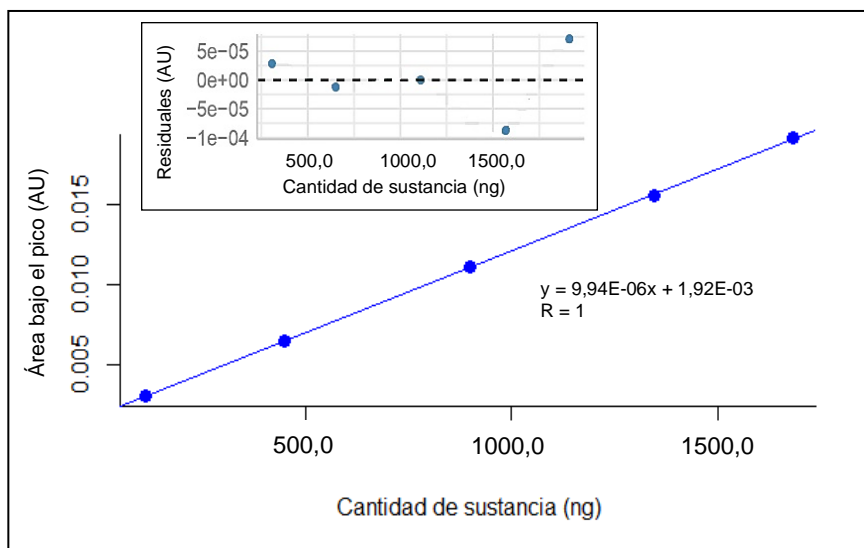


Figura 8. Ejemplo de una de las curvas de calibración obtenidas con su respectivo diagrama de dispersión de los residuales. Ilustración elaborada con el software RStudio.

4.1.5 Especificidad

Obtenidos los cromatogramas crudos (sin integración manual) adquiridos a 210 nm para las siembras de las muestras y las referencias, se extrajeron los datos de los factores de retención de todas las señales detectadas por el equipo, donde las señales ajenas a las asignadas como analito por comparación a la referencia fueron clasificadas en dos grupos.

Primeramente, si presentaron valores de R_F máximo entre 0,2656 - 0,3542 se agruparon como sustancias ajenas al ensayo cercanas a la referencia en - 25 %, por otra parte, a valores entre 0,3542 - 0,4428 se clasificaron como sustancias ajenas al ensayo cercanas a la referencia en + 25 %. Obtenidos los tres grupos de datos, para cada uno se determinó el valor promedio del R_F y la desviación estándar, para determinar el ámbito de R_F promedio \pm DE respectivo y de esta forma, realizar la verificación de que dichos rangos no se crucen, donde con base en los datos que se muestra en el cuadro 7, se demuestra la especificidad del método.

Cuadro 7. Resultados obtenidos durante la evaluación de la especificidad del método.

Determinación	R_F sustancias ajenas al ensayo cercanas a la referencia en - 25 %	R_F de la referencia	R_F sustancias ajenas al ensayo cercanas a la referencia en + 25 %
Promedio	0,280	0,3542	0,429
Desviación estándar	0,009	0,0062	0,018
Ámbito R_F promedio \pm DE	0,271-0,289	0,3480-0,3604	0,411-0,447

4.1.6 Precisión intermedia y repetibilidad

La precisión intermedia de la metodología implementada se evaluó por medio del estudio de los resultados obtenidos para tres muestras comerciales que, durante la determinación de las cantidades de CBD contenidas en las mismas, se realizaron ocho mediciones de cada una, las cuales fueron recopiladas durante cuatro días distintos. Por otra parte, la repetibilidad se evaluó analizando por triplicado en una sola placa cantidades del analito a tres niveles dentro del rango de cuantificación, para lo cual se prepararon tres disoluciones del MR#B obteniendo $117,2 \pm 6,6$ ng/ μ L para el nivel bajo, 442 ± 16 ng/ μ L para el nivel medio y 708 ± 26 ng/ μ L para el nivel alto. Para cada replica se depositaron 2 μ L de la disolución respectiva, generando las cantidades del analito que se muestran en el cuadro 8.

Con los resultados obtenidos de la evaluación de la precisión de la metodología como precisión intermedia y repetibilidad, se calcularon los valores % CV, véase cuadro 8, donde al comparar dichos valores con los criterios de aceptación definidos de %CV < 3 % para

precisión intermedia y %CV < 2 % para repetibilidad, se demuestra el alto grado de precisión de la técnica.

Cuadro 8. Resultados obtenidos durante la evaluación de precisión del método como precisión intermedia y repetibilidad.

Parámetro de desempeño	Nivel evaluado dentro del ámbito de trabajo	Cantidad de analito teórica depositada sobre la placa (ng)	Cantidad de analito promedio detectada en la placa \pm DE (ng)	%CV (%)
Precisión intermedia	-	-	Muestra 2 (873,9 \pm 7,7)	0,90
	-	-	Muestra 3 (982,6 \pm 9,8)	1,0
	-	-	Muestra 4 (1005 \pm 17)	1,6
Repetibilidad	Bajo	354,3	368,2 \pm 1,2	0,32
	Medio	885,2	912,2 \pm 4,1	0,45
	Alto	1416,4	1451,3 \pm 1,9	0,13

4.1.7 Exactitud

El parámetro de desempeño de la exactitud se evaluó como los porcentajes de recuperación del analito en réplicas de una muestra comercial enriquecida a tres niveles dentro del rango de cuantificación. Los enriquecimientos se llevaron a cabo por medio de la aspersión de la cantidad respectiva de la referencia sobre siembras de la muestra comercial (overspot), para lo cual se emplearon las disoluciones de trabajo utilizadas durante la evaluación de la repetibilidad. Con lo cual, en una misma placa se depositaron por triplicado muestras enriquecidas para cada nivel evaluado (bajo, medio y alto), una réplica de la muestra comercial sin enriquecer y los respectivos cinco puntos de la curva de calibración. En el cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos para cada nivel de enriquecimiento donde, al obtener porcentajes de recuperación promedio entre 99 % y 101 % en los niveles evaluados, se demuestra la exactitud del método.

Cuadro 9. Resultados obtenidos durante la evaluación de la exactitud del método.

Cantidad de analito detectado en la muestra sin enriquecer (ng)	Cantidad de enriquecimiento (ng)	Cantidad teórica total del analito en la placa (ng)	Cantidad de analito detectada (ng)	Porcentaje de recuperación (%)	% CV (%)	
247,3	354,3	601,6	608,7	101,18	0,53	
			600,8	99,87		
			605,3	100,61		
	Promedio ± DE			604,9 ± 3,2	100,55 ± 0,54	
	885,2	1132,5		1150,0	101,54	0,22
				1144,0	101,01	
				1146,0	101,19	
	Promedio ± DE			1146,7 ± 2,5	101,25 ± 0,22	
	1416	1664		1669	100,32	0,72
				1640	98,58	
				1655	99,48	
	Promedio ± DE			1655 ± 12	99,46 ± 0,71	

4.1.8 Comparación de los resultados obtenidos contra otras metodologías de análisis de cannabinoides por HPTLC reportadas en la literatura

Obtenidos los resultados de la evaluación de los parámetros de desempeño, se procedió a buscar en la literatura otras metodologías implementadas para el análisis de cannabinoides por HPTLC, con lo cual, se elaboró el cuadro 10 utilizando los valores reportados por los respectivos autores para algunos de los parámetros de desempeño estudiados.

Cuadro 10. Comparación de resultados obtenidos en procesos de validación de metodologías para el análisis de cannabinoides por HPTLC.

Analito	Matriz analizada en el estudio	Rango de cuantificación	Linealidad (R²)	Repetibilidad (% CV)	Precisión intermedia (% CV)	Referencia
Δ⁹-THC, CBN	Material vegetal cannabis	50 - 500 ng	0,9968 - 0,9979	0,70 - 4,9	2,3 - 4,6	29
CBD	Material vegetal cannabis	0,50 - 9,5 μg	0,9996	> 5,7	> 6,0	55
CBD	Productos derivados de cannabis, material vegetal	25 - 500 ng	0,9943	-	-	31
CP 47,497	Material vegetal cannabis	50 - 350 μg	0,9963	3,3	16,6	56
CBD	Aceites enriquecidos con extracto de cáñamo	115 - 1731 ng	0,9998	0,13 - 0,45	0,9 - 1,6	Presente estudio

Ahora bien, en términos generales se puede observar que el método propuesto presenta un mayor ámbito de análisis de cuantificación respecto a las demás metodologías, así como una mejor linealidad considerando los valores de R² y en términos de precisión de la técnica evaluada como repetibilidad y precisión intermedia, en el presente estudio se obtuvieron valores menores % CV.

En el cuadro 10, se muestran los resultados del compuesto identificado como CP 47,497 el cual es un cannabinoide sintético del grupo de los ciclohexilfenoles, el cual según estudios, presenta una farmacología similar al Δ⁹-THC, pero muestra una potencia casi veintiocho veces mayor respecto a este último.⁵⁶ Gran variedad de estos cannabinoides sintéticos son utilizados para adulterar productos derivados de las plantas del género

Cannabis o para imitar los efectos de los mismos al ser incorporados en mezclas herbales, por lo que la presencia de este tipo de compuestos debe tenerse en consideración durante el monitoreo y análisis de productos derivados de cáñamo a nivel nacional.⁵⁶

4.2 Documentos y procedimientos elaborados durante la pasantía

Con el objetivo de establecer registros sobre los hallazgos realizados y procedimientos establecidos, se desarrollaron una serie de documentos, a los cuales se les asignó un código interno con base en los estándares del LIB, en el cuadro 11 se muestran los nombres de los documentos confeccionados con su respectivo número de anexo en este documento para que puedan ser visualizados.

Primeramente, se elaboró una plantilla con los requerimientos del ECA para la elaboración de informes de validación, para de esta forma, generar un registro sobre la metodología implementada para la evaluación de los parámetros de desempeño establecidos, los criterios de aceptación definidos, así como los resultados obtenidos del proceso de implementación de la metodología de análisis.

Seguidamente, para estandarizar el procedimiento de pretratamiento de muestras comerciales utilizado, se diseñó una guía para la ejecución exitosa de la etapa previa al análisis instrumental, esto contemplando una serie de recomendaciones establecidas con base en los diferentes tipos de muestras comerciales que podrían ser sometidas a la metodología implementada.

Por otra parte, una vez culminado el presente proyecto, se desea poder ofrecer el servicio de análisis de CBD en aceites comerciales enriquecidos con extracto de cáñamo, para lo cual, se diseñó una plantilla para la elaboración de informes de resultados con base en los requisitos descritos en la norma INTE-ISO/IEC 17025:2017 y de esta forma, posterior al análisis de las muestras, enviar al cliente del servicio los resultados obtenidos con el respectivo consecutivo de análisis como registro del laboratorio. Adjunto a este documento en el anexo 6 se muestra un informe de resultados elaborado para una de las muestras comerciales analizadas, donde la imagen respectiva al producto comercial, se encuentra difuminada por temas de confidencialidad.

De la misma forma, con base en las recomendaciones de entes internacionales (UNODC y FDA) se diseñó un protocolo para la verificación periódica de la metodología implementada, con los respectivos diseños de los experimentos necesarios para la evaluación

de cada uno de los parámetros de desempeño requeridos. Además, se adjunta una lista de consideraciones adicionales que pueden ayudar a detectar de forma preventiva anomalías en el comportamiento de la metodología analítica.

Cuadro 11. Documentación confeccionada durante el desarrollo de la pasantía para el cumplimiento de los objetivos planteados.

Código asignado	Nombre del documento	Objetivo específico relacionado	Anexo
LIB.SG.P001	Plantilla para la elaboración de informes de validación del análisis de CBD por HPTLC	1	<u>3</u>
LIB.SG.P002	Procedimiento de pretratamiento de muestras de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo para su análisis en HPTLC.	2	<u>1</u>
LIB.SG.P003	Plantilla informe de resultados LIB análisis de CBD en aceites comerciales enriquecidos con extracto de cáñamo	1	<u>4</u>
UNA-EQ-LIB-2024-002	Informe de Resultados LIB KMA MC B	2	<u>6</u>
LIB.SG.P004	Protocolo de verificación del método de análisis de CBD por HPTLC.	3	<u>7</u>

4.3 Análisis de muestras comerciales

Como se mencionó en el apartado 3.9 de este documento, la metodología analítica implementada fue sometida al uso previsto de esta al analizar muestras comerciales adquiridas en el mercado nacional, con lo cual, como se observa en el cuadro 12, fueron ensayadas en su mayoría muestras conformadas por extracto de cáñamo y aceite TCM, donde en total se abarcó un rango de muestras con potencias teóricas entre 250 – 4000 mg CBD

Cuadro 12. Información de las muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo analizadas.

Número de muestra	Codificación asignada durante los análisis	País de fabricación	Origen del extracto de cáñamo utilizado	Cantidad de CBD descrita en la etiqueta (mg)	Concentración teórica de CBD (mg/mL)*	Ingredientes
1	MC#A	Costa Rica	No disponible	250	8,8	Extracto de Cáñamo (Cannabis sativa ssp, semillas), mezcla de aceites.
2	MC#B	Costa Rica	Oregón, Estados Unidos	300	10	Aceite de cáñamo (CBD amplio espectro), aceite TCM
3	MC#C	Costa Rica	Oregón, Estados Unidos	800	28	Destilado de cáñamo (CBD de amplio espectro) y aceite TCM
4	MC#D	Costa Rica	Colorado, Estados Unidos	1500	50	Destilado de cáñamo (CBD de amplio espectro) y aceite TCM
5	MC#E	Costa Rica	No disponible	4000 4673**	133 156	Extracto de flor y hoja de cáñamo rico en CBD, CBG y CBN, aceite TCM

*Concentraciones descritas por los fabricantes en las páginas de internet sobre los productos.

**Producto posee un certificado de análisis por un laboratorio acreditado ISO/IEC 17025:2017.

4.3.1 Cuantificación de la concentración de CBD en aceites enriquecidos con extracto de cáñamo

La cuantificación del contenido de CBD en las muestras comerciales pretratadas, se realiza con base en los cromatogramas integrados obtenidos a 210 nm al interpolar la señal obtenida en términos de área respecto a la curva de calibración que se siembra en la misma placa que las muestras como se observa en la figura 9.

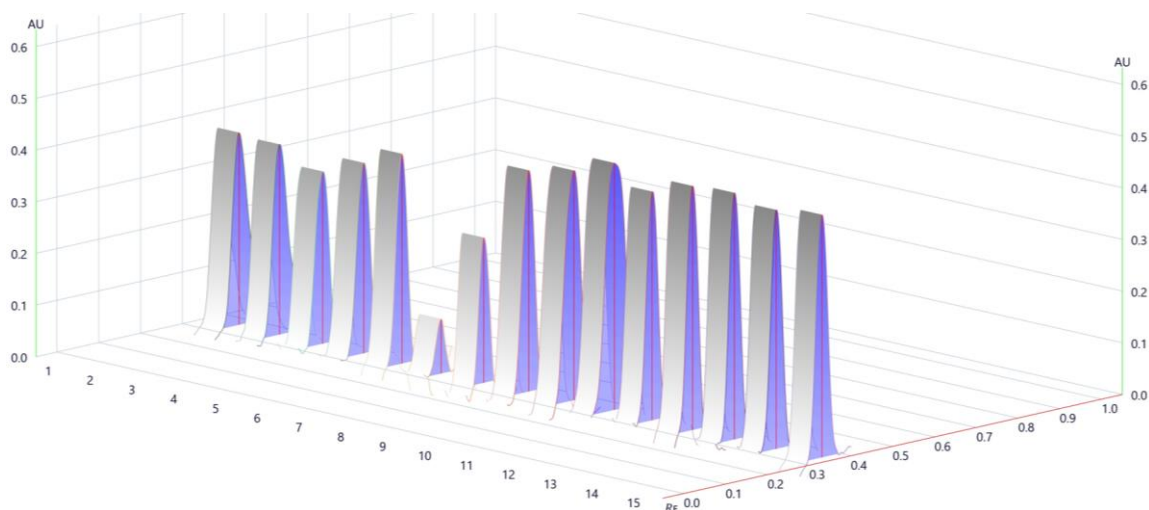


Figura 9. Cromatogramas integrados obtenidos a 210 nm durante la cuantificación del contenido de CBD en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo. Muestras comerciales (1-5, 11-15), curva de calibración (6-10).

Para cada una de las muestras comerciales se realizaron entre seis y ocho mediciones, a las cuales se les aplicó el respectivo factor de concentración determinado durante la dilución gravimétrica, de la misma forma, contemplando lo descrito en el anexo 5 y utilizando las directrices denotadas en el manual “*Química Analítica Experimental*” de la Universidad Nacional de Costa Rica, se determinó la concentración promedio en las muestras comerciales con su respectiva incertidumbre, las cuales se muestran en el cuadro 13.

Cuadro 13. Resultados obtenidos en la determinación de la concentración de CBD en muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo.

Muestra comercial	1	2	3	4	5
Valor teórico (mg/mL)	8,8	10	28	50	156
Concentración promedio \pm U* (mg/mL)	12,25 \pm 0,99	8,86 \pm 0,73	25,0 \pm 2,2	51,2 \pm 4,4	161 \pm 15
Relación valor experimental/etiquetado (%)	139,2	88,6	89,3	102,5	103,4
% CV en la determinación	0,45	0,88	0,99	1,6	2,3

* La incertidumbre expandida reportada, se declara como la incertidumbre estándar de la medición multiplicada por un factor de cobertura $k = 2$ que corresponde a una probabilidad de cobertura aproximadamente del 95 %.

Ahora bien, con los datos determinados experimentalmente y los valores teóricos reportados por los fabricantes, se procedió a calcular en que porcentaje los valores obtenidos abarcan las concentraciones descritas en las etiquetas de los respectivos productos comerciales, para lo cual el valor experimental se divide entre el valor teórico y se multiplica por un factor de cien, véase cuadro 13. Lo anterior se realizó con la finalidad de comparar dichos valores contra el parámetro establecido por la *U.S. Pharmacopeia (USP)* para el etiquetado de productos farmacéuticos derivados de extractos de plantas del género *Cannabis*, entre los cuales incluyen los aceites comestibles.⁵⁷ Por lo tanto, en el artículo “*Cannabis Inflorescence for Medical Purposes: USP Considerations for Quality Attributes*” se establece que el etiquetado de este tipo de productos debe abarcar entre un 90 % y un 110 % de la concentración real de CBD en el aceite.⁵⁷ En el cuadro 14, se muestran los resultados obtenidos en los últimos dos años en estudios sobre las diferencias detectadas en los etiquetados respecto a las determinaciones experimentales en aceites con CBD, esto en distintos países del mundo, donde con base en dicha diferencia los productos han sido clasificados en tres tipos de etiquetado. Para cada uno de los estudios reportados, se denota la cantidad de muestras en cada categoría con el respectivo porcentaje que estas abarcan respecto al total de muestras ensayadas.

Cuadro 14. Comparación de resultados respecto al estado del etiquetado de aceites con CBD obtenidos en distintos países en los últimos dos años.

País	Cantidad de muestras analizadas	Categoría de etiquetado			Año publicación	Referencia
		Sobretiquetado (< 90 %)	Etiquetado apropiadamente (90 % - 110 %)	Sub-etiquetado (> 110 %)		
Estados Unidos*	11	4 (36,4 %)	4 (36,4 %)	1 (9,1 %)	2022	58
Reino Unido	29	13 (44,8 %)	11 (37,9 %)	5 (17,2 %)	2022	59
Hungría	12	1 (8,3 %)	6 (50 %)	5 (41,7 %)	2023	60
Estados Unidos	49	9 (18,4 %)	14 (28,6 %)	26 (53 %)	2024	61
Costa Rica	10**	7 (70 %)	2 (20 %)	1 (10 %)	2024	Presente estudio

* En el estudio dos de las muestras analizadas no reportaban la potencia del producto.

** Total de muestras analizadas durante la pasantía y sesiones de capacitación impartidas.

Como se observa en el cuadro 14, en la mayoría de los casos, la cantidad de muestras que se encontraban etiquetadas adecuadamente fue < 40 % de la población analizada, donde en algunos casos se reportaron muestras que contenían un 0 % respecto al valor del etiquetado y por el otro lado, a su vez fueron reportados resultados de 155 %.

Por lo tanto, la presencia de este tipo de discrepancias, pueden ocasionar que los consumidores estén recibiendo menor cantidad de CBD de la que están pagando o por el escenario contrario, que estén ingiriendo concentraciones mayores a las que estos desean o se encuentran informados, donde a su vez este último escenario podría incurrir en pérdidas económicas para los productores.

Lo descrito en el cuadro 14, junto a lo anteriormente mencionado, puede sugerir la carencia o deficiencia en los controles de calidad brindados por las empresas que fabrican este tipo de productos, lo que a su vez evidencia una problemática actual a nivel nacional e internacional.

4.4 Taller de capacitación teórico-práctico sobre la metodología implementada

El día 14 de febrero del presente año, se llevó a cabo la capacitación virtual sobre el método analítico establecido y el uso adecuado del sistema HPTLC para lo cual, como se muestra en el cuadro 15, previamente se elaboraron una serie de materiales de apoyo para el desarrollo de la misma (anexos 8 - 10). De la misma forma, el 15 de febrero de 2024 en las instalaciones del LIDETEC se impartieron las sesiones presenciales atinentes a la demostración práctica del método. En el anexo 11 de este documento, se muestran una serie de imágenes pertinentes a la evidencia de que se impartió el taller de capacitación bimodal.

Cuadro 15. Indicadores de logro relacionados al diseño y ejecución del taller de capacitación teórico-práctico sobre la metodología de análisis de CBD por HPTLC.

Indicador de logro	Anexo
Programa del taller de la capacitación teórica práctica sobre el uso del sistema HPTLC impartida.	8
Presentación PowerPoint utilizada durante la sesión teórica de la capacitación impartida sobre uso del sistema HPTLC.	9
Unidad académica elaborada con los contenidos de la capacitación teórica práctica sobre el uso del sistema HPTLC.	10
Evidencia fotográfica sobre la ejecución de la capacitación bimodal teórica práctica sobre el uso del sistema HPTLC.	11
Respuestas obtenidas por los participantes de la capacitación teórica práctica sobre el uso del sistema HPTLC al formulario de participación.	12

Por otra parte, contemplando la información suministrada por los participantes del taller mediante el formulario de participación (anexo 12) respecto a las expectativas de la actividad (pregunta 5) y la opinión de los participantes una vez concluido el taller (preguntas 6 y 9), se observa que efectivamente la capacitación fue de gran ayuda para los coparticipes y que pudieron aprender sobre el adecuado uso del equipo, además de considerar de gran ayuda los materiales de apoyo que se les fue suministrado (pregunta 7).

4.5 Pruebas y análisis adicionales realizados durante el desarrollo de la pasantía

Ahora bien, con el objetivo de demostrar la versatilidad de productos derivados de cáñamo que pueden ser analizados por la metodología implementada, así como la información adicional de los mismos que se puede obtener durante el análisis por HPTLC, se realizaron una serie de pruebas adicionales a las estipuladas en el anteproyecto, las cuales se describen a las siguientes secciones del presente documento.

4.5.1 Caracterización de los fitocannabinoides adicionales contenidos en los aceites enriquecidos con extracto de cáñamo analizados

Durante la cuantificación de la cantidad de CBD contenido en las muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo, posterior a la derivatización de las placas con Fast Blue B salt, se observaron señales adicionales a la respectiva del CBD. Por lo tanto, al contemplar que el material de referencia MR#A también contenía los cannabinoides CBN y CBG según el certificado de análisis, se procedió a realizar una prueba utilizando cantidades mayores de las muestras comerciales con la finalidad de caracterizar de forma cualitativa los otros fitocannabinoides en las mismas, obteniendo los resultados que se muestran en la figura 10.

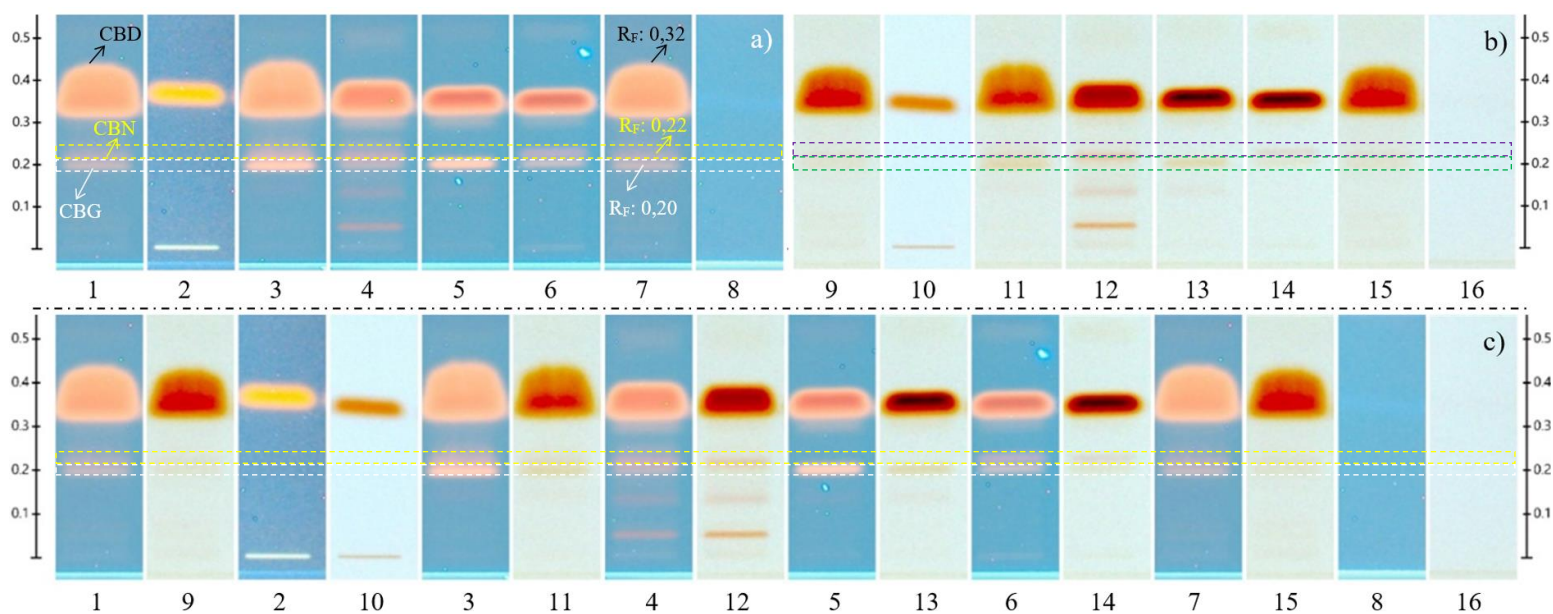


Figura 10. Caracterización de muestras comerciales analizadas. a) visualización de la placa derivatizada a 366 nm, b) visualización de la placa derivatizada bajo luz blanca, c) comparación de imágenes. Material de referencia de cannabinoides (1, 7, 9, 15), muestra 1 (2, 10), muestra 2 (3, 11), muestra 3 (4, 12), muestra 4 (5, 13), muestra 5 (6, 14), blanco de matriz (8, 16).

Con base en la coloración adquirida de las bandas posterior a la derivatización y el respectivo R_F de las señales en las muestras al ser comparadas con las pertinentes a las contenidas en la referencia, se establece de forma cualitativa la presencia de estos compuestos en las muestras comerciales. Lo anterior se respalda con base en lo reportado en el artículo base del proyecto y la nota de aplicación de CAMAG utilizada.^{31,40} Como se muestra en la figura 11, la muestra 3 y la muestra 5 contienen además de CBD, CBN y CBG, las muestras 2 y 4 adicionalmente solo contienen CBG y la muestra 1 no contiene ninguno de los cannabinoides adicionales mencionados.

Como se mencionó en el marco teórico de este documento, a los cannabinoides se les atribuyen una serie de efectos terapéuticos debido a su acción en el sistema endocannabinoide humano, por lo que la presencia adicional de estos fitocompuestos brinda un mayor atractivo comercial frente a los consumidores de estos productos.

Cuando se habla de productos derivados de cáñamo, principalmente se hace énfasis en tres categorías, los espectro completo (*full spectrum*, que contienen todos los fitocannabinoides del extracto incluyendo THC), los amplio espectro (*broad spectrum*, contempla todos los cannabinoides menos el THC) y los CBD puro o aislado (*CBD isolate*, solo contiene CBD).⁶¹ Al comparar los resultados obtenidos que se muestra en la figura 11 contra la información de cada muestra en el cuadro 12, se observa que efectivamente las muestras 2 – 4 cumplen con lo descrito de ser elaboradas con extractos de amplio espectro. Por otra parte, la muestra 1 en su etiqueta describe que se preparó con extracto de cáñamo, de lo cual, algunos consumidores podrían inferir que también posee algunos de los demás cannabinoides, lo cual contradice los resultados obtenidos en la figura 11, de la cual se puede deducir que la muestra 1 se podría categorizar como elaborada con CBD puro o aislado.

Con lo cual, el disponer de una metodología que permita confirmar de forma cualitativa dicha información que usualmente se encuentra denotada en la etiqueta de los productos, puede ser de gran ayuda al momento de monitorear la mercancía que se encuentra disponible en el mercado nacional, lo que además puede brindar mayor seguridad y confianza hacia los consumidores sobre los productos que están adquiriendo. De la misma forma, la determinación de algunos de los cannabinoides adicionales al CBD contenidos en las muestras comerciales, se podría ofrecer como un servicio adicional a la respectiva cuantificación de CBD en las mismas.

4.5.2 Análisis de líquidos con CBD para vapeadores y cigarros electrónicos

Se realizaron una serie de análisis de líquidos para vapeadores y cigarros electrónicos (e-liquids), para lo cual, tres muestras fueron donadas al proyecto para ser analizadas, en el cuadro 16 se muestra la información de los e-liquids estudiados. El proceso de pretratamiento de las muestras se basó en una doble dilución gravimétrica con metanol para obtener disoluciones de concentración teórica de 0,25 mg/mL para la muestra 8 y 0,5 mg/mL para las muestras 6 y 7, las cuales fueron sembradas en la placa para obtener cantidades teóricas de 1000 ng.

Cuadro 16. Información de las muestras de líquidos para vapeadores y cigarros electrónicos (e-liquids) analizados.

Número de muestra	Codificación asignada durante los análisis	País de origen	Ingredientes	Cantidad de CBD descrita en la etiqueta (mg)	Concentración teórica del analito (mg/mL)	Concentración experimental del analito (mg/mL)
6	MC#F	California, Estados Unidos	Cristales de CBD aislados, propilenglicol, glicerina vegetal, saborizantes	500	16,7	3,5
7	MC#G	Colorado, Estados Unidos	Extracto de cáñamo de amplio espectro, propilenglicol, glicerina vegetal, saborizantes	500	16,7	16,0
8	MC#H	California, Estados Unidos	Cristales de CBD aislados, propilenglicol, glicerina vegetal, saborizantes	250	8,3	5,2

La primera prueba realizada consistió en la cuantificación de la cantidad de CBD en las muestras diluidas, de la cual se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 16, no obstante, al revelar la placa con el agente derivatizante Fast Blue B salt, se observó la presencia de una señal considerable ajena a los cannabinoides estudiados hasta ese momento

(CBD, CBN y CBG). La señal anómala detectada presentaba un R_F y una tonalidad del complejo coloreado atinente a los datos reportados para Δ^9 -THC en la literatura, con lo cual de forma preliminar se le asignó dicha identidad.

Posteriormente, se realizó una segunda prueba con el objetivo de confirmar la identidad de la señal anómala, donde gracias al préstamo de un material de referencia (-)-trans- Δ^9 -THC 1,0 mg/mL en metanol por parte del LASEQ, se preparó una disolución de trabajo de la referencia de 53,6 ng/ μ L. El segundo experimento como se muestra en la figura 11.a), consistió en la siembra de 10 μ L de las muestras diluidas 6 y 7 (4, 5), 20 μ L de la muestra 8 diluida (6), 577 ng de la referencia de CBD (2), 536 ng de la referencia de Δ^9 -THC (2), un overspot de referencias utilizando las mismas cantidades (1) y un blanco de disolvente (7).

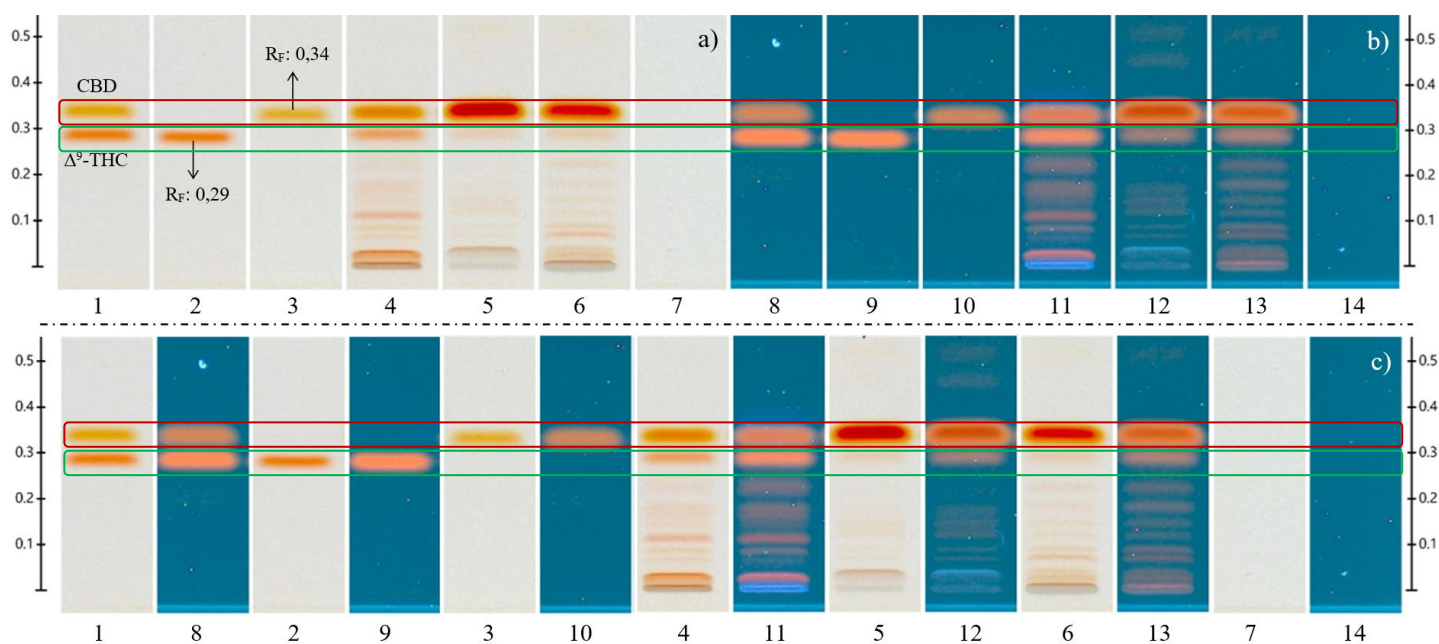


Figura 11. Análisis de líquidos para vapeadores y cigarrillos electrónicos (e-liquids) con CBD. a) visualización de la placa derivatizada bajo luz blanca, b) visualización de la placa derivatizada a 366nm, c) comparación de imágenes. Overspot de referencias (1, 8), referencia Δ^9 -THC (2, 9), referencia CBD (3, 10), muestra 6 (4, 11), muestra 7 (5, 12), muestra 8 (6, 13), blanco de disolvente metanol (8, 16).

Por lo tanto, al comparar los resultados obtenidos para la referencia Δ^9 -THC y los pertinentes a las muestras comerciales, se confirma de forma cualitativa la identidad de la señal anómala en las muestras como Δ^9 -THC. Como resultado adicional del análisis de los

cannabinoides en los e-liquids, en la figura 12 se muestra una sección del cromatograma obtenido del overspot de las referencias, el cual evidencia de forma preliminar la buena separación de ambos analitos con la metodología implementada.

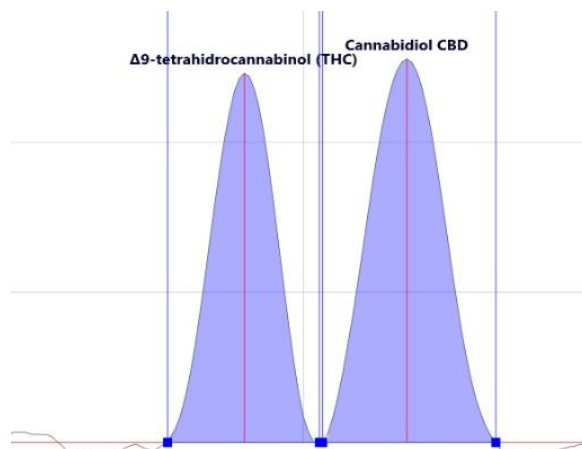


Figura 12. Cromatograma integrado obtenido a 210 nm para un overspot de referencias de Δ^9 -THC y CBD.

Ahora bien, cabe destacar que las muestras comerciales que fueron donadas al proyecto, al momento de ser analizadas ya se había excedido la fecha de vencimiento descrita en las etiquetas de los productos, lo cual hace surgir el cuestionamiento de si la cantidad de Δ^9 -THC encontrada durante el estudio se debe a la posible degradación del CBD o si ya formaba parte de la formulación original del producto. Con base en la información suministrada, las muestras de los e-liquids desde su adquisición hasta el momento de ser donadas, estuvieron almacenadas en condiciones de temperatura ambiente y protegidas de la incidencia de luz.

La degradación del CBD en productos comerciales es un tema que se ha estudiado en la literatura por medio de estudios de degradación térmica, oxidativa, fotoquímica, estudios in vivo e in vitro, exposición a soluciones ácidas y alcalinas, así como a prolongados tiempos de almacenamiento, donde con base en el tipo de tratamiento aplicado, son los metabolitos de degradación obtenidos.⁶² En el caso de los e-liquids, el estudio de la posible degradación de CBD a Δ^9 -THC ha sido abarcado por diversas publicaciones debido al creciente mercado de consumidores de este tipo de productos, donde se ha demostrado que efectivamente se puede generar dicho fenómeno a temperaturas elevadas (170 – 500 °C) y en condiciones acidas (< 40 mg/L ácidos fuertes) como lo muestra el mecanismo de conversión denotado en la figura 13.^{53,63} De la misma forma, por medio de estudios de cinéticas de degradación para

el CBD y el Δ^9 -THC, se han reportado rangos de pH de estabilidad óptima de 4 – 6 y 4 – 12 respectivamente, donde al momento de analizar las muestras descritas en el cuadro 16, se determinó el pH de las mismas utilizando tiras de papel pH universal obteniendo valores de pH entre 4 – 5.⁶⁴

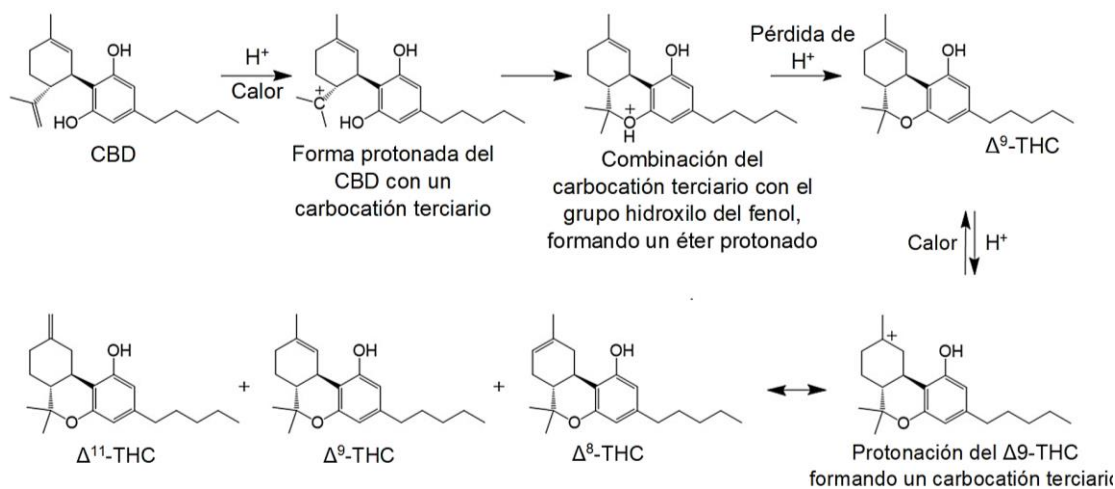


Figura 13. Mecanismo de conversión del CBD en isómeros de THC, adaptado de la literatura consultada al español. Elaborada mediante el software ChemDraw.⁶⁵

En los estudios del efecto de prolongados tiempo de almacenamiento (1 – 4 años) en condiciones ambientales (luz a 22°C) sobre la concentración de CBD, Δ^9 -THC y CBN en productos derivados de cannabinoides (marihuana, hashish y aceites de cannabis) se observó una disminución en la cantidad de CBD y Δ^9 -THC a través del tiempo, no obstante, la concentración de CBN fue incrementando, con lo cual, bajo esas condiciones en ese tipo de matrices, los autores concluyeron que el CBD se degrada a CBN antes que a Δ^9 -THC.⁶⁶⁻⁶⁸

En otro estudio se evaluó la degradación del CBD en formulaciones de e-liquids (propilenglicol:glicerina) durante el almacenamiento por cuatro semanas bajo condiciones ambientales (25 °C, 60 % humedad relativa, luz de día) y condiciones de estrés (40 °C, 75 % humedad relativa, oscuridad), donde no se observó degradación a Δ^9 -THC.⁶⁹ Por otra parte, los principales productos de degradación detectados fueron cannabielsoína (CBE), CBD-hidroxiquinona (HU-331), hidrox-CBE, hidrox-CBD y dihidrox-CBD, los cuales a su vez, podrían ser la identidad de las demás bandas observadas para los e-liquids en la figura 12.⁶⁹

Por lo tanto, con base en la información anteriormente suministrada se establece que es poco probable la degradación de CBD a Δ^9 -THC en las condiciones de almacenamiento y pH mencionadas para las muestras analizadas, con lo cual, la detección del cannabinoide

psicotrópico se puede deber a la presencia del mismo durante la formulación de los productos originales o posibles adulteraciones de los mismos.

4.5.3 Análisis de muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo elaboradas en Costa Rica

Finalizada la parte experimental del estudio, un funcionario relacionado a la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Costa Rica se acercó a los integrantes del proyecto para consultar la factibilidad de poder analizar la cantidad de CBD contenida en cinco muestras de aceites comerciales enriquecidos con extracto de cáñamo, donde el proceso de obtención del extracto de cáñamo a partir del material vegetal y la formulación del producto fue realizado por el fabricante dentro del territorio nacional. Seguidamente, se acordó en recibir las muestras y analizarlas por la metodología implementada como un servicio de apoyo a la empresa costarricense. Cabe destacar que, de las cinco muestras suministradas, solamente cuatro se encontraban en condiciones adecuadas para ser analizadas, en el cuadro 17 se muestra la información de los productos estudiados.

Cuadro 17. Información de las muestras comerciales de aceites formulados con extracto de cáñamo aislado por una empresa costarricense dentro del territorio nacional.

Número de muestra	Codificación asignada durante los análisis	Cantidad de CBD descrita en la etiqueta (mg)	Concentración teórica de CBD (mg/mL)*	Ingredientes
9	MC#I			Extracto de cáñamo y aceite de maní .
10	MC#J	900	30	Extracto de cáñamo y aceite de oliva.
11	MC#K			Extracto de cáñamo y aceite de maní.
12	MC#M			Extracto de cáñamo y aceite de oliva.

*Para determinar una concentración masa/volumen teórica, se dividió los miligramos de CBD entre el volumen de la muestra (30 mL), según lo descrito por el fabricante en la etiqueta del producto.

Se prepararon diluciones gravimétricas de las muestras con acetato de etilo para obtener disoluciones de concentraciones teóricas cercanas a 300 ng/ μ L, las cuales al depositar 3 μ L de cada una en la placa, se tuvieran cantidades del analito cercanas a un punto medio de la curva de calibración (900 ng).

El diseño del experimento se basó en los cinco puntos de la curva de calibración, dos siembras de cada muestra diluida (punto A de 3 μ L para la cuantificación de la cantidad de CBD y un punto B de 5 μ L para la caracterización de los otros posibles cannabinoides contenidos en la muestra), un overspot de las referencias de CBD (577 ng) y Δ^9 -THC (536 ng), una siembra de la muestra 5 (como referencia de los cannabinoides CBG y CBN) y un blanco de disolvente (acetato de etilo puro). Inicialmente debido al costo de las placas de HPTLC, se decidió realizar una prueba exploratoria utilizando placas de TLC 20 cm x 10 cm donde, al obtener los cromatogramas respectivos durante la etapa de cuantificación, se encontró que el equipo no detectó ninguna señal del analito en las muestras comerciales.

Como se puede observar en la figura 14, en los tracks pertinentes a las muestras comerciales no presenta ninguna señal, al punto de visualizarse de forma muy similar al blanco de disolvente. Cabe destacar, que el patrón de manchas aleatorias que observa en la imagen se debe a un error generado durante la aspersion del agente derivatizante Fast Blue B por parte del *Derivatizer*, con lo cual dichas manchas no son atinentes a alguna señal de algún compuesto químico presente en las muestras comerciales.

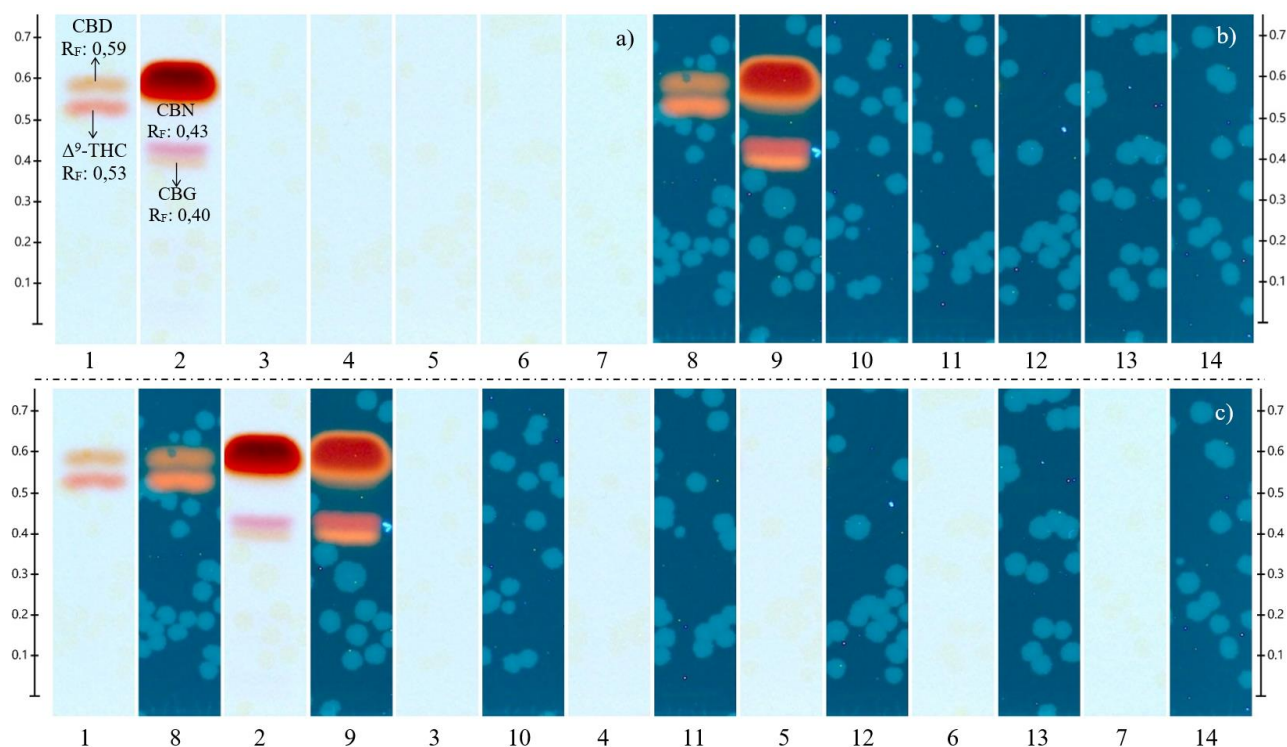


Figura 14. Análisis de muestras comerciales elaboradas en Costa Rica. a) visualización de la placa derivatizada bajo luz blanca, b) visualización de la placa derivatizada a 366 nm, c) comparación de imágenes. Overspot de referencias CBD + Δ^9 -THC (1, 8), muestra 5 referencia de CBG y CBN (2, 9), muestra 9 (3, 10), muestra 10 (4, 11), muestra 11 (5, 12), muestra 12 (6, 13), blanco de disolvente acetato de etilo (7, 14).

Por lo tanto, contemplando el límite de detección de la técnica (22 ng), el volumen de muestra sembrado (3 μ L) y el factor de dilución aproximado de cien empleado, la concentración de CBD en las muestras elaboradas en el territorio nacional se reportan como < 0,73 mg/mL, el cual al ser comparado contra el valor teórico de 30 mg/mL, se obtiene que el valor experimental abarca < 2,4 % de la concentración denotada en la etiqueta del producto.

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos durante la evaluación de los parámetros de desempeño estudiados, en conjunto con el cumplimiento de los criterios de aceptación definidos para cada uno de estos, se establece que el método implementado presenta un comportamiento adecuado para la cuantificación de CBD en aceites enriquecidos con extracto de cáñamo por HPTLC.

Haciendo uso de la documentación y procedimientos elaborados relacionados a la técnica analítica establecida, se disponen con las herramientas necesarias para propiciar el uso y funcionamiento apropiado de la misma, así como poder ofrecer la venta del servicio a entes internos o externos a la Universidad Nacional de Costa Rica.

De forma preliminar, se denota un indicio de que en Costa Rica existe una problemática sobre la diferencia entre la cantidad de CBD descrita en el etiquetado del producto con respecto a la determinada de forma experimental, sugiriendo la carencia o deficiencia de controles de calidad por parte de las empresas que fabrican este tipo de productos, lo que a su vez concuerda con lo reportado por investigadores en distintos países del mundo en los últimos dos años. Con lo cual, se alienta a realizar el estudio y monitoreo a nivel nacional de la cantidad de CBD contenida en productos derivados de cáñamo, contemplando factores como un muestreo representativo que abarque distintos tipos de matrices, una adecuada cantidad de muestras, la adquisición de productos por medio de tiendas físicas y virtuales, entre otros.

Compartidos los hallazgos teóricos y prácticos obtenidos durante el desarrollo de este trabajo con estudiantes y personal de la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Costa Rica, se capacitó a los mismos en la correcta manipulación del sistema HPTLC-CAMAG, con lo cual podrán conformar parte de futuros proyectos de investigación o trabajos finales de graduación relacionados a la técnica analítica.

En el caso de los aceites formulados con extracto de cáñamo aislado a partir del material vegetal por el fabricante dentro del territorio nacional, los resultados obtenidos sugieren que el proceso de obtención del CBD y la formulación del producto no son adecuados, de lo cual podrían derivar oportunidades de mejora por medio de relaciones de cooperación y asesoría con profesionales de la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Costa Rica.

Por lo tanto, considerando la determinación de cantidades mayores, menores o nulas de CBD respecto a la declarada por los fabricantes, la presencia o carencia de otros fitocannabinoides según la clasificación de los productos, así como la detección de compuestos atinentes a posibles adulteraciones, se destaca la imperante necesidad de realizar un monitoreo de los productos comerciales derivados de cáñamo que son distribuidos a nivel nacional.

Se recomienda realizar estudios de robustez considerando la exposición del analito bajo condiciones de estrés, variaciones en la composición y tiempo previo de preparación de la fase móvil, distancia de desarrollo, formas, dimensiones y volúmenes de las siembras, lote de las placas, así como otros factores mencionados en la tabla 11.6 del libro “*HPTLC: High-Performance Thin-Layer Chromatography*”.^{32,43,44} Por su parte, se alienta investigar la respuesta de la técnica analítica frente a los parámetros de desempeño estudiados utilizando otros cannabinoides.

Con base en la experiencia adquirida durante la implementación de la metodología, se aconseja adecuar las condiciones estructurales del laboratorio para el desarrollo adecuado de los análisis. Con lo cual, se podría instalar una campana de extracción de gases sobre el módulo *Automatic Developing Chamber 2* para evitar la exposición prolongada a vapores pertinentes a las fases móviles utilizadas para desarrollar las placas. Por su parte, polarizar las ventanas del laboratorio para evitar interferencias generadas por la incidencia de luz durante las etapas de desarrollo y derivatización de las placas es recomendado.

La confección de un inventario de materiales y consumibles utilizados durante los análisis por HPTLC es ampliamente sugerido, así como la adquisición de accesorios de respaldo como lo puede ser un juego adicional de boquillas de derivatización, una cámara de desarrollo, jeringas del auto muestreador, entre otros. De la misma forma, se aconseja implementar una bitácora digital sobre el uso del HPTLC para registrar los análisis realizados, así como para dar trazabilidad de que el equipo está siendo utilizado por individuos capacitados.

CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Cascini, F.; Boschi, I. Chapter E1 - Tetrahydrocannabinol Concentration and Genetic Characterization of Cannabis. In *Handbook of Cannabis and Related Pathologies*; Preedy, V. R., Ed.; Academic Press: San Diego, **2017**; pp e1–e10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00003-X>.
- (2) McPartland, J. M. Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis Cannabinoid Res* **2018**, *3* (1), 203–212. <https://doi.org/10.1089/CAN.2018.0039/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE4.JPG>.
- (3) Yi Lim, X. I.; Yew Chin Tan, T.; Hajar Muhd Rosli, S.; Nor Farhan Sa, M.; Sirdar Ali, S.; Fazlin Syed Mohamed, A. Cannabis Sativa Subsp. Sativa's Pharmacological Properties and Health Effects: A Scoping Review of Current Evidence. **2021**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245471>.
- (4) Ulloa, E. *Caracterización de Alternativas de Comercialización Internacional Del Cáñamo Industrial*; Costa Rica, 2020. <http://sistemas.procomer.go.cr/DocsSEM/DBF0ABD4-AA85-4064-A9F9-33F5997EF661.pdf> (Accesado el 16 de abril de 2022).
- (5) Vasantha Rupasinghe, H. P.; Davis, A.; Kumar, S. K.; Murray, B.; Zheljzkov, V. D. Molecules Industrial Hemp (Cannabis Sativa Subsp. Sativa) as an Emerging Source for Value-Added Functional Food Ingredients and Nutraceuticals. *Molecules* **2020**. **2020** <https://doi.org/10.3390/molecules25184078>.
- (6) *El cannabis medicinal y cáñamo agroindustrial es ya ley de la República – Presidencia de la República de Costa Rica*. <https://www.presidencia.go.cr/comunicados/2022/03/el-cannabis-medicinal-y-canamo-agroindustrial-es-ya-ley-de-la-republica/> (Accesado el 16 de abril de 2022).

- (7) Poder Ejecutivo. *Reglamento a La Ley N°10113, Ley Del Cannabis Para Uso Medicinal y Terapéutico y Del Cáñamo Para Uso Alimentario e Industrial, Reglamento Del Cáñamo Para Uso Alimentario e Industrial.*; <https://www.mag.go.cr/legislacion/2022/de-43689.pdf>: Costa Rica, **2022**; pp 1–33.
- (8) Poder Ejecutivo. *Reglamento a Ja Ley N° 1013, Ley Del Cannabis Para Uso Medicinal y Tcrapéutico y Del Cáñamo Para Uso Alimentario e Inclustrial, Reglamento Del Cannabis Para Uso Medicinal y Terapéutico*; <https://www.mag.go.cr/legislacion/2022/de-43724.pdf>: Costa Rica, **2022**; pp 1–68.
- (9) Xu, Z.; Deng, M. Cannabaceae. *Identification and Control of Common Weeds: Volume 2* **2017**, 119–124. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1157-7_20.
- (10) Thomas, B. F.; ElSohly, M. A. The Botany of Cannabis Sativa L. *The Analytical Chemistry of Cannabis* **2016**, 1–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804646-3.00001-1>.
- (11) Kinghorn, A. D.; Falk, H.; Gibbons, S.; Kobayashi, J. Phytocannabinoids; Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; *Springer International Publishing: Cham.* **2017**; 103. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9>.
- (12) Hartsel, J. A.; Eades, J.; Hickory, B.; Makriyannis, A. Cannabis Sativa and Hemp. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity* **2016**, 735–754. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X>.
- (13) Andre, C. M.; Hausman, J. F.; Guerriero, G. Cannabis Sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front Plant Sci* **2016**, 7 (FEB2016). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00019>.
- (14) Gülck, T.; Møller, B. L. Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends Plant Sci* **2020**, 25 (10), 985–1004. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2020.05.005>.

- (15) Citti, C.; Braghiroli, D.; Vandelli, M. A.; Cannazza, G. Pharmaceutical and Biomedical Analysis of Cannabinoids: A Critical Review. *J Pharm Biomed Anal* **2018**, *147*, 565–579. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.06.003>.
- (16) Small, E. Evolution and Classification of Cannabis Sativa (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *The Botanical Review* **2015**, *81* (3), 189–294. <https://doi.org/10.1007/s12229-015-9157-3>.
- (17) Glivar, T.; Eržen, J.; Kreft, S.; Zagožen, M.; Čerenak, A.; Čeh, B.; Tavčar Benković, E. Cannabinoid Content in Industrial Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Varieties Grown in Slovenia. *Ind Crops Prod* **2020**, *145*, 112082. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2019.112082>.
- (18) Maurya, N.; Velmurugan, B. K. Therapeutic Applications of Cannabinoids. *Chem Biol Interact* **2018**, *293*, 77–88. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2018.07.018>.
- (19) Nahtigal, I.; Blake, A.; Hand, A.; Florentinus-Mefailoski, A.; Hashemi, H.; Friedberg, J. The Pharmacological Properties of Cannabis. *Cannabis: Medical Aspects* **2016**, *9*, 481–491.
- (20) Kladar, N.; Čonić, B. S.; Božin, B.; Torović, L. European Hemp-Based Food Products – Health Concerning Cannabinoids Exposure Assessment. *Food Control* **2021**, *129*, 108233. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108233>.
- (21) Analakkattillam, S.; Langsi, V. K.; Hanrahan, J. P.; Moore, E. Comparative Study of Dissolution for Cannabidiol in EU and US Hemp Oil Products by HPLC. *J Pharm Sci* **2021**, *110* (8), 3091–3098. <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2021.03.028>.
- (22) Kitamura, M.; Kiba, Y.; Suzuki, R.; Tomida, N.; Uwaya, A.; Isami, F.; Deng, S. Cannabidiol Content and In Vitro Biological Activities of Commercial Cannabidiol Oils and Hemp Seed Oils. *Medicines* **2020**, *Vol. 7, Page 57* **2020**, *7* (9), 57. <https://doi.org/10.3390/MEDICINES7090057>.

- (23) Fiorini, D.; Scortichini, S.; Bonacucina, G.; Greco, N. G.; Mazzara, E.; Petrelli, R.; Torresi, J.; Maggi, F.; Cespi, M. Cannabidiol-Enriched Hemp Essential Oil Obtained by an Optimized Microwave-Assisted Extraction Using a Central Composite Design. *Ind Crops Prod* **2020**, *154*, 112688. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2020.112688>.
- (24) Dasgupta, A. Miscellaneous Issues: Paper Money Contaminated With Cocaine and Other Drugs, Cocaine Containing Herbal Teas, Passive Exposure to Marijuana, Ingestion of Hemp Oil, and Occupational Exposure to Controlled Substances. *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing* **2019**, 463–476. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815607-0.00032-0>.
- (25) Pourseyed Lazarjani, M.; Torres, S.; Hooker, T.; Fowlie, C.; Young, O.; Seyfoddin, A. Methods for Quantification of Cannabinoids: A Narrative Review. *Journal of Cannabis Research* **2020**, *2* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s42238-020-00040-2>.
- (26) Micalizzi, G.; Vento, F.; Alibrando, F.; Donnarumma, D.; Dugo, P.; Mondello, L. Cannabis Sativa L.: A Comprehensive Review on the Analytical Methodologies for Cannabinoids and Terpenes Characterization. *J Chromatogr A* **2021**, *1637*, 461864. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2020.461864>.
- (27) Hall, D. R.; Sinclair, J. S.; Bhuyan, D. J.; Khoo, C.; Li, C. G.; Sarris, J.; Low, M. Quality Control of Cannabis Inflorescence and Oil Products: Response Factors for the Cost-Efficient Determination of Ten Cannabinoids by HPLC. *Talanta Open* **2022**, *5*, 100112. <https://doi.org/10.1016/J.TALO.2022.100112>.
- (28) Nahar, L.; Onder, A.; Sarker, S. D. A Review on the Recent Advances in HPLC, UHPLC and UPLC Analyses of Naturally Occurring Cannabinoids (2010–2019). *Phytochemical Analysis* **2020**, *31* (4), 413–457. <https://doi.org/10.1002/PCA.2906>.
- (29) Fishedick, J. T.; Glas, R.; Hazekamp, A.; Verpoorte, R. A Qualitative and Quantitative HPTLC Densitometry Method for the Analysis of Cannabinoids

- in Cannabis Sativa L. *Phytochemical Analysis* **2009**, *20* (5), 421–426. <https://doi.org/10.1002/PCA.1143>.
- (30) Rashmin, P.; Mrunali, P.; Nitin, D.; Nidhi, D.; Bharat, P. HPTLC Method Development and Validation: Strategy to Minimize Methodological Failures. *J Food Drug Anal* **2020**, *20* (4), 20. <https://doi.org/10.6227/jfda.2012200408>.
- (31) Liu, Y.; Brettell, T. A.; Victoria, J.; Wood, M. R.; Staretz, M. E. High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) Analysis of Cannabinoids in Cannabis Extracts. *Forensic Chemistry* **2020**, *19*, 100249. <https://doi.org/10.1016/J.FORC.2020.100249>.
- (32) Srivastava, M. High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)* **2011**, 1–397. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14025-9/COVER>.
- (33) Sherma, J.; Rabel, F. Thin Layer Chromatography in the Analysis of Cannabis and Its Components and Synthetic Cannabinoids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2019**, *42* (19–20), 613–628. <https://doi.org/10.1080/10826076.2019.1663529>.
- (34) Citti, C.; Braghiroli, D.; Vandelli, M. A.; Cannazza, G. Pharmaceutical and Biomedical Analysis of Cannabinoids: A Critical Review. *J Pharm Biomed Anal* **2018**, *147*, 565–579. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.06.003>.
- (35) Shewiyo, D. H.; Kaale, E.; Risha, P. G.; Dejaegher, B.; Smeyers-Verbeke, J.; Heyden, Y. vander. HPTLC Methods to Assay Active Ingredients in Pharmaceutical Formulations: A Review of the Method Development and Validation Steps. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *66*, 11–23. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2012.03.034>.
- (36) Sherma, J. Review of HPTLC in Drug Analysis: 1996-2009. *J AOAC Int* **2010**, *93*, 754–764. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.3.754>.
- (37) Attimarad, M.; Mueen Ahmed, K. K.; Aldhubaib, B. E.; Harsha, S. High-Performance Thin Layer Chromatography: A Powerful Analytical Technique

- in Pharmaceutical Drug Discovery. *Pharm Methods* **2011**, 2 (2), 71–75.
<https://doi.org/10.4103/2229-4708.84436>.
- (38) Arruda Frommenwiler, D. Comprehensive High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) Fingerprinting in Quality Control of Herbal Drugs, Preparations and Products. *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)* **2020**.
- (39) Yang, Y.; Ju, Z.; Yang, Y.; Zhang, Y.; Yang, L.; Wang, Z. Phytochemical Analysis of Panax Species: A Review. *J Ginseng Res* **2021**, 45 (1), 1–21.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.12.009>.
- (40) CAMAG. *APPLICATION NOTE A-108.1. Identification and quantification of different cannabinoids in Cannabis sativa*. **2017**.
- (41) ICH. Committee for Medicinal Products for Human Use ICH Q2(R2) Guideline on Validation of Analytical Procedures. **2023**.
- (42) Renger, B.; Végh, Z.; Ferenczi-Fodor, K. Validation of Thin Layer and High Performance Thin Layer Chromatographic Methods. *J Chromatogr A* **2011**, 1218 (19), 2712–2721. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.01.059>.
- (43) Ferenczi-Fodor, K.; Végh, Z.; Nagy-Turák, A.; Renger, B.; Zeller, M. Validation and Quality Assurance of Planar Chromatographic Procedures in Pharmaceutical Analysis. *J AOAC Int* **2001**, 84 (4), 1265–1276.
<https://doi.org/10.1093/JAOAC/84.4.1265>.
- (44) Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* **2023**.
<https://doi.org/10.1093/9780197610145.005.006>.
- (45) Yuwono, M.; Indrayanto, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* **2005**, 32, 243–259.
[https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(05\)32009-0](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(05)32009-0).
- (46) EURACHEM/CITAC. Guía CG 4 EURACHEM / CITAC Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas.

https://www.citac.cc/QUAM2012_P1_ES.pdf (Accesado el 14 de abril de 2024)

- (47) Sánchez, V.; Valdés, J.; Coto, J.; Solís, E.; Fernández, J. F.; Mendelewicz, M. *Química Analítica Experimental*, Primera.; Editorial Universidad Nacional EUNA: Heredia, Campus Omar Dengo, **2016**.
- (48) Ente Costarricense de Acreditación (ECA). *ECA-MC-C18. CRITERIOS PARA EVALUACIÓN Y ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS BAJO LA NORMA INTE-ISO/IEC 17025:2017*; Costa Rica, **2023**.
- (49) INTECO. *INTE/ISO/IEC 17025:2017 Requisitos Generales Para La Competencia de Los Laboratorios de Ensayo y Calibración. Requisitos.* ; Costa Rica, **2017**.
- (50) EUROLAP. European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical Laboratories Measurement Uncertainty Revisited: Alternative Approaches to Uncertainty Evaluation. **2007**.
- (51) Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). *Directrices Para La Validación de Métodos Analíticos y La Calibración Del Equipo Utilizado Para El Análisis de Drogas Ilícitas En Materiales Incautados y Especímenes Biológicos*; Nueva York, **2010**.
- (52) FOOD AND DRUG ADMINISTRATION OFFICE OF REGULATORY AFFAIRS Quality. *ORA Lab Manual Vol. II - Methods, Method Verification and Validation (ORALAB.5.4.5)*; **2023**.
- (53) Franco, C.; Protti, S.; Porta, A.; Pollastro, F.; Profumo, A.; Mannucci, B.; Merli, D. Stability of Cannabidiol (CBD) in Solvents and Formulations: A GC–MS Approach. *Results Chem* **2022**, *4*, 100465. <https://doi.org/10.1016/J.RECHEM.2022.100465>.
- (54) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry Sixth Edition*, Sexta edición.; Pearson Education Limited: Harlow, **2010**.

- (55) Duffau, B. E.; Alcamán, K. Analysis of Three Main Cannabinoids in Seized Marijuana by Densitometric High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* **2019**, *32* (4), 343–346. <https://doi.org/10.1556/1006.2019.32.4.11/METRICS>.
- (56) Duffau, B.; Morales, D.; Quiñelem, L. Quantitative Analysis of Three Synthetic Cannabinoids by Densitometric High-Performance Thin-Layer Chromatography. **2023**, *36*, 433–438. <https://doi.org/10.1007/s00764-023-00282-9>.
- (57) Sarma, N. D.; Waye, A.; Elsohly, M. A.; Brown, P. N.; Elzinga, S.; Johnson, H. E.; Marles, R. J.; Melanson, J. E.; Russo, E.; Deyton, L.; Hudalla, C.; Vrdoljak, G. A.; Wurzer, J. H.; Khan, I. A.; Kim, N.-C.; Giancaspro, G. I. Cannabis Inflorescence for Medical Purposes: USP Considerations for Quality Attributes. *Cite This: J. Nat. Prod* **2020**, *2020*, 1334–1351. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01200>.
- (58) Miller, O. S.; Elder, E. J.; Jones, K. J.; Gidal, B. E. Analysis of Cannabidiol (CBD) and THC in Nonprescription Consumer Products: Implications for Patients and Practitioners. *Epilepsy & Behavior* **2022**, *127*, 108514. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2021.108514>.
- (59) Liebling, J. P.; Clarkson, N. J.; Gibbs, B. W.; Andrew, {; Yates, S.; Elizabeth O’sullivan, S. An Analysis of Over-the-Counter Cannabidiol Products in the United Kingdom. *Cannabis and Cannabinoid Research*. **2022**, 207 – 213, 33998849. <https://doi.org/10.1089/can.2019.0078>
- (60) Vida, R. G.; Strauss, L. V.; Bajtel, Á.; Kiss, T.; Csupor, D.; Fittler, A. Safety and Risks of CBD Oils Purchased Online: Unveiling Uncertain Quality and Vague Health Claims. *Front Pharmacol* **2023**, *14*, 1273540. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2023.1273540/BIBTEX>.
- (61) Gidal, B. E.; Vandrey, R.; Wallin, C.; Callan, S.; Sutton, A.; Saurer, T. B.; Triemstra, J. L.; Fröhlich, E.; Ramirez, C.; Leas, E. Product Labeling Accuracy and Contamination Analysis of Commercially Available Cannabidiol Product



- Samples. *Front Pharmacol* **2024**, *15*, 1335441. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2024.1335441>.
- (62) Golombek, P.; Müller, M.; Barthlott, I.; Sproll, C.; Lachenmeier, D. W. Conversion of Cannabidiol (CBD) into Psychotropic Cannabinoids Including Tetrahydrocannabinol (THC): A Controversy in the Scientific Literature. *Toxics* **2020**, *8* (2), 41. <https://doi.org/10.3390/TOXICS8020041>.
- (63) Czégény, Z.; Nagy, G.; Babinszki, B.; Bajtel, Á.; Sebestyén, Z.; Kiss, T.; Csupor-Löffler, B.; Tóth, B.; Csupor, D. CBD, a Precursor of THC in e-Cigarettes. *Scientific Reports* **2021**, *11*:1 **2021**, *11* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88389-z>.
- (64) Jaidee, W.; Siridechakorn, I.; Nessopa, S.; Wisuitiprot, V.; Chaiwangrach, N.; Ingkaninan, K.; Waranuch, N. Kinetics of CBD, Δ^9 -THC Degradation and Cannabinol Formation in Cannabis Resin at Various Temperature and PH Conditions. *Cannabis Cannabinoid Res* **2022**, *7* (4), 537–547. <https://doi.org/10.1089%2Fcan.2021.0004>
- (65) Grondin, R. A.; Ward, J. R. Conversion of Cannabidiol or Delta-9 Tetrahydrocannabinolic Acid to Delta-9 Tetrahydrocannabinol and Delta-8 Tetrahydrocannabinol in Nontoxic Heterogeneous Mixtures. WO 2021/086675 A2, October 12, 2021. <https://patentimages.storage.googleapis.com/5e/fa/4c/a87bd8868d51d3/WO2021086675A2.pdf> (Accesado el 31 de marzo de 2024).
- (66) Trofin, I.; Dabija, G.; Vaireanu, D.-I.; Laurentiu, F. Long - Term Storage and Cannabis Oil Stability. *Revista da Chimie* **2012**, *53*, 294.
- (67) Trofin, I.; Dabija, G.; Vaireanu, D.-I.; Laurentiu, F. The Influence of Long-Term Storage Conditions on the Stability of Cannabinoids Derived from Cannabis Resin. *Revista de Chimie* **2012**, *63*, 422–427.
- (68) Zamengo, L.; Bettin, C.; Badocco, D.; Di Marco, V.; Miolo, G.; Frison, G. The Role of Time and Storage Conditions on the Composition of Hashish and

Marijuana Samples: A Four-Year Study. *Forensic Sci Int* **2019**, 298, 131–137.
<https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2019.02.058>.

- (69) Schwarzenberg, A.; Carpenter, H.; Wright, C.; Bayazeid, O.; Brokl, M. Characterizing the Degradation of Cannabidiol in an E-Liquid Formulation. *Scientific Reports* 2022 12:1 **2022**, 12 (1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-23910-6>.

ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento de pretratamiento de muestras de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo para su análisis en HPTLC (LIB.SG.P002).

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P002	Página 1 de 3 Versión: 1.1

Procedimiento de pretratamiento de muestras de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo para su análisis en HPTLC.

Introducción



El presente documento tiene como finalidad brindar una serie de recomendaciones a tener en consideración al momento de realizar el pretratamiento de muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo para el análisis de la cantidad de cannabidiol (CBD) en las mismas por la técnica de HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography). Se toma como base el procedimiento de pretratamiento de muestras según el tipo de matriz de interés descrito en la nota de aplicación A108.1 emitida por CAMAG que tiene como título “*Identification and quantification of different cannabinoids in Cannabis sativa*”, al cual se le realizaron modificaciones según el comportamiento observado del mismo durante el desarrollo y validación de la metodología de análisis.

Procedimiento

El pretratamiento de los aceites enriquecidos con extracto de cáñamo se basa en una doble dilución gravimétrica de la muestra haciendo uso de disolventes de alta pureza (>99%), para lo cual a continuación se enlista los pasos necesarios para la ejecución del mismo:

1. Verifique que la balanza analítica se encuentre encendida al menos unos 30 minutos antes de su uso.
2. Preparar la cristalera limpia y seca necesaria para el procedimiento de dilución de la muestra tomando en consideración la cantidad de mg de CBD según la etiqueta del producto, para lo cual se recomienda considerar la información contenida en el cuadro 1 disponible en la sección de anexos al final de este documento.
3. Rotule de forma adecuada la cristalería respectiva para cada una de las muestras con el objetivo de evitar contaminaciones cruzadas o confusión sobre la identidad de las muestras durante el proceso.
4. Mida la masa del balón vacío asignado para la primera dilución de la muestra y anótelos en su bitácora en un cuadro similar al cuadro 2 que se encuentra disponible en la sección de anexos al final de este documento.
5. En un frasco o beaker pequeño de unos 5 mL limpio, seco y rotulado, añada entre 2 y 3 mL de la muestra. Posteriormente, haciendo uso de la pipeta respectiva para la

Laboratorio en Investigación en Biorrefinería (LIB): Tercer piso en el Edificio de Nuevos Procesos Industriales, Avenida Central 1, Heredia, 86-3000, Costa Rica
Número de contacto: 2277-3489
Correo de contacto: ana.carballo.arce@una.ac.cr


	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	 Página 2 de 3
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P002	Versión: 1.1

primera dilución, tome la alícuota del frasco/beaker y deposítela en el balón vacío previamente pesado, mida la masa pertinente y anótelas en su bitácora.

6. En un frasco o beaker de 25 mL limpio, seco y rotulado, añada aproximadamente 15 mL de metanol los cuales serán utilizados para completar el aforo del balón que contiene la alícuota de la muestra, para lo cual utilice una pipeta pasteur limpia y seca con gotero. Mida la masa del balón con la disolución y anótelas en su bitácora. Cabe destacar que algunas muestras comerciales utilizan como medio aceites que son inmiscibles en metanol, para lo cual, en esos casos se recomienda que esta primera dilución se realice utilizando acetato de etilo como disolvente.
7. Seguidamente, se realiza la segunda dilución, para lo cual mida la masa del balón vacío respectivo y anótelas en su bitácora.
8. Agite el balón contenedor de la disolución de la primera dilución utilizando un agitador vórtex hasta que la muestra se encuentre completamente homogénea. En un frasco o beaker pequeño de unos 5 mL limpio, seco y rotulado, añada entre 3 y 4 mL de la primera dilución, de los cuales se toma la alícuota respectiva y se deposita en el balón vacío de la segunda dilución, mida la masa y anótelas en su bitácora.
9. Posteriormente, afore el balón con metanol al igual que en el paso 6, mida la masa y anótelas en su bitácora.
10. Agite vigorosamente el balón contenedor de la segunda dilución en un agitador vórtex y deposite aproximadamente 1 mL de la muestra diluida (D50, D100, D200) en un vial de inyección adecuadamente rotulado donde se especifique el código de la muestra (especificando el factor de dilución), fecha de preparación, disolvente e iniciales del analista que la preparó.
11. Trasvase las disoluciones a tubos o frascos limpios y secos de volumen adecuado, color ámbar (o en su defecto de vidrio incoloro cubiertos con papel aluminio) y rotulados con la información de la muestra descrita en el paso 10. Mantenga las muestras en refrigeración a 4 °C o menos.
12. Finalmente, haciendo uso de la hoja de cálculo llamada “*Hoja cálculo pretratamiento de las muestras CBD HPTLC*”, introduzca la información de las masas recolectadas durante el proceso de dilución gravimétrica en conjunto con datos de la muestra y disolventes utilizados para la determinación de la concentración teórica de la muestra diluida.

2

Laboratorio en Investigación en Biorrefinería (LIB): Tercer piso en el Edificio de Nuevos Procesos Industriales, Avenida Central 1, Heredia, 86-3000, Costa Rica
 Número de contacto: 2277-3489
 Correo de contacto: ana.carballo.arce@una.ac.cr

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P002	Versión: 1.1

Anexos

Cuadro 1. Recomendaciones de factor de dilución y materiales según la cantidad de mg de CBD descrita en la etiqueta del producto.

Rango según cantidad de miligramos (mg) de CBD descritos en la etiqueta del producto	Factor de dilución recomendado	Materiales requeridos
[250 - 1500[50	1 pipeta aforada 1mL (1 D) 1 pipeta aforada 2 mL (2 D) 2 balones aforados 10 mL.
[1500 - 3000[100	2 pipeta aforada 1mL 2 balones aforados 10 mL.
[3000 - 8000]	200	2 pipetas aforadas 1mL 1 balón aforado 10 mL (1 D) 1 balón aforado 20 mL (2 D)

(1 D): utilizado para la primera dilución. (2 D): utilizado para la segunda dilución.

Cuadro 2. Ejemplo de cuadro recomendado para anotar los datos relacionados a la dilución gravimétrica de muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo.

Código de muestra	Masa balón vacío (g)	Masa balón + alícuota (g)	Masa balón + disolución (g)	Disolvente
24-001 D10				
24-001 D50				

Referencias

- CAMAG. (2017). *Application note: Identification and quantification of different cannabinoids in Cannabis sativa*. www.camag.com

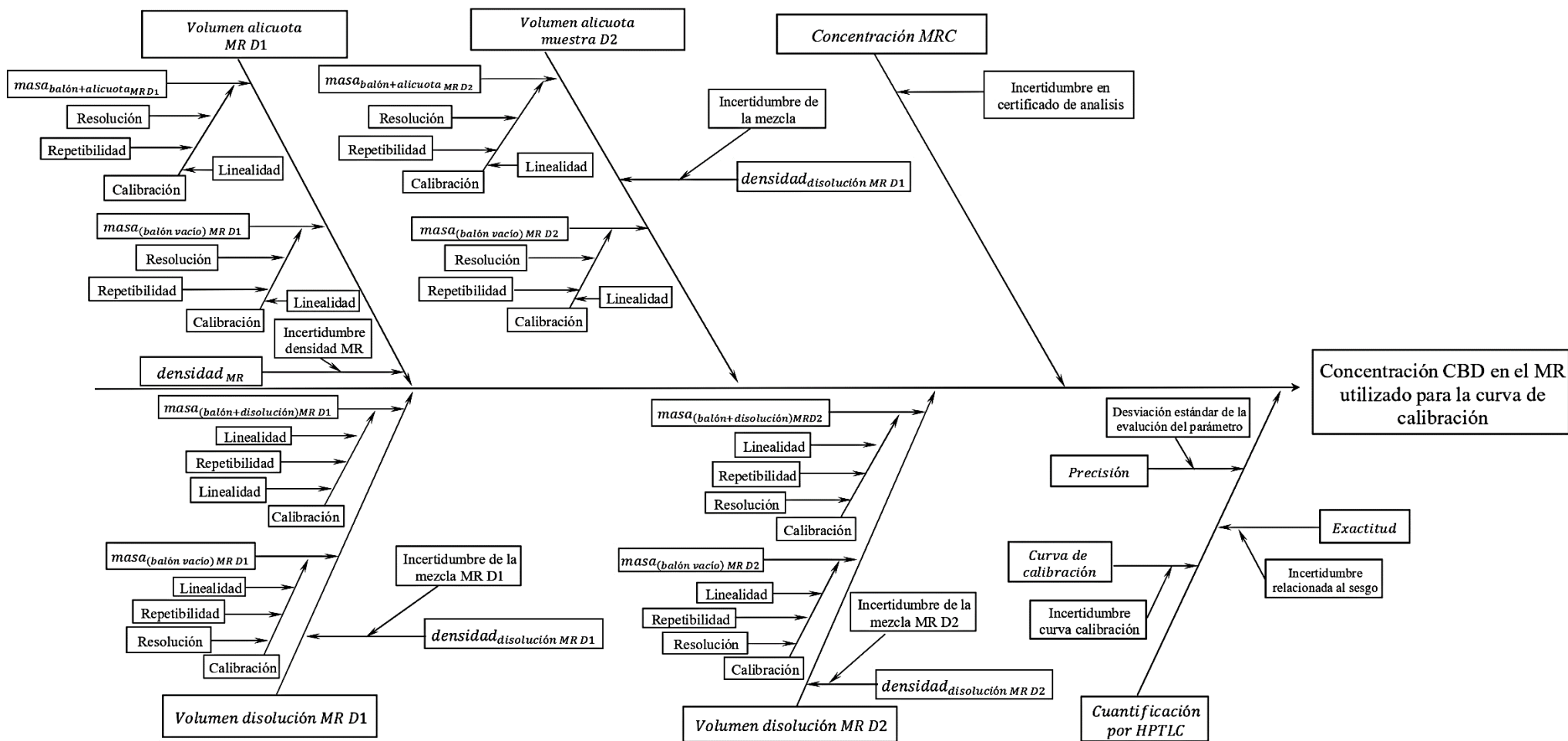
Control de cambios

Cuadro 3. Registro de cambios realizados al procedimiento.



Apartado	Cambio

Laboratorio en Investigación en Biorrefinería (LIB): Tercer piso en el Edificio de Nuevos Procesos Industriales, Avenida Central 1, Heredia, 86-3000, Costa Rica
 Número de contacto: 2277-3489
 Correo de contacto: ana.carballo.arce@una.ac.cr

Anexo 2. Diagrama de causa y efecto para la preparación de las disoluciones de trabajo elaboradas a partir de un material de referencia certificado.



Anexo 3. Plantilla informes de validación análisis de CBD por HPTLC LIB LIB.SG.P001.

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA</p>	 Laboratorio de Investigación en Biorrefinería
		Página 1 de 2
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P001	Versión: 1.1

Plantilla para la elaboración de informes de validación del análisis de CBD por HPTLC

1. Objetivo y Alcance.
 - 1.1. Objetivo
 - 1.2. Alcance
2. Personal que participó en la validación del método.
3. Equipos y materiales utilizados en la validación.
 - 3.1. Equipos
 - 3.2. Materiales de referencia
 - 3.3. Reactivos y consumibles
4. Procedimiento de validación utilizado.
5. Parámetros de desempeño o especificación de los requisitos.
6. Determinación de las características de desempeño del método.
 - 6.1. Criterios de aceptación para los parámetros de desempeño evaluados.

Cuadro 1. Criterios de aceptación definidos para los parámetros de desempeño evaluados.

Parámetro evaluado	Criterio de aceptación	Referencia

6.2. Datos obtenidos durante la validación y análisis de los mismos.

7. Resultados obtenidos.

Cuadro 2. Criterios de aceptación definidos y resultados obtenidos para los parámetros de desempeño evaluados.

Parámetro evaluado	Criterio de aceptación	Resultado obtenido durante la validación

Laboratorio en Investigación en Biorrefinería (LIB): Tercer piso en el Edificio de Nuevos Procesos Industriales, Avenida Central 1, Heredia, 86-3000, Costa Rica
 Número de contacto: 2277-3489
 Correo de contacto: ana.carballo.arce@una.ac.cr

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	 Página 2 de 2
		Fecha de emisión: 13/03/2024

8. Declaración de cumplimiento respecto a los resultados obtenidos en la validación.


9. Referencias.

- Ente Costarricense de Acreditación. (2023). *ECA-MC-C18 Criterios para Evaluación y Acreditación 17025 2017 V03*. Recuperado el 04 de marzo de 2024 de <https://eca.or.cr/buscador-sgc/#83-86-02-eca-mc-cxx-criterios-eca>.



10. Control de cambios

Cuadro 3. Registro sobre el control de cambios realizados.

Apartado	Cambio


 Laboratorio en Investigación en Biorrefinería (LIB): Tercer piso en el Edificio de Nuevos
 Procesos Industriales, Avenida Central 1, Heredia, 86-3000, Costa Rica
 Número de contacto: 2277-3489
 Correo de contacto: ana.carballo.arce@una.ac.cr

Anexo 4. Plantilla informe de resultados LIB análisis de CBD en aceites (LIB.SG.P003)

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
	LIB.SG.P003	Página 1 de 2
Fecha de emisión: XX/XX/202X	UNA-EQ-LIB-202X-XXX	Versión: 1.1

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Cuadro 1. Información del cliente y la muestra.

Nombre del cliente	Determinación (magnitud)	Concentración de CBD mg/mL
Persona representante del cliente	Técnica de análisis	HPTLC
Número de teléfono de contacto del cliente	Descripción del punto de muestreo	
Dirección de correo electrónico del representante del cliente	Fecha de muestreo	
Identificación de la muestra asignada por el Laboratorio	Nombre del muestreador	
Tipo de matriz de análisis	Código del procedimiento y/o plan de muestreo utilizado	
Descripción de la muestra	Fecha de recepción de la muestra en el Laboratorio	



Aceite con extracto de cáñamo

Cuadro 2. Resultados del ensayo realizado a la muestra.

Nombre del ensayo*	
Código del procedimiento de análisis	LIB.SG.A01
Unidades de medición	mg/mL
Resultado**	
Incertidumbre***	±
Fecha de realización del ensayo	

INSERTE
AQUÍ LA
FOTOGRAFÍA
DEL
PRODUCTO

Laboratorio en Investigación en Biorrefinería (LIB): Tercer piso en el Edificio de Nuevos Procesos Industriales, Avenida Central 1, Heredia, 86-3000, Costa Rica
Número de contacto: 2277-3489
Correo de contacto: ana.carballo.arce@una.ac.cr

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
	LIB.SG.P003	
Fecha de emisión: XX/XX/202X	UNA-EQ-LIB-202X-XXX	Versión: 1.1

1. Observaciones:

- * El ensayo se realizó haciendo uso de un método no acreditado.
- ** El resultado reportado representa el promedio obtenido de un total de X mediciones.
- ***La incertidumbre expandida reportada, se declara como la incertidumbre estándar de la medición multiplicada por un factor de cobertura k que corresponde a una probabilidad de cobertura aproximadamente del 95%.
- Los resultados reportados se relacionan únicamente con los ítems sometidos a ensayo.

Firma Analista

Firma Encargado de Laboratorio

Nombre Analista

Nombre Encargado de Laboratorio

2. Referencias

- INTECO. (2017). *INTE ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. INTECO. Recuperado el 15 de marzo de 2024 de <https://www.camericacr.com/descargas/INTE%20ISO%20IEC%2017025%202017.pdf>
- Ente Costarricense de Acreditación (2023). *ECA-MC-C18 Criterios para Evaluación y Acreditación 17025 2017 V03*. Recuperado el 02 de marzo de 2024 de <https://eca.or.cr/buscador-sgc/#83-86-02-eca-mc-cxx-criterios-eca>.

3. Glosario de abreviaciones

- CBD: cannabidiol.
- HPTLC: High-performance thin-layer chromatography.
- mg/mL: miligramo por mililitro.

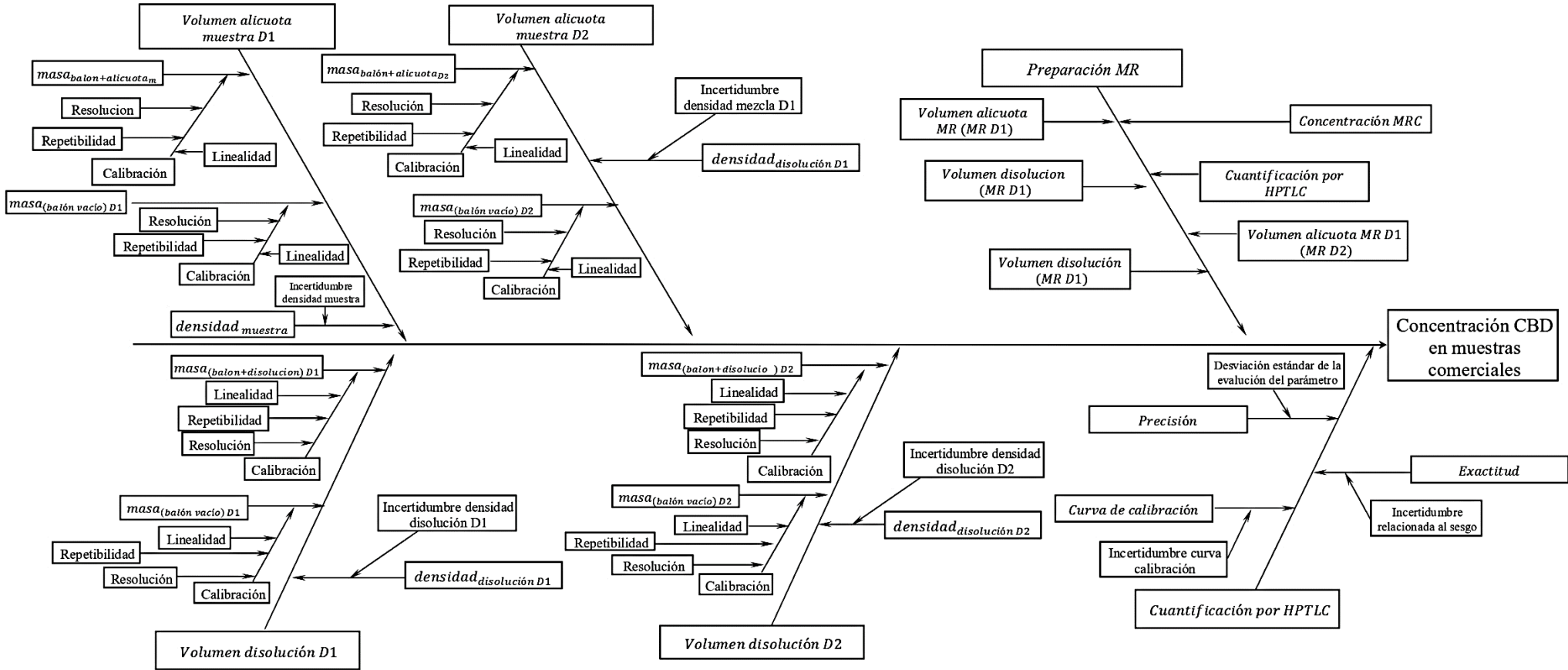
4. Control de cambios

Cuadro 3. Registro sobre el control de cambios realizados.



Apartado	Cambio

Laboratorio en Investigación en Biorrefinería (LIB): Tercer piso en el Edificio de Nuevos Procesos Industriales, Avenida Central 1, Heredia, 86-3000, Costa Rica
 Número de contacto: 2277-3489
 Correo de contacto: ana.carballo.arce@una.ac.cr

Anexo 5. Diagrama de causa y efecto para la determinación de la concentración de CBD en aceites enriquecidos con extracto de cáñamo por la técnica de HPTLC.



Anexo 6. Ejemplo de informe de resultados elaborado con los resultados obtenidos del análisis de una muestra comercial utilizando la plantilla confeccionada.

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
	LIB.SG.P003	
Fecha de emisión: 15/03/2024	UNA-EQ-LIB-2024-002	Versión: 1.1

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Cuadro 1. Información del cliente y la muestra.

Nombre del cliente	Laboratorio de Análisis y Servicios Químicos	Determinación (magnitud)	Concentración de CBD mg/mL
Persona representante del cliente	Dr. José Ángel Rodríguez Corrales	Técnica de análisis	HPTLC
Número de teléfono de contacto del cliente	2277-3356	Descripción del punto de muestreo	N.D
Dirección de correo electrónico del representante del cliente	jose.rodriguez.corrales@una.ac.cr	Fecha de muestreo	N.D
Identificación de la muestra asignada por el Laboratorio	MC#B	Nombre del muestreador	N.D
Tipo de matriz de análisis	Aceite con extracto de cáñamo	Código del procedimiento y/o plan de muestreo utilizado	N.D
Descripción de la muestra	Mezcla de aceite MCT y extracto de cáñamo con potencia de 300 mg de CBD en recipiente de 30mL.	Fecha de recepción de la muestra en el Laboratorio	08 de noviembre de 2022

Cuadro 2. Resultados del ensayo realizado a la muestra.

Nombre del ensayo*	a) Metodo_CBD_20230515_Placa Especificidad b) Metodo_CBD_20230522_Caracterización de muestras comerciales c) Metodo_CBD_20230524_Caracterización de muestras comerciales N2 d) Metodo_CBD_20230609_Placa Especificidad N2 e) Metodo_CBD_20230609_Placa Especificidad N3
Código del procedimiento de análisis	LIB.SG.A01
Unidades de medición	mg/mL
Resultado**	8,86
Incertidumbre***	± 0,73
Fecha de realización del ensayo	a) 15 de mayo de 2023 b) 22 de mayo de 2023 c) 24 de mayo de 2023 d) 09 de junio de 2023 e) 09 de junio de 2023



Laboratorio en Investigación en Biorrefinería (LIB): Tercer piso en el Edificio de Nuevos Procesos Industriales, Avenida Central 1, Heredia, 86-3000, Costa Rica
Número de contacto: 2277-3489
Correo de contacto: ana.carballo.arce@una.ac.cr

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
	LIB.SG.P003	
Fecha de emisión: 15/03/2024	UNA-EQ-LIB-2024-002	Versión: 1.1

1. Observaciones:

- * El ensayo se realizó haciendo uso de un método no acreditado.
- ** El resultado reportado representa el promedio obtenido de un total de ocho mediciones.
- ***La incertidumbre expandida reportada, se declara como la incertidumbre estándar de la medición multiplicada por un factor de cobertura k que corresponde a una probabilidad de cobertura aproximadamente del 95%.
- Los resultados reportados se relacionan únicamente con los ítems sometidos a ensayo.

BQI. Keilor Morales Alfaro
Firma Analista

PhD. Ana Francis Carballo Arce
Firma Encargado de Laboratorio

BQI. Keilor Morales Alfaro
Nombre Analista

PhD. Ana Francis Carballo Arce
Nombre Encargado de Laboratorio

2. Referencias



- INTECO. (2017). *INTE ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. INTECO. Recuperado el 15 de marzo de 2024 de <https://www.camericacr.com/descargas/INTE%20ISO%20IEC%2017025%202017.pdf>
- Ente Costarricense de Acreditación (2023). *ECA-MC-C18 Criterios para Evaluación y Acreditación 17025 2017 V03*. Recuperado el 02 de marzo de 2024 de <https://eca.or.cr/buscador-sgc/#83-86-02-eca-mc-cxx-criterios-eca>.

3. Glosario de abreviaciones

- CBD: cannabidiol.
- HPTLC: High-performance thin-layer chromatography.
- MCT: medium chain triglycerides.
- N.D: no disponible.
- mg/mL: miligramo por mililitro.

Laboratorio en Investigación en Biorrefinería (LIB): Tercer piso en el Edificio de Nuevos Procesos Industriales, Avenida Central 1, Heredia, 86-3000, Costa Rica
 Número de contacto: 2277-3489
 Correo de contacto: ana.carballo.arce@una.ac.cr

Anexo 7. Protocolo de verificación del método de análisis de CBD por HPTLC LIB.SG.P004.

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	 Página 1 de 10
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P004	Versión: 1.1

Protocolo de verificación del método de análisis de CBD por HPTLC.

1. Introducción

El presente documento tiene como objetivo describir una serie de directrices necesarias para la verificación periódica del método, lo cual se realiza por medio de la comprobación de una serie de parámetros de desempeño que, con base en los resultados obtenidos, dicte si el método funciona adecuadamente posterior a la validación del mismo. De la misma forma, también es necesario realizar la verificación del método cuando se hayan implementado cambios importantes, como lo puede ser el uso de un equipo nuevo (pero similar), traslado de equipos, entre otros. Los resultados de la verificación pueden diferir ligeramente de los obtenidos en la validación, pero se debe establecer si son aceptables contemplando el objetivo que se persigue al utilizar el método.

Para la elaboración de esta guía se tomaron en consideración las recomendaciones de parámetros de desempeño a evaluar durante la verificación de métodos químicos cuantitativos descritos por *Food and Drug Administration (FDA)* en el documento “*ORALab Manual Vol. II - Methods, Method Verification and Validation (ORALAB.5.4.5)*” y por la *Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito* en el manual “*Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*”. Por su parte, la evaluación de los parámetros de desempeño se realiza según *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* en la guía “*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*”.



2. Equipos y materiales

2.1. Equipos:

- Sistema de módulos HPTLC CAMAG (TLC Visualizer 2, Automatic TLC Sampler 4, Automatic Developing Chamber 2, TLC Scanner 4).

2.2. Reactivos y materiales:

- Dietilamina
- Materiales de referencia certificados
- Metanol
- Muestras comerciales
- n-Hexano
- Placas Merck HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ 20 × 10 cm.

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	 Página 2 de 10
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P004	Versión: 1.1

- p-Xileno
- Viales de inyección 2 mL.

3. Procedimiento

A continuación, se enlistan los parámetros de desempeño mínimos que deben ser evaluados para la verificación del método analítico:



- Linealidad en el rango de trabajo.
- Cumplimiento de los requisitos de idoneidad del sistema.
- Exactitud.
- Precisión (como repetibilidad y precisión intermedia).
- Límite de detección (LD).
- Límite de cuantificación (LQ).

3.1. Linealidad en el rango de trabajo.

Inicialmente, se debe realizar la verificación de que el método presente un comportamiento lineal dentro del rango de trabajo establecido. Para el presente método se definió el rango de trabajo como un mínimo de 80% al 120% de la concentración esperada para muestras comerciales disponibles en el mercado nacional al momento del inicio de la validación, esto posterior al pretratamiento de la mismas (133,33 ng a 1600ng), por lo cual, al realizar curvas de calibración, estas deben de abarcar como mínimo dichos límites. Para la verificación de la linealidad del método se pueden utilizar los resultados obtenidos de las curvas de calibración medidas durante la verificación de la exactitud, precisión intermedia y repetibilidad, haciendo énfasis en los valores del coeficiente de correlación (R), el coeficiente de variación de la curva de calibración dados por el equipo en cada prueba, la ausencia de una tendencia al graficar los residuales y el cálculo del valor relativo de la desviación estándar del proceso (V_{so}).

3.2. Cumplimiento de los requisitos de idoneidad del sistema

Obtenidos los resultados necesarios con el equipo HPTLC-CAMAG haciendo uso del software VisonCats, se puede acceder a una subpestaña dentro de cada análisis denominada “SST” (*System Suitability Testing*), lo cual es un paso previo a la evaluación cuantitativa de los datos que realiza para verificar que el método analítico es adecuado para el propósito previsto el día en que se realizó el análisis. Con lo cual, el cumplimiento de los requisitos de idoneidad del sistema los realiza el software cada vez que se quiere realizar una evaluación cuantitativa.

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P004	Página 3 de 10 Versión: 1.1

3.3. Exactitud



Por su parte, el parámetro de exactitud se evalúa como el porcentaje de recuperación del analito a tres distintas concentraciones dentro del rango de la curva de calibración por triplicado en muestras enriquecidas. Para lo cual se debe preparar tres disoluciones de concentración conocida (MR# Ext A, MR# Ext B, MR# Ext C) y una disolución de una muestra comercial (MC#M). Cabe destacar, que la preparación de las disoluciones debe realizarse tomando en consideración que la cantidad total del analito en cada nivel de enriquecimiento no exceda el límite superior de la curva de calibración. Preparada las disoluciones, proceda a realizar el experimento utilizando como guía el diseño descrito en el cuadro 1. Finalizada la prueba, determine los porcentajes de recuperación en cada nivel de enriquecimiento.

Cuadro 1. Diseño de placa recomendado para la verificación del parámetro de desempeño de exactitud.

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sustancia en la placa	MC#M + MR# Ext A	MC#M + MR# Ext A	MC#M + MR# Ext A	MC#M + MR# Ext B	MC#M + MR# Ext B	MC#M + MR# Ext B	Curva Calibración N1	Curva Calibración N2	Curva Calibración N3	Curva Calibración N4	Curva Calibración N5	MC#M	MC#M + MR# Ext C	MC#M + MR# Ext C	MC#M + MR# Ext C

3.4. Precisión (como repetibilidad y precisión intermedia).

Para la evaluación de la precisión como repetibilidad, se analiza por triplicado 3 disoluciones (MR#X Rpt A, MR#X Rpt B, MR#X Rpt C) de concentraciones conocidas de un material de referencia. Deben ser preparadas de manera que *MR#X Rpt A* tenga una concentración baja conocida, *MR#X Rpt B* sea una concentración intermedia conocida y *MR#X Rpt C* sea una concentración alta conocida, esto con base en el rango de la curva de calibración. Elaboradas las disoluciones, realice la prueba utilizando como guía el diseño de placa como se muestra en el cuadro 2. Cabe destacar que en la placa después de sembrar la curva de calibración y las disoluciones de concentración conocida por triplicado, queda un espacio disponible el cual puede ser asignado a sembrar un blanco de matriz o en su defecto un blanco de disolvente. Con los resultados obtenidos determine el coeficiente de variación (%CV) para cada nivel evaluado.

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
	Fecha de emisión: 13/03/2024	

Cuadro 2. Diseño de placa recomendado para la verificación del parámetro de desempeño de repetibilidad.

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sustancia en la placa	BL MTZ	MR#X Rpt A	MR#X Rpt A	MR#X Rpt A	Curva Calibración N1	Curva Calibración N2	Curva Calibración N3	Curva Calibración N4	Curva Calibración N5	MR#X Rpt B	MR#X Rpt B	MR#X Rpt B	MR#X Rpt C	MR#X Rpt C	MR#X Rpt C

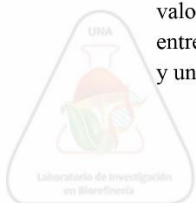
En la evaluación de la precisión como precisión intermedia, es necesario analizar una serie de muestras contemplando que los ensayos se realicen en días distintos y de ser posible, por analistas diferentes. Por lo tanto, se requiere preparar muestras que contengan el analito de interés para que al ser analizadas la respuesta obtenida se encuentre dentro del intervalo de la curva de calibración. Con lo cual, se recomienda analizar por triplicado tres muestras distintas en un periodo de tres días diferentes, tome como referencia el diseño descrito en el cuadro 3. De la misma forma que para la evaluación de la repetibilidad, determine el coeficiente de variación para cada una de las muestras estudiadas.



Cuadro 3. Diseño de placa recomendado para la verificación del parámetro de desempeño de precisión intermedia.

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sustancia en la placa	BL Disolv	M#1 Pen Int	M#1 Pen Int	M#1 Pen Int	Curva Calibración N1	Curva Calibración N2	Curva Calibración N3	Curva Calibración N4	Curva Calibración N5	M#2 Pen Int	M#2 Pen Int	M#2 Pen Int	M#3 Pen Int	M#3 Pen Int	M#2 Pen Int

3.5. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).



De la misma forma que para la verificación de la linealidad dentro del ámbito de trabajo, los resultados obtenidos de las curvas de calibración de las verificaciones de los otros parámetros de desempeño pueden ser utilizados para la verificación del LD y LC. Estos valores son determinados según la relación de la desviación estándar de los residuales (S_e) entre la pendiente de la curva de calibración (m) multiplicados por un factor de 3 para el LD y un factor de 10 para el LC según lo descrito por el ICH en la guía de validación.



	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	 Página 5 de 10
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P004	Versión: 1.1

3.6. Consideraciones adicionales.

- Con base en la literatura consultada, las disoluciones de los cannabinoides son estables por doce meses cuando se almacenan en refrigeración y en condiciones de oscuridad, no obstante, durante la validación del método se observó que posterior a los ocho meses de preparadas las disoluciones de trabajo los picos obtenidos para el nivel más alto de la curva comenzaban a presentar irregularidades. Por lo tanto, se recomienda que las disoluciones de trabajo de cannabinoides sean preparadas cada seis meses y de la misma forma, se realice la verificación del método de forma periódica cada vez que se preparan nuevamente las disoluciones de trabajo.
- Es recomendable que la preparación de las disoluciones de trabajo se realice de forma gravimétrica, esto con la finalidad de determinar de forma más exacta la concentración de las mismas. Por su parte, la preparación de las muestras comerciales puede realizarse con base en las directrices descritas en *“Procedimiento de pretratamiento de muestras de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo para su análisis en HPTLC”* al cual se puede acceder por medio del siguiente enlace: <https://drive.google.com/file/d/1bDYxSwcFl5cKpFuyPJ-5elxssLRvIPA8/view?usp=sharing>
- Se aconseja que dentro de los diseños experimentales de los análisis de cannabinoides por el método en estudio, se analicen cuando sea posible blancos de matriz, blancos de disolventes, blancos de matriz enriquecidos con una cantidad conocida del analito y materiales de referencia del analito diferentes al utilizado para la curva de calibración, esto con el objetivo de detectar de forma preventiva la presencia de anomalías en la ejecución del método.
- Realizadas las pruebas para la verificación del método, compare los resultados obtenidos para cada parámetro de desempeño con los valores obtenidos durante la validación del método y con los criterios de aceptación definidos durante el mismo (véase cuadro 4).
- En la sección de anexos al final de este documento, se muestra el procedimiento general del análisis de cannabinoides por HPTLC el cual puede ser utilizado como guía sobre el orden cronológico de las etapas del método. De la misma forma, en dicha sección se encuentran una serie de cuadros con los parámetros operaciones para cada uno de los módulos

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P004	Página 6 de 10 Versión: 1.1

Cuadro 4. Criterios de aceptación establecidos y resultados obtenidos durante la implementación del método de análisis de CBD por HPTLC.

Parámetro evaluado	Modo de evaluación	Criterio de aceptación establecido	Resultado obtenido durante la validación
LD	Mínima cantidad de analito distingue del ruido	-	23 ng
	Según curva de calibración	-	22 ng
LC	Tres veces el LD	-	69 ng
	Según curva de calibración	-	68 ng
Ámbito	Evaluando la linealidad del método dentro del rango de concentraciones esperadas.	80% al 120% de la concentración esperada (133,33 ng a 1600ng)	115,4 ng - 1730,7 ng (69% al 130% de la concentración esperada)
Linealidad	Comprobación de linealidad dentro del ámbito de trabajo	R > 0,998	0,99989 - 0,99996
		CV% de la curva de calibración dada por el software < 5 %	0,52 % - 1,1 %
		Valor relativo de la desviación estándar del proceso (V_{XO}) < 5 %	0,74 % - 1,2 %
		Ausencia de tendencia en los residuales	Los residuales presentan un comportamiento aleatorio en torno a cero.
Precisión intermedia	Análisis de resultados obtenidos de muestras adquiridos en días distintos	% CV < 3 %	% CV = 0,90% - 1,6%
Repetibilidad	Análisis por triplicado de tres concentraciones diferentes dentro de la curva.	% CV < 2 %	0,32 % (Cn baja) %CV= 0,45% (Cn media) 0,10 % (Cn alta)
Exactitud	Muestras de concentración conocida enriquecidas a 3 niveles distintos,	% Recuperación 95–105 (analitos en concentración entre 0,01 % y 0,1 % m/m)	Cn baja = 101 %
			Cn media = 101 %
			Cn alta = 99 %

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P004	Página 7 de 10 Versión: 1.1



4. REFERENCIAS

- Food and Drug Administration Office of Regulatory Affairs Quality. (2023). *ORA Lab Manual Vol. II - Methods, Method Verification and Validation (ORALAB.5.4.5)*. Recuperado el 01 de marzo de 2024 de <https://www.fda.gov/media/73920/download>
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Recuperado el 01 de marzo de 2024 de https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2005). *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. Recuperado el 01 de marzo de 2024 de <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>

5. ANEXOS



Figura 1. Diagrama general del proceso de análisis de cannabinoides por HPTLC.

	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P004	Página 8 de 10 Versión: 1.1

Cuadro 6. Condiciones operacionales etapa “Plate layout”.

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Plate manufacturer	Merk	Application type	Band
			Band length: 8 mm, Track distance: 11.4 mm
			Distance from left edge: 20 mm
Stationary phase	HPTLC Silica gel 60 F ₂₅₄	Solvent front post (mm)	Distance from lower edge 8 mm
Bach number	Revisar caja		70
Plate format	20x10		



Cuadro 7. Condiciones operacionales etapa “TLC Visualizer 2 documentation settings (Clean 1a)”.

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Image quality	Standard	R 366 (">" Auto exposure)	✓
RT White (">" Auto exposure)	✓	R 254 (">" Auto exposure)	✓

Cuadro 8. Condiciones operacionales etapa “ATS 4 application settings (Applied 1a)”.

Parámetro	Especificación
Sample solvent type	Methanol
Sample solvent type (">" options)	Dosage speed (nL/s) : 150
	Predosage volume (nL) : 200
	Filling speed (uL/s) : 15
	Filling vacuum time(s): 4
	Retraction volume (nL): 200
Filling/rinsing quality	Standard
Rack type	Standard



	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P004	Página 9 de 10 Versión: 1.1

Cuadro 9. Condiciones operacionales etapa “TLC Visualizer 2 documentation settings (Applied 1a)”.

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Image quality	Standard	R 366 (">" Auto exposure)	✓
RT White (">" Auto exposure)	✓	R 254 (">" Auto exposure)	✓


Cuadro 10. Condiciones operacionales etapa “ADC 2 development setting (Developed 1)”.

Parámetro	Especificación
Mobile phase	Xylene:Hexane:diethylamine (XHDa) 25:10:1
Development type	Activated and saturated
Saturation (user)	Saturation time (min): 25
	Use saturation pad: ✓
Activation (user)	Bottle content: MgCl ₂ (33% HR)
	Activation time (min): 15
Drying (default)	Pre-drying: ✓
	Drying time (min): 5

Cuadro 11. Condiciones operacionales etapa “TLC Visualizer 2 documentation settings (Developed 1a)”.

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Image quality	Enhanced	R 366 HDRI (">" Auto exposure)	✓
RT White (">" Auto exposure)	✓	R 254 (">" Auto exposure)	✓



	UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA DE QUÍMICA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOREFINERÍA	 Laboratorio de Investigación en Biorefinería
		Página 10 de 10
Fecha de emisión: 13/03/2024	LIB.SG.P004	Versión: 1.1

Cuadro 12. Condiciones operacionales etapa “TLC Scanner 4 settings (Developed 1b)”.

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Scanner type	Multiple λ	Wavelength selection	Selection: User
Optimization for	Resolution		Lamp: Deuterium & Tugsten
Measurement mode	Absorbance		Start λ : 190
Detector mode	Automatic		End λ : 450
Speed/resolution/slit	HPTLC		Number of λ : 6
	Scanning speed: 200 mm/s		Increment: 50
	Data resolution: 100 $\mu\text{m}/\text{step}$		Wavelengths applied: 210 y 285 nm
	Start: 4.9 mm		-
	End: 73.1 mm		-
Slit: 5 x 0.2 mm, micro	-		-

Cuadro 13. Condiciones operacionales etapa “TLC Visualizer 2 documentation settings (Derivatized 1a)”.

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Image quality	Enhanced	R 366 HDRI (">" Auto exposure)	✓
RT White (">" Auto exposure)	✓	R 254 (">" Auto exposure)	✓

6. Control de cambios

Cuadro 14. Registro de control de cambios.

Apartado	Cambio



Anexo 8. Programa del taller de la capacitación teórica práctica sobre el uso del sistema HPTLC impartida.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA**



NOMBRE DEL TALLER:	“Capacitación bimodal sobre un método de Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) para la determinación de Cannabidiol (CBD) en matrices comerciales presentes en el mercado nacional”
MODALIDAD:	Mixta, remota con apoyo tecnológico y presencial
NATURALEZA:	Teórico-práctico
FECHA	<ul style="list-style-type: none"> • Sesión teórica: 14 de febrero de 2024 • Sesiones prácticas: 15 de febrero de 2024
HORARIO	<ul style="list-style-type: none"> • Sesión teórica: 9:00 am a 11:00 am • Sesiones prácticas: 8:00 am a 12:00 md (grupo 1) 1:00 pm a 5:00 pm (grupo 2)
LUGAR	<ul style="list-style-type: none"> • Sesión teórica: Reunión virtual por la plataforma de Microsoft Teams • Sesiones prácticas: Laboratorio de Desarrollo de Tecnología Química (LIDETEQ), Tercer piso en el Edificio de Nuevos Procesos Industriales.
HORAS TOTALES:	6
CUPO MÁXIMO:	10 personas
REQUISITOS:	Ninguno
FACILITADOR:	Bachiller en Química Industrial Keilor Morales Alfaro
INFORMACIÓN DE CONTACTO PARA CONSULTAS	Teléfono celular: 60350752 Correo electrónico: keilor.morales.alfaro@est.una.ac.cr keilormorales98@gmail.com

Firma del facilitador del taller

Firma del coordinador de la actividad

I. DESCRIPCIÓN

Este taller pretende brindar al estudiante una introducción teórica sobre la técnica de cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) y las ventajas de la misma frente a técnicas de análisis cromatográficos convencionales para el análisis de matrices con extractos de productos vegetales. De la misma, por medio de una sesión demostrativa realizada por parte del facilitador del taller, se mostrará el funcionamiento en tiempo real del conjunto de módulos del sistema HPTLC-CAMAG por medio del análisis de productos comerciales enriquecidos o formulados con extracto de cañamo presentes en el mercado a nivel nacional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Desarrollar los conocimientos y habilidades necesarias para el uso adecuado del sistema de módulos HPTLC-CAMAG.

Objetivos específicos

- Comprender las principales diferencias y ventajas de la técnica HPTLC frente a técnicas cromatográficas como TLC, HPLC y GC para el análisis de fitocompuestos.
- Desarrollar el conocimiento necesario para hacer un uso adecuado de los módulos del sistema HPTLC-CAMAG.
- Interpretar adecuadamente los resultados obtenidos durante el análisis de matrices comerciales.

III. CONTENIDOS

1. Cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC), introducción y comparación contra técnicas cromatográficas convencionales.
2. Presentación y descripción de los distintos módulos que conforman el sistema HPTLC-CAMAG.
 - a. TLC Visualizer 2.
 - b. Automatic TLC Sampler 4.
 - c. Automatic Developing Chamber.
 - d. TLC Scanner 4.
 - e. Derivatizer.
 - f. Software del equipo: VisionCATS.
3. Metodología de análisis.
 - a. Materiales y equipos utilizados.
 - b. Procedimiento de análisis.
 - c. Pretratamiento de las muestras.
 - d. Condiciones y parámetros operacionales de cada módulo.
4. Parámetros de desempeño evaluados durante la validación.
5. Principales resultados obtenidos.
6. Cuidados y precauciones durante la ejecución del método.
7. Recomendaciones por implementar.
8. Funcionamiento del sistema de módulos HPTLC-CAMAG por medio de una sesión demostrativa presencial.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



IV. METODOLOGÍA

Sesión teórica:

Por medio de una reunión remota con apoyo tecnológico utilizando la plataforma Microsoft Teams, el facilitador procederá a explicar los aspectos teóricos del taller (contenidos del 1 al 7 de la sección anterior) por medio de una presentación PowerPoint en la cual se exhibirá material audiovisual con el objetivo de consolidar de una mejor forma la información suministrada. De la misma forma, a los participantes de taller se les brindará una unidad académica con los contenidos del taller, la cual contendrá una serie de directrices y actividades a desarrollar durante el taller y posterior a la culminación del mismo.

Sesión práctica:

Se realizará una demostración práctica con el sistema HPTLC-CAMAG y del método implementado por medio del análisis cualitativo y cuantitativo de muestras comerciales enriquecidas o formuladas con extracto de cáñamo presentes en el mercado a nivel nacional haciendo uso de buenas prácticas de análisis como lo son el estudio de blancos de disolvente y blancos de matriz. Con lo cual, se realizará la cuantificación del cannabidiol (CBD) en los productos comerciales, así como la caracterización cualitativa de otros cannabinoides comúnmente contenidos en este tipo de productos. Durante la ejecución demostrativa del método, se abarcará el paso por paso de como crear un método de análisis, la selección de los parámetros operacionales en cada módulo, la correcta manipulación del sistema y el software del equipo, así como la correcta interpretación de los resultados obtenidos.

V. NOTAS IMPORTANTES

- Se recomienda que los participantes revisen previamente los conceptos básicos de la cromatografía de capa fina (TLC).
- En la sección de recursos bibliográficos se pone a disposición una serie de referencias que contiene literatura y recursos audiovisuales de interés relacionados a la técnica y método utilizados.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



VI. RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS

1. CAMAG - *YouTube*. (n.d.). Recuperado el 5 de Febrero, 2024, de <https://www.youtube.com/@CAMAGcom/videos>
2. ICH. (2023). *Committee for Medicinal Products for Human Use ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures*. www.ema.europa.eu/contact
3. CAMAG. *Application note A-108.1: Identification and quantification of different cannabinoids in Cannabis sativa*. (2017). www.camag.com
4. Liu, Y., Brettell, T. A., Victoria, J., Wood, M. R., & Staretz, M. E. (2020). High performance thin-layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in cannabis extracts. *Forensic Chemistry*, 19, 100249. <https://doi.org/10.1016/J.FORC.2020.100249>
5. Srivastava, M. (2011). High-performance thin-layer chromatography (HPTLC). *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*, 1–397. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14025-9/COVER>
6. *Welcome to visionCATS's documentation! — visionCATS 3.2 documentation*. (n.d.). Recuperado el 5 de Febrero, 2024, de <http://hptlmethods.cloudapp.net/302/>

VII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Fecha	Actividad
14 de febrero	<ul style="list-style-type: none">• Bienvenida y presentación• Presentación primera mitad de sesión teórica• Receso• Presentación segunda mitad de sesión teórica• Espacio para consultas• Cierre de la actividad
15 de febrero	<ul style="list-style-type: none">• Bienvenida• Presentación de los módulos sistema HPTLC-CAMAG• Receso• Ejecución demostrativa del método implementado• Espacio para consultas• Cierre de la actividad

Anexo 9. Presentación PowerPoint utilizada durante la sesión teórica de la capacitación impartida sobre uso del sistema HPTLC.

05/04/2024

“CAPACITACIÓN BIMODAL SOBRE UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPTLC) PARA LA DETERMINACIÓN DE CANNABIDIOL (CBD) EN MATRICES COMERCIALES PRESENTES EN EL MERCADO NACIONAL”

KEILOR MORALES ALFARO
PROYECTO DE GRADUACIÓN PRESENTADO EN MODALIDAD DE PASANTÍA



TUTORA: Ph.D. ANA FRANCIS CARBALLO ARCE
ASESORES: Ph.D. JOSÉ ÁNGEL RODRÍGUEZ CORRALES
Ph.D. GABRIEL ZAMORA FALLAS

1

Contenidos

- Justificación
- Explicación módulos del equipo
- Procedimiento de análisis
- Condiciones del método
- Resultados
- Cuidados durante ejecución del método
- Recomendaciones a implementar



2

1

Justificación

- Estudio “Caracterización de alternativas de comercialización internacional del cáñamo industrial” (PROCOMER).
- Ley del Cannabis para uso Medicinal y Terapéutico y del Cáñamo para uso Alimentario e Industrial” N°10.113.
- Imperante necesidad de disponer de herramientas analíticas que permitan el control de calidad de estos productos.

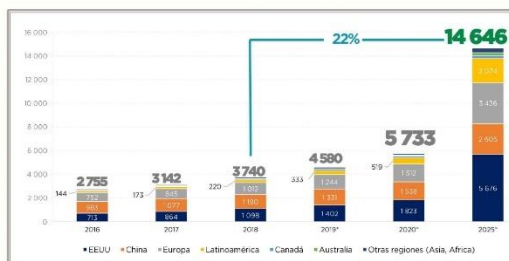


Figura 1. Ventas globales de productos a base de cáñamo (millones de USD) 2016-2020* (Estimaciones CARG). (1)

3

3

Introducción HPTLC

Resultado de los últimos avances en la técnica de cromatografía plana.

determinación cuantitativa de los constituyentes de diversas matrices.

Uso de escaneo densitométrico, le atribuye el potencial de descartar errores sistemáticos durante el análisis

Caracterización de compuestos se realiza por medio del factor de retención (RF)

Gracias al uso de agentes derivatizantes, se puede realizar “chemical fingerprint”

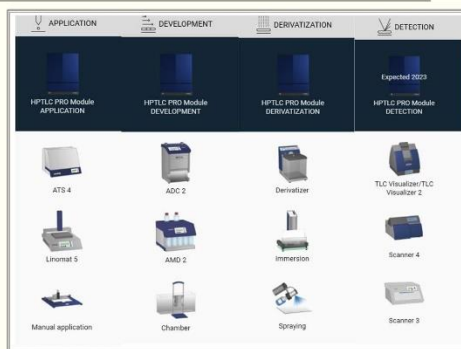


Figura 2. Conjunto de módulos disponibles para el análisis por HPTLC.

4

4

2

Uso de HPTLC como alternativa para el análisis fitoquímico

Cuadro 1. Limitaciones sobre el análisis de compuestos fitoquímicos por medio de las técnicas de GC y HPLC.

Técnica cromatográfica	
Cromatografía de gases (GC)	Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)
No es aplicable para analizar compuestos termolábiles	Emplea elevados volúmenes de disolventes Las columnas carecen de reproducibilidad a largo plazo
Compuestos no volátiles necesitan reacciones de derivatización para su análisis	Necesidad de regeneración de la columna Las muestras pueden requerir limpieza previa
Puede ser difícil comparar espectros de compuestos derivatizados contra una base de datos existente	Largo tiempo de análisis

Permite realizar la separación de múltiples muestras en paralelo en la misma placa

Se pueden hacer uso de reactivos derivatizantes que adjudican colores específicos

HPTLC puede utilizar diferentes modos de evaluación.

Las placas de HPTLC son desechables

La cantidad requerida de fase móvil es pequeña

La exactitud y precisión adquirida durante la cuantificación es elevada

Ventajas sobre el uso de HPTLC en comparación con métodos cromatográficos tradicionales

5

5

Comparación del tiempo de análisis, cantidad de solvente utilizado y costos para análisis por HPLC y HPTLC

Cuadro 2. Comparación de parámetros operacionales y económicos de las técnicas de HPLC y HPTLC

Parámetro	Técnica cromatográfica			
	HPLC		HPTLC	
	Cada muestra	15 muestras	Cada muestra	15 muestras
Tiempo de análisis (min)	20	300	120	120
Cantidad de solvente	Flujo de 0,6 mL/min a 20 min de análisis = 12 mL	180 mL	25 mL saturación + 10 mL desarrollo de la placa = 35 mL	
Costo	€10.201,32	€153.019,8	€8.949,6	€134.244,0

6

6

3

Cuadro 3. Comparación de parámetros operacionales de las técnicas de TLC y HPTLC.

Parámetro	TLC	HPTLC
Técnica	Manual	Instrumental
Fase estacionaria (FE)	Silica gel, Alumina, entre otros	Gran variedad, Silica gel (fase norma), fase reversa (C8, C18) y sus variaciones
Tamaño de partícula en FE (µm)	10-12	5-6
Aplicación de la muestra	Manual	Auto muestreador
Forma de aplicación	Circular	Variado según configuración (Banda, círculo, rectangular, etc.)
Número de muestras por placa	≤ 10	≤ 36 (más común 15)
Rango volúmenes de aplicación (µL)	1 a 10	0,1 to 1000
Cámara de desarrollo	Manual	Automático controlado por software
Rango de longitudes de onda (nm)	254 o 366 , visible	190 a 800, Monocromático
Análisis cuantitativo	No	Si
Escaneo (Scanning)	No	UV/ Visible/ Fluorescencia, densitometría
Consumo de reactivos (mL)	Mayor	Menor
Eficiencia	Baja	Alta

Ventajas del HPTLC frente al TLC convencional

7

7

Presentación de los módulos: TLC Visualizer 2

Máxima homogeneidad de iluminación en luz blanca, UV 366 nm y UV 254 nm

Cámara industrial de alto rendimiento con sensor de imagen.

Obtención de cromatogramas a partir de fotos adquiridas

Figura 4. Visualización de imágenes adquiridas por el módulo "TLC Visualizer 2" durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

Figura 3. TLC Visualizer 2

8

8

Presentación de los módulos: Automatic TLC Sampler 4

- Aplicación de muestra totalmente automatizada (1 μ L a 1000 μ L)
- Aplicación la muestra en forma de bandas, manchas o rectángulos.
- Formato de placa hasta 20 x 20 cm.
- Aplicación por aspiración o por transferencia de contacto (Nitrógeno)
- Capacidad 66 viales




Figura 5. Automatic TLC Sampler 4

9

9

Presentación de los módulos: Automatic Developing Chamber 2

- Revelado en Cámara Twin Trough de 20 x 10 cm
- Placas HPTLC (10 x 10 cm y 20 x 10 cm) en soporte plástico o vidrio
- Funcionamiento en modo autónomo o controlado por software
- La opción "Control de humedad" y "Saturación" permiten una cromatografía reproducible



Figura 6. Automatic Developing Chamber 2

10

10

Medición de la reflexión, ya sea en absorbancia y/o fluorescencia.

Rango espectral de 190 a 900 nm

Lámpara de deuterio (190 - 450 nm)

Lámpara halógena de tungsteno (350 - 900 nm)

Lámpara de mercurio de alta presión, líneas espectrales específicas

Cualquier formato de placa hasta 20 x 20 cm.

Permite escaneo de longitudes de onda múltiples, cuantificación de escáner y escaneo de espectro




Figura 7. TLC Scanner 4

Presentación de los módulos: TLC Scanner 4

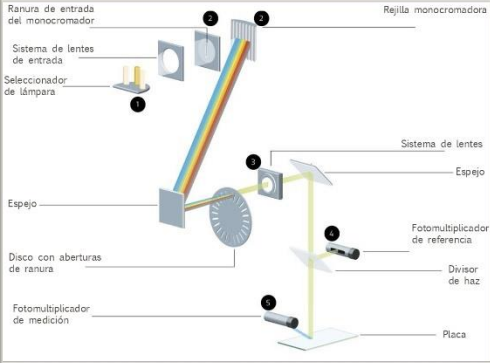


Figura 8. Diagrama del módulo TLC Scanner 4

11

Presentación de los módulos: TLC Scanner 4

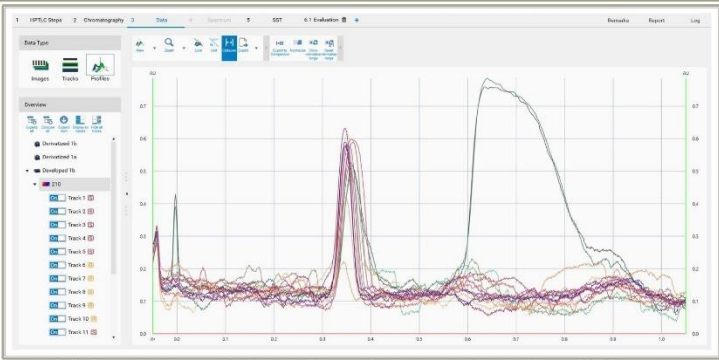


Figura 9. Perfiles adquiridos por el módulo *TLC Scanner 4* durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

12



Presentación de los módulos:
Derivatizer

- Distribución homogénea de reactivos
- Manipulación segura mediante un sistema cerrado
- Resultados reproducibles e independientes del usuario.
- Bajo consumo de reactivos (2-4 mL)
- Campana para placas de 20 x 10 cm y/o 20 x 20 cm
- Manejo intuitivo y fácil limpieza



Figura 10. Derivatizer

13

13

Agentes derivatizantes empleados en HPTLC y sus recomendaciones de uso según CAMAG




Figura 11. Nozzles Derivatizer

Derivatization reagent	Use	Transfer from manual to automated spraying		
		Nozzle	Spraying level 20 x 10 cm, 2 mL	Spraying level 20 x 20 cm, 4 mL
10% sulfuric acid reagent	Spray, then heat the plate at 100°C for 3 min on the CAMAG TLC Plate Heater, let cool to room temperature. Detection under UV 366 nm and white light. (Please note that sulphuric acid > 20% in methanol cannot be sprayed.)	yellow	3-4	4-5
p-anisaldehyde – sulfuric acid reagent	Spray, then heat the plate at 100°C for 3 min on the CAMAG Plate Heater, let cool to room temperature. Detection under UV 366 nm and white light.	blue	3-4	4-5
NP reagent	100 °C for 3 min, let cool to room temperature, spray, wait 5 min. Detection under UV 366 nm.	green	3-4	4-5
PEG solution	Spray, wait 5 min. Detection under UV 366 nm.	blue	2-3	3-4
Iodine solution	Spray, dry with cold air for 2 min. Detection after background has turned white again. Detection under UV 254 nm and white light.	blue	3-4	4-5
Dregerdaff's reagent	Spray, dry with cold air for 10 min. Detection under white light.	red	2-3	3-4
Fast blue salt B reagent	Spray. Detection under white light within 2 min after spraying (white background).	green	3-4	4-5
Ehrlich's reagent	Spray, heat the plate at 100°C for 5 min on the CAMAG TLC Plate Heater, and let cool to room temperature. Detection under white light.	yellow	5-6	6
Phosphomolybdic acid reagent	Spray, heat at 120°C for 10 min on the CAMAG TLC Plate Heater, and let cool down to room temperature. Detection under white light.	yellow	6	6
Ninhydrin reagent	Spray, heat at 105°C for 3 min on the CAMAG TLC Plate Heater, let cool to room temperature. Detection under white light.	blue	3-4	4-5
Copper (II) sulfate reagent	Spray, heat the plate at 110°C for 10 min on the CAMAG TLC Plate Heater, let cool to room temperature. Detection under white light.	blue	3-4	4-5
Aniline – diphenylamine – phosphoric acid reagent	Spray, heat at 110°C for 10 min on the CAMAG TLC Plate Heater, let cool to room temperature. Detection under white light.	yellow	5-6	5-6
Vanillin – sulfuric acid reagent	Spray, heat at 100°C for 3 min on the CAMAG TLC Plate Heater, let cool to room temperature. Detection under UV 366 nm and white light.	yellow	3-4	4-5
Potassium hydroxide solution*	Spray, heat at 100°C for 2 min on the CAMAG TLC Plate Heater, let cool to room temperature. Detection under UV 366 nm and white light.	blue	3-4	4-5
Enzymatic test: Tyrosinase (enzyme and substrate in aqueous solutions)	Spray subsequently the appropriate volume of substrate solution and the appropriate volume of enzyme solution onto the plate. Incubate the plate for 10 minutes at room temperature in a closed box to prevent from drying (e.g. inside of the glass covered drawer of the BioCombiner). Dry the plate to $\leq 2\%$ relative humidity for 5 minutes in a desiccator or in the ASC-2 by using molecular sieve.	yellow	(1 mL)	nila

Recommendation to obtain optimal results: 20°C <math>< 25^\circ\text{C}</math> and 35% <math>< \text{relative humidity}</math> <math>< 45\%</math>
*) Recommended to use with the chemically resistant Ultra nozzle

14

7

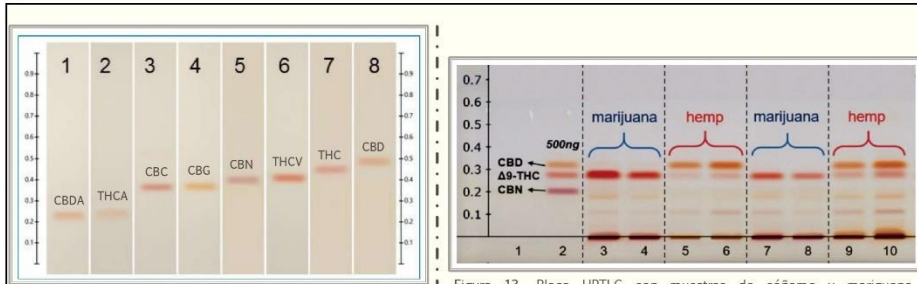


Figura 12. Coloración de cannabinoides posterior a la derivatización con FBB. (5)

Figura 13. Placa HPTLC con muestras de cáñamo y marihuana desarrollada y derivatizada con FBB. (2)

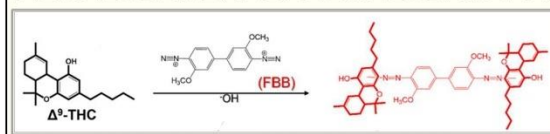


Figura 14. Formación del compuesto coloreado al derivatizar Δ9-THC con FBB. (6)

Derivatización de distintos cannabinoides usando Fast Blue B (FBB)

15

15

Videos sobre el funcionamiento de algunos módulos del HPTLC realizados por CAMAG

CAMAG Automatic TLC Sampler 4

- https://www.youtube.com/watch?v=lp3vWkuQoE&ab_channel=CAMAG

CAMAG Automatic Developing Chamber 2 (ADC 2)

- https://www.youtube.com/watch?v=hVmXQo8O2uM&ab_channel=CAMAG

CAMAG Derivatizer

https://www.youtube.com/watch?v=ZxLOYsxoGHU&ab_channel=CAMAG

visionCATS – CAMAG HPTLC Software


- https://www.youtube.com/watch?v=QNgtMLyGBtE&ab_channel=CAMAG

16

16

Software del equipo: VisionCATS

<div style="background-color: #4a5558; color: white; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Explore</div> <div style="background-color: #2d3728; color: white; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">HPTLC Steps</div> <div style="background-color: #2d3728; color: white; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Chromatography</div> <div style="background-color: #2d3728; color: white; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Data</div> <div style="background-color: #2d3728; color: white; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">SST</div> <div style="background-color: #2d3728; color: white; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Evaluation</div> <ul style="list-style-type: none"> · Definition · Integration · Subs assign · Calibration · Results 	<p>Sistema simple, amigable e interactivo</p> <hr/> <p>Permite monitoreo de cada etapa del proceso</p> <hr/> <p>Almacenamiento y gestión de métodos de análisis y los resultados obtenidos</p> <hr/> <p>Elaboración de reportes de resultados</p> <hr/> <p>Puede ejecutar métodos distintos en forma simultanea</p>
---	---



17

Software del equipo: VisionCATS

Explore

HPTLC Steps

Chromatography

Data

SST

Evaluation

- Definition
- Integration
- Subs assign
- Calibration
- Results

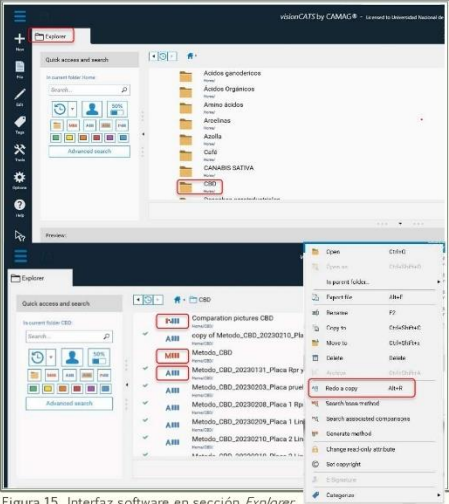


Figura 15. Interfaz software en sección Explorer.

18

Software del equipo: VisionCATS

Explore

HPTLC Steps

Chromatography

Data

SST

Evaluation

- Definition
- Integration
- Subs assign
- Calibration
- Results

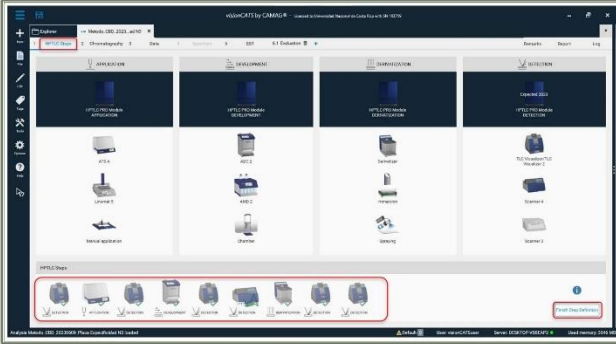


Figura 16. Interfaz software en etapa *HPTLC Steps* durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

19

Software del equipo: VisionCATS

Explore

HPTLC Steps

Chromatography

Data

SST

Evaluation

- Definition
- Integration
- Subs assign
- Calibration
- Results

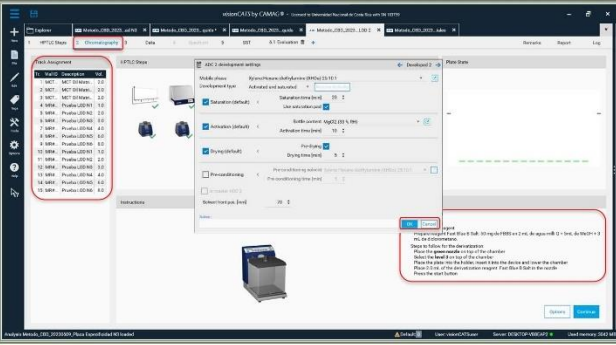


Figura 17. Instrucciones mostradas por el software para el módulo *"Derivatizer"* durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

20

Software del equipo: VisionCATS

- Explore
- HPTLC Steps
- Chromatography
- Data
- SST
- Evaluation
 - Definition
 - Integration
 - Subs assign
 - Calibration
 - Results

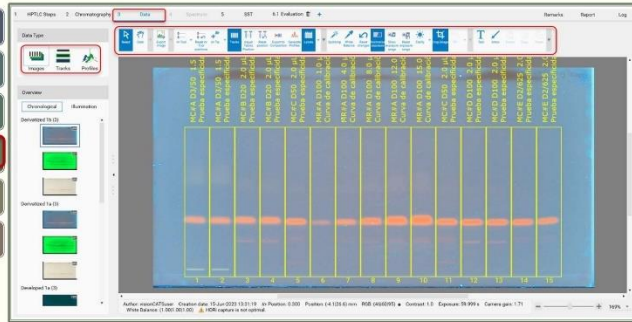


Figura 18. Datos adquiridos por el "TLC Visualizer 2" durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

21

21

Software del equipo: VisionCATS

- Explore
- HPTLC Steps
- Chromatography
- Data
- SST
- Evaluation
 - Definition
 - Integration
 - Subs assign
 - Calibration
 - Results

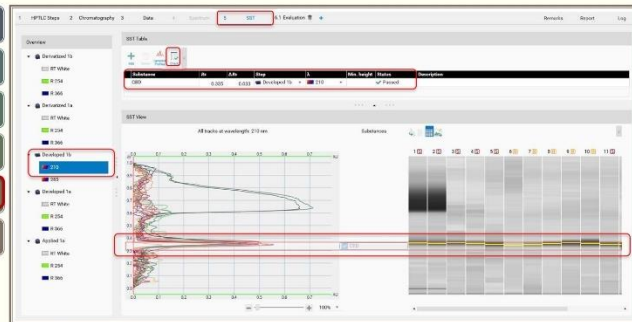


Figura 19. Análisis SST de los perfiles adquirido por el "TLC Scanner 4" durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

22

22

Software del equipo: VisionCATS

- Explore
- HPTLC Steps
- Chromatography
- Data
- SST
- Evaluation

- Definition
- Integration
- Subs assign
- Calibration
- Results

Figura 20. Definición de parámetros de las muestras y las referencias durante la etapa de evaluación de los datos obtenidos durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

23

Software del equipo: VisionCATS (*Report*)

Figura 21. Generación de reporte de resultados para la evaluación del parámetro de desempeño de especificidad durante la validación del método.

24

Materiales y equipos utilizados

Reactivos

Fase móvil:

- Dietilamina
- n-Hexano
- p-Xileno

Tratamiento de muestras:

- Metanol
- Acetato de etilo

Agente derivatizante

- Fast Blue B salt
- Diclorometano
- Agua desionizada
- Metanol

Materiales de referencia certificados

Muestras comerciales

Pipetas volumétricas varias capacidades

Balones aforados varias capacidades

Balanza analítica

Agitador vórtex

Viales de inyección 2 mL

Sistema HPTLC CAMAG

Placas Merck HPTLC Silica gel 60 F254 20 x 10 cm

Equipos

25

25

Metodología de análisis

"Procedimiento y condiciones de trabajo durante el análisis de muestras y estándares".

```

graph TD
    A1[Documentación imagen de fondo (A)] --> B[Deposición de las muestras sobre las placas (B)]
    B --> C[Desarrollo de las placas (C)]
    C --> A2[Visualización de placas desarrolladas (A)]
    A2 --> D[Determinación de la intensidad de los compuestos separados (D)]
    D --> E[Derivatización de la placa revelada (E)]
    E --> A3[Visualización de placas derivatizadas (A)]
    A3 --> F[Análisis de los resultados por medio del software del equipo (F)]
    
```

- "High performance thin-layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in cannabis extracts"

Figura 22. Módulos equipo HPTLC-CAMAG.

26

26

Condiciones de cada módulo

Unidad didáctica del taller
"Capacitación bimodal sobre un método de Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) para la determinación de Cannabidiol (CBD) en matrices comerciales presentes en el mercado nacional"

Cuadro 1. Condiciones operacionales etapa "Plate layout".

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Plate manufacturer	Meek	Application type	Band
			Band length: 3 mm
			Track distance: 11.4 mm
Stationary phase	HPTLC Silica gel 60 F ₂₅₄		Distance from left edge: 20 mm
Batch number	Revisar caja		Distance from lower edge: 8 mm
Plate format	20x10	Solvent front post (mm)	70

Cuadro 2. Condiciones operacionales etapa "TLC Visualizer 2 documentation settings (Clean 1a)".

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Image quality	Standard	R 366 ("2" Auto exposure)	✓
RT White ("2" Auto exposure)	✓	R 254 ("2" Auto exposure)	✓

Cuadro 3. Condiciones operacionales etapa "ATS 4 application settings (Applied 1a)".

Parámetro	Especificación
Sample solvent type	Methanol
Sample solvent type ("2" options)	Dosage speed (aL/s): 150
	Predosage volume (aL): 200
	Filling speed (aL/s): 150
	Filling vacuum time(s): 4
	Retraction volume (aL): 200
Rinsing vacuum time(s): 4	
Filling/rinsing quality	Standard
Rack type	Standard

Cuadro 4. Condiciones operacionales etapa "TLC Visualizer 2 documentation settings (Applied 1a)".

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Image quality	Standard	R 366 ("2" Auto exposure)	✓
RT White ("2" Auto exposure)	✓	R 254 ("2" Auto exposure)	✓

Figura 23. Condiciones operacionales de los módulos para el análisis de CBD por HPTLC. 27

27

Preparación por una doble dilución gravimétrica

Cuadro 4. Recomendaciones de factor de dilución y materiales según la cantidad de mg de CBD descrita en la etiqueta del producto.

Rango según cantidad de miligramos (mg) de CBD descritos en la etiqueta del producto	Factor de dilución recomendado	Materiales requeridos
[250 - 1500]	50	1 pipeta aforada 1mL (1D) 1 pipeta aforada 2 mL (2D) 2 balones aforados 10 mL
[1500 - 3000]	100	2 pipeta aforada 1mL 2 balones aforados 10 mL
[3000 - 8000]	200	2 pipetas aforadas 1mL 1 balón aforado 10 mL (1D) 1 balón aforado 20 mL (2D)

Cuadro 5. Ejemplo de cuadro recomendado para los datos relacionados a la dilución gravimétrica de muestras comerciales de aceites enriquecidos con extracto de cáñamo.

Código de muestra	Masa balón vacío (g)	Masa balón + alícuota (g)	Masa balón + disolución (g)	Disolvente
24-001 D10				
24-001 D50				

Documento en Drive "Procedimiento de pretratamiento de las muestras CBD HPTLC"

28

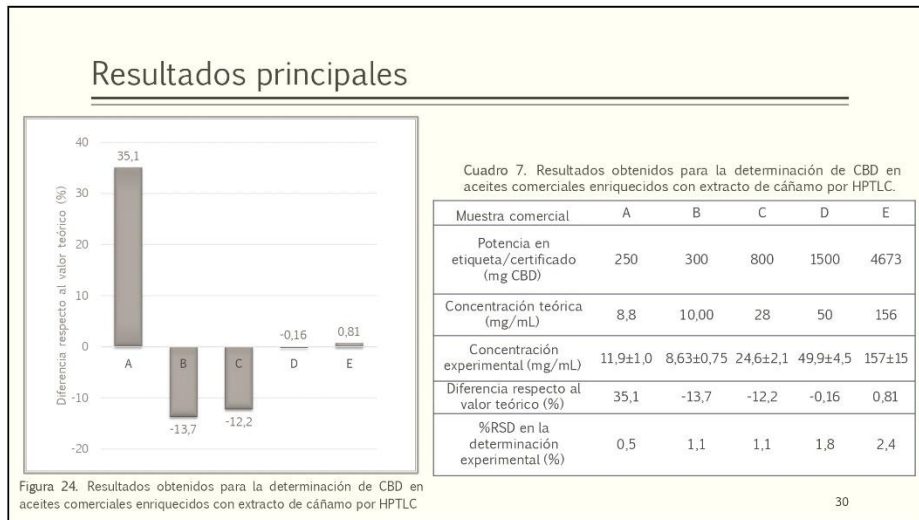
28

Cuadro 6. Parámetros de desempeño evaluados, modo de evaluación, criterios de aceptación y resultado para cada uno.

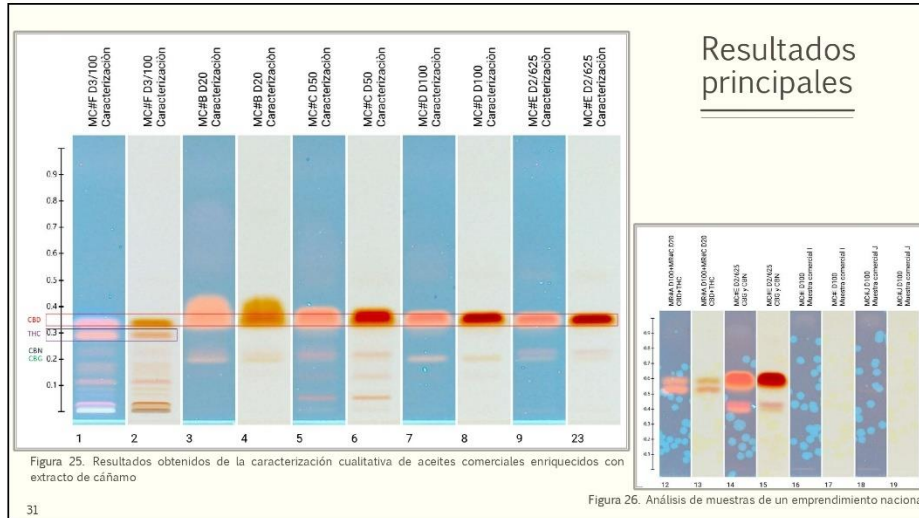
Parámetro evaluado	Modo de evaluación	Criterio de aceptación	Resultado
Estabilidad	HPTLC 10X10 en 2D de una solución preparada con 6 meses de antigüedad	No haya degradación visual del analito	No se observó degradación visual del analito
LD	a. Mínima cantidad de analito distingue del ruido b. Según curva de calibración	-	a. 22,6 ng b. 21,9 ng
LQ	a. Tres veces el LoD b. Según curva de calibración	-	a. 67,8 ng b. 66,3 ng
Ámbito	Evaluando la linealidad del método dentro del rango de concentraciones esperadas.	80% al 120% de la concentración esperada	112,2 ng - 1683,3 ng (68% al 126%)
Linealidad	Comprobación de linealidad dentro del ámbito de trabajo	a. $R > 0,998$, b. $V_{\text{no}} < 5\%$ c. CV% de la curva de calibración $< 5\%$ d. Ausencia de tendencia en los residuales	a. 0,99989 - 0,99996 b. 0,74% - 1,2% c. 0,52% - 1,1% d. Residuales presentan un comportamiento aleatorio en torno a cero
Especificidad	RF+/- SD de las referencias y "contaminantes" o sustancias cercanas que son ajenas al ensayo.	No se cruzan los ámbitos de las sustancias cercanas al analito	No se cruzan los RF+/- SD de las referencias y los contaminantes
Presición	Análisis de 10 repeticiones en el punto medio de la curva	CV% $< 3\%$	CV% = 1,3%
Repetibilidad	Análisis por triplicado de tres concentraciones diferentes dentro de la curva.	CV% $< 2\%$	0,32% (Cn baja) CV% = 0,45% (Cn media) 0,10% (Cn alta)
Exactitud	Muestras de concentración conocida enriquecidas a 3 niveles distintos,	% Recuperación 95-105	Cn baja = 102% Cn media = 99% Cn alta = 97%

Parámetros de desempeño evaluados durante la implementación y validación del método

29



30



31

31

Cuidados durante ejecución del método

Generales

- Ver video YouTube sobre la manipulación de los módulos.
- Manipular la placa usando guantes.
- Tocar únicamente el soporte de la placa, no la fase estacionaria.

TLC Visualizer 2

- Limpia suavemente la cámara y/o la placa si esta se encuentra sucia (partículas brillantes a 366nm).
- Mientras las lámparas de 254nm y 366nm se encuentran encendidas, evita abrir la puerta corredera del módulo.
- Posterior al desarrollo de la placa o la derivatización, no almacene la placa por mucho tiempo dentro del módulo.

Automatic TLC Sampler 4

- Colocar adecuadamente la placa sobre el soporte del módulo.
- Verificar que la palanca que sujeta la placa sobre el soporte se encuentre hacia abajo.
- Una vez finalizada la siembra de las muestras, realice un ciclo de lavado del módulo.

Automatic Developing Chamber 2

- Rotular papel de saturación para su reúso.
- Colocar en la parte superior del equipo con una servilleta al momento de adicionar la fase móvil dentro del módulo.
- Cubrir la cámara de vidrio del módulo hasta que se haya sumergido la placa en la fase móvil.

TLC Scanner 4

- Colocar la placa sobre la plataforma retráctil del equipo de forma correcta sin demorar mucho tiempo.
- Verifique que la plataforma retráctil se encuentra dentro del equipo antes de cerrar la puerta corredera.
- Revisar los perfiles adquiridos antes continuar con las siguientes etapas del análisis.

Derivatizer

- Colocar en la parte superior del módulo con una servilleta al momento de adicionar el agente derivatizante dentro del nozzle.
- Cubrir la cámara de plástico del equipo hasta que se haya finalizado la aspersión del agente derivatizante.
- Revisar periódicamente durante el análisis que no se formen gotas del agente derivatizante en la boquilla interna de nozzle.

32

32

Recomendaciones a implementar

Instalar capilla extracción de gases en el LIDETEC.

Polarizar o instalar persianas en las ventanas y puerta del laboratorio

Implementar un sistema de registro sobre el uso del sistema HPTLC.

Adquirir el complemento TLC Plate Heater 3 para calentamiento de placas derivatizadas.

Tener un juego de boquillas del Derivatizer de respaldo.

Permitir que el sistema HPTLC sea utilizado solo por usuarios calificados previamente capacitados



Figura 27. Sistema HPTLC-CAMAG de la Escuela de Química, Universidad de Costa Rica

33

33

Referencias bibliográficas

1. Ulloa, E. *Caracterización de Alternativas de Comercialización Internacional Del Cáñamo Industrial*; Costa Rica, 2020.
2. Liu, Y.; Brettell, T. A.; Victoria, J.; Wood, M. R.; Staretz, M. E. *High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) Analysis of Cannabinoids in Cannabis Extracts*. *Forensic Chemistry* 2020, 19, 100249. <https://doi.org/10.1016/J.FORC.2020.100249>.
3. CAMAG - YouTube. (n.d.). Recuperado el 5 de Febrero, 2024, de <https://www.youtube.com/@CAMAGcom/videos>
4. ICH. (2023). *Committee for Medicinal Products for Human Use ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures*. www.ema.europa.eu/contact
5. CAMAG. *Application note A-108.1: Identification and quantification of different cannabinoids in Cannabis sativa*. (2017). www.camag.com
6. Araujo dos Santos, N., Kerpel dos Santos, M., Almirall, J., & Romão, W. (2023). *Cannabinomics studies – A review from colorimetric tests to modern analytical techniques: Part II*. *Forensic Chemistry*, 33, 100477. <https://doi.org/10.1016/J.FORC.2023.100477>

34

34

Anexo 10. Unidad académica elaborada con los contenidos de la capacitación teórica. práctica sobre el uso del sistema HPTLC.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



Unidad didáctica del taller “*Capacitación bimodal sobre un método de Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) para la determinación de Cannabidiol (CBD) en matrices comerciales presentes en el mercado nacional*” impartido el 14 y 15 de febrero de 2024 por el Bachiller en Química Industrial Keilor Morales Alfaro.

Sección 1. Preguntas para contestar con base en los contenidos de la sesión teórica del taller.

1. Mencione una ventaja de la técnica HPTLC frente a las siguientes cromatografías convencionales:
 - a. TLC:
 - b. GC
 - c. HPLC
2. ¿De qué materiales puede ser el soporte de la placa para poder ser desarrollada en el módulo *Automatic Developing Chamber 2*?
3. Describa brevemente cual es la función del agente derivatizante durante el análisis.
4. ¿Con base en que parámetros se realiza selección del nozzle para el módulo *Derivatizer*?
5. En forma resumida, anote cual es la principal función de cada uno de los siguientes módulos que conforman el sistema HPTLC-CAMAG
 - a. TLC Visualizer 2
 - b. Automatic TLC Sampler 4
 - c. Automatic Developing Chamber 2
 - d. TLC Scanner 4
 - e. Derivatizer
6. Mencione dos de los cuidados que se deben tener cuando se realiza la cuantificación de CBD por HPTLC.

Sección 2. Metodología de análisis que será utilizada durante la sesión demostrativa de la técnica y el método.

En la sesión práctica del taller, el facilitador realizará una demostración analizando de forma cualitativa y cuantitativa muestras comerciales con extractos de cáñamo que se comercializan a nivel nacional. Para lo cual, a continuación se describirán las instrucciones e indicaciones relacionadas al uso adecuado del equipo, la visualización y análisis de los resultados obtenidos, así como recomendaciones y cuidados a tener en consideración durante la ejecución de la técnica.


En la figura 1, se muestra un diagrama del proceso general de forma secuencial, el cual fue adaptado según las metodologías descritas en el artículo científico “*High performance thin-layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in cannabis extracts*” y la nota de aplicación A108.1 emitida por CAMAG que tiene como título “*Identification and quantification of different cannabinoids in Cannabis sativa*”, a las cuales se les realizaron modificaciones según el comportamiento observado durante el desarrollo y validación de la metodología.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA




Figura 1. Diagrama general del proceso de análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

1. Inicialmente, cuando se llega al laboratorio donde se encuentra localizado el sistema HPTLC-CAMAG, se recomienda encender todos los módulos que van a ser utilizados durante el análisis, esto para que los mismos inicien sus procesos automáticos de calentamiento y ajustes.
2. Posteriormente, se debe abrir la llave de los gases que se encuentra ubicada a la izquierda del módulo *Automatic TLC Sampler 4*, ya que el mismo requiere un flujo de gas para la siembra de las muestras en la placa, la llave debe estar en dirección de la tubería para verificar que esté abierta.
3. De la misma forma, es necesario sacar las diluciones de las muestras comerciales y disoluciones patrón almacenadas en refrigeración previo al análisis ya que estas deben estar a temperatura ambiente al momento de ser utilizadas. Una vez se encuentren a temperatura ambiente, se recomienda agitar las mismas en agitador vórtex para asegurar la homogeneidad de las mismas. No obstante, si las muestras comerciales de aceites con extracto de cáñamo no se encuentran previamente tratadas, pueden ser preparadas con el procedimiento descrito en la sección “*Preparación de muestras comerciales*”, disponible en la sección de anexos al final de este documento.
4. Preparados los materiales necesarios, proceda a abrir software visionCATS , cuyo acceso directo se encuentra ubicado en el escritorio del ordenador del sistema HPTLC-CAMAG.
5. Una vez abierto el software, proceda a seleccionar la carpeta llamada “*CBD*”, en la cual se encuentran todos los análisis y métodos relacionados a este tipo de matriz.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



6. Seguidamente, cargue el método de análisis de CBD identificado con el siguiente logo , se desplegará una pestaña llamada “*HPTLC Steps*” con la secuencia de módulos necesarios para el análisis de CBD por HPTLC, dicha secuencia se encuentra representada en la figura 1. Posteriormente, en la esquina inferior derecha de la pantalla verá un botón con el mensaje “*Execute Method*”, selecciónelo para iniciar el método donde deberá introducir el nombre del ensayo, se recomienda especificar un nombre descriptivo de la prueba que incluya la fecha en la que se realiza el análisis, como por ejemplo “*Metodo_CBD_20230511_Placa Precision*”.
7. Se abrirá una nueva pestaña en el software con el nombre del ensayo, la cual a su vez posee subpestañas con las etapas generales del análisis. Dirijase a la que tiene el nombre “*Chromatography*”, en la cual verá los iconos de los módulos que serán utilizados en cada etapa del análisis, al hacer click sobre cada uno de ellos, se desplegará una ventana emergente con los parámetros operacionales de cada módulo. Debido a que se cargó un método previamente creado, las condiciones operacionales para el análisis de CBD ya se encuentran preestablecidas, no obstante, se recomienda que las mismas sean verificadas. En la sección de “*Anexos*” al final de este documento, se encuentra una serie de cuadros que contienen los parámetros operacionales requeridos para cada módulo.
8. Una vez verificadas las condiciones operacionales de los módulos, se procede a crear la secuencia de análisis, para lo cual, en la misma subpestaña de “*Chromatography*” seleccione la tabla llamada “*Track Assignment*”, en la cual deberá indicar el nombre de la muestras (Vial ID), la ubicación de las mismas dentro del “*Automatic TLC Sampler 4*” (Tr), una breve descripción de la muestra (Description), el tipo de muestra (Type: Sample, Blank, Reference) y el volumen de aspersión de la muestra sobre la placa.
9. Tome placa HPTLC utilizando guantes y realice una inspección visual de la misma, esto para verificar que no se encuentre dañada. Si se observa la placa en buenas condiciones, introduzca la placa en el módulo “*TLC Visualizer 2*” y haciendo uso de los botones frontales del equipo seleccione las opciones 366 y 254 para ver la placa a estas longitudes de onda y verificar que esta no se encuentra contaminada.
10. Si la placa se encuentra en buenas condiciones, en la esquina superior derecha de la misma, proceda a escribir suavemente con un lápiz la fecha, nombre del análisis y las iniciales del analista, esto para que posteriormente las imágenes generadas durante el análisis puedan ser manejadas e identificadas al análisis que corresponden.
11. Antes de ejecutar el método e iniciar el análisis, se recomienda realizar un lavado del módulo “*Automatic TLC Sampler 4*” para evitar posibles contaminaciones cruzadas con el último análisis que se ejecutó, para lo cual se debe verificar el volumen del frasco de lavado (debe contener al menos 100mL de Metanol grado HPLC) y el volumen del frasco de desecho (no debe exceder el 80% de su capacidad). Una vez revisados los frascos, en la parte frontal del módulo presione el botón “*END*” y seguidamente el botón “*ENTER*” para que el módulo de forma automática haga un lavado del sistema de mangueras y jeringa.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



12. El software del equipo fue diseñado de una forma que resulta muy amigable e interactiva con el usuario, por lo cual en la subpestaña de “Chromatography”, en la sección de “Instructions” se mostrará las indicaciones paso por paso en cada módulo como se muestra en la figura 2 para el módulo del “Derivatizer”. Por lo tanto, una vez iniciado el análisis, solo debe seguirse la serie de pasos que se mostraran en pantalla para cada módulo, no obstante, en la siguiente sección llamada “Consideraciones adicionales” se enlistará una serie de cuidados y recomendaciones para cada módulo con el objetivo que se realice un correcto uso de los mismos.

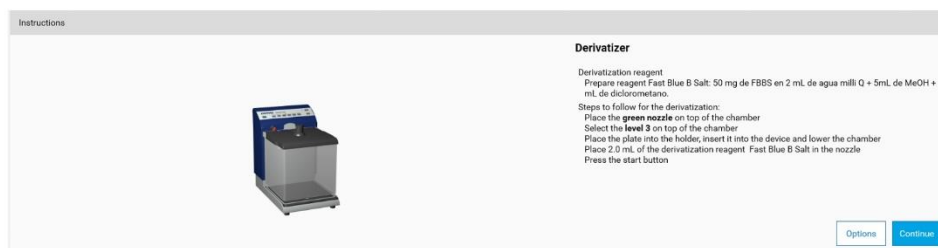


Figura 2. Instrucciones mostradas por el software para el módulo “Derivatizer” durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

Sección 3. Consideraciones adicionales

1. Generales

- Se recomienda a los analistas ver una serie de videos en YouTube sobre el funcionamiento de los módulos, estos se encuentran disponibles en el canal de YouTube del fabricante del equipo. En la sección de Anexos al final de este documento se adjuntan los enlaces de dichos videos.
- Procure manipular la placa siempre utilizando guantes de laboratorio, ya que sobre la placa podrían quedar residuos de grasa los cuales al tomar fotos o escáneres podrían ocasionar interferencias.
- Al manipular la placa, procure hacerlo únicamente sosteniendo o tocando el soporte de aluminio, plástico o vidrio para no alterar la fase estacionaria de la placa.

2. TLC Visualizer 2

- Si al tomar las fotografías con el módulo se observan muchas partículas brillantes en la cámara o sobre la placa, haciendo uso de un trozo de papel toalla suave frote ligeramente sobre la superficie contaminada para retirar la suciedad.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



- c. Una vez finalizado la adquisición de perfiles con el módulo, antes de seguir a la etapa siguiente se pueden previsualizar los datos obtenidos, si en los perfiles se observa que la línea base es completamente plana (sin ruido) y los picos se observan cortados, rechace los resultados y rehaga el paso hasta que no se presenten estos fenómenos. Esto se puede evitar encendiendo de forma conjunta todos los módulos que van a ser utilizados para propiciar una mejor comunicación de los mismos.
6. Derivatizer
- a. Al momento de añadir el agente derivatizante dentro del nozzle, coloque un trozo de papel toalla junto al nozzle para que en caso de un derrame, no se dañe el módulo. La adición debe hacerse de forma rápida pero adecuada, una vez añadido el agente derivatizante, coloque la tapa del nozzle e inicie rápidamente la aspersión.
 - b. Cubra la cámara de aspersión plástica para proteger el sistema de fuentes de luz, ya que algunos agentes derivatizantes presentan compuestos fotosensibles, lo que puede generar resultados diferentes a los esperados o en su defecto que se marque/manche la placa por este efecto.
 - c. Durante la aspersión del agente derivatizante se recomienda observar la boquilla interior del nozzle para verificar que no se formen gotas del agente derivatizante que al acumularse pueden caer sobre la placa manchando la misma.

Sección 4. Visualización de los resultados

1. Posterior al uso de los módulos “*TLC Visualizer 2*” y “*TLC Scanner 4*” en las respectivas etapas del proceso de análisis, en la subpestaña llamada “*Data*” se pueden observar los resultados obtenidos para cada etapa (véase figura 3). En la sección llamada “*Images*” se desplegarán las fotografías adquiridas por el “*TLC Visualizer 2*”, a las cuales por medio de la barra de herramientas sobre imagen capturada por equipo, se puede añadir la información relacionada a las muestras, factores de retención (Rf), modificación de la exposición y claridad de la imagen, así como la exportación de las misma como un archivo descargable.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



Figura 3. Datos adquiridos por el “TLC Visualizer 2” durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

2. Por su parte, en la sección denominada “Tracks”, se pueden observar para cada muestra una imagen comparativa de las fotografías adquiridas en cada etapa, permitiendo analizar de forma conjunta las bandas de una muestra en luz blanca, a 254nm y 366nm juntas.
3. En la sección “Profiles”, se pueden acceder a los cromatogramas crudos obtenidos por el “TLC Scanner 4” a las longitudes de onda indicadas en la especificación de los parámetros operacionales del mismo, no obstante, en esta sección también se pueden observar los perfiles generados a partir de las fotografías tomadas con el “TLC Visualizer 2”. Los perfiles y cromatogramas crudos obtenidos pueden verse de forma individual para cada muestra o en su defecto todos juntos para observar el comportamiento general de los resultados obtenidos (véase figura 4). De la misma forma, haciendo uso de la barra de herramientas para sección, se puede cambiar la forma de visualización de los datos obtenidos, así como la exportación de los mismos en formato de imagen descargable.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



Figura 4. Perfiles adquiridos por el “TLC Scanner 4” durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

Sección 5. Evaluación de los resultados

1. Posterior a la visualización de los datos, se procede a seleccionar la subpestaña denominada “SST”, lo cual significa “System Suitability Testing” y se realiza para verificar que el método analítico es adecuado para el propósito previsto el día en que se realizó el análisis. En esta sección se indica cuáles resultados obtenidos en una etapa en específico serán utilizados para realizar el análisis cuantitativo de los analitos de interés (véase figura 5). En este análisis se seleccionan los datos obtenidos con el “TLC Scanner 4” a 210nm. De la misma forma, en esta sección se debe añadir el nombre de la sustancia de interés (CBD), el factor de retención teórico en el que se prevé que se encuentra el analito (R_f 0,335 obtenido en la visualización de los resultados), el ΔR_f que es un parámetro de apertura en la cual el software va a identificar los picos en dicho rango como en analito indicado (suele ser un 10% del R_f de la referencia), el paso y la longitud de onda de los cuales se obtuvieron los datos. Indicado lo anterior, el equipo procederá a buscar el analito en cada track al seleccionar la opción “Check”, si logra identificar las señales en los tracks de las muestras y de las referencias, se habilita la siguiente sección llamada “Evaluation”.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA

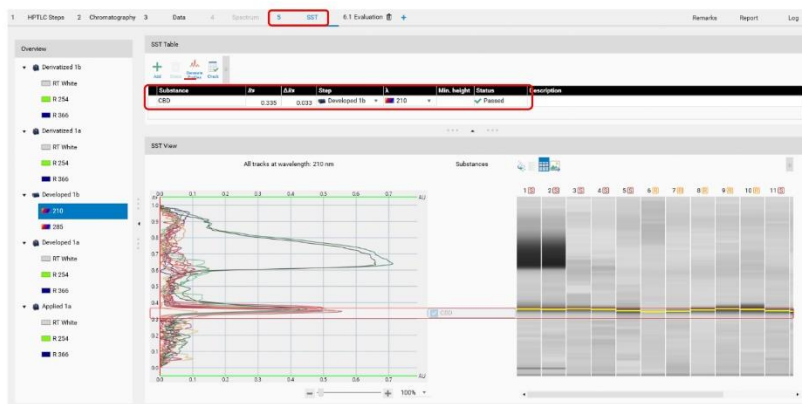


Figura 5. Análisis SST de los perfiles adquirido por el “TLC Scanner 4” durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

- Una vez aprobada la subpestaña “SST”, se pasa a la sección “Evaluation” (véase figura 6), en la cual se realizará una serie de pasos para realizar la cuantificación de los analitos presentes en las muestras.
- En el primer paso llamado “Definition” se procede a introducir los datos del analito añadidos en el “SST” junto con el tipo de calibración (Área o Altura), modo de calibración (Linear-1, Linear-2, Polinomial-1, Polinomial-2, Mime-1 y Mime-2) y el rango de desviación. Para este análisis debido a la literatura consultada y al comportamiento del analito, se selecciona “Area” como tipo de calibración y “Linear 2” como modo de calibración. En este paso se vuelve a desplegar la lista de tracks de las sustancias sembradas en la placa, donde se puede modificar el tipo de track, lo cual es importante definir correctamente ya que las indicadas como “Reference” serán utilizadas para generar la curva de calibración y las indicadas como “Sample” serán interpretadas por el equipo para la emisión de resultados. En esta misma ventana, en la parte inferior se observan dos pestañas, “References” y “Samples”, en la primera se debe indicar la concentración del analito del Vial ID del material de referencia en las unidades de concentración seleccionadas. Por su parte, en “Samples” se puede indicar información de la muestra como el factor de dilución aplicado en el pretratamiento de la muestra y de esta forma el software lo puede tomar en consideración al dar la concentración final del analito en la muestra analizada.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA

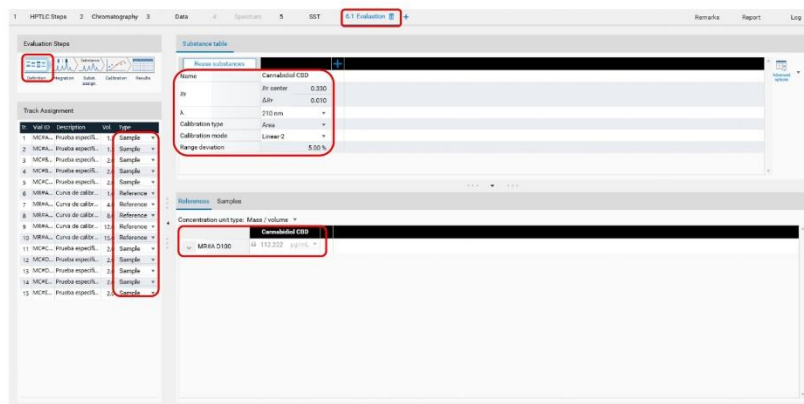


Figura 6. Definición de parámetros de las muestras y las referencias durante la etapa de evaluación de los datos obtenidos durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

4. En el siguiente paso llamado “*Integration*” se realiza la integración de cada cromatograma obtenido para los resultados adquiridos (véase figura 7), donde, como se mencionó anteriormente, se selecciona los resultados obtenidos con el “*TLC Scanner 4*” a 210nm (etapa Developed 1b). Se procede a seleccionar uno por uno cada track, donde se despliega para cada una una lista con todos los picos para dicho track, así como la información relacionada a cada pico. El software permite realizar la integración de varias formas (*Easy*, *Manual* y *Expert*), la seleccionada para este análisis fue “*Manual*” con la cual se puede asignar de forma más específica el inicio y final de cada pico. Una vez integrados los picos tanto de las muestras como de las referencias, si el Rf máximo del pico concuerda con lo establecido en la sección de “*Definition*”, el software le asigna la identidad del analito, con lo cual, con base en el área o altura de la señal, será la magnitud del resultado para dicha muestra.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA

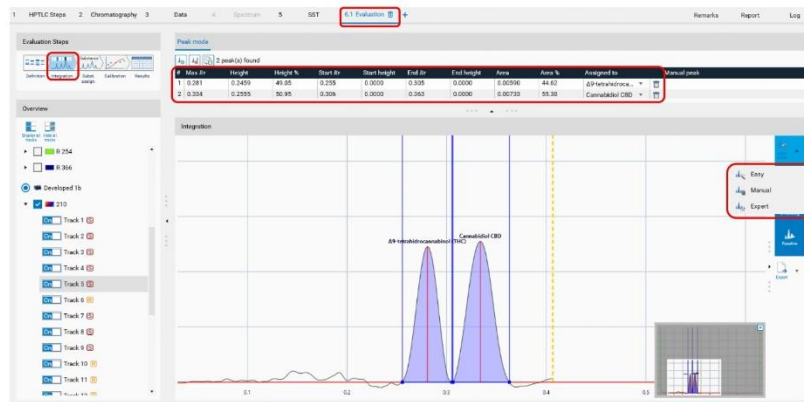


Figura 7. Integración de los perfiles en la etapa de evaluación durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

5. Por su parte, en el paso “Subst assign” se muestra de forma general la información relacionada de cada referencia junto con una inspección visual de la asignación de cada referencia a bandas en cada track analizado (véase figura 8). En la sección “Substance Table”, se muestra el factor de retención requerido (especificada por el analista en “Definition”) y el factor de retención encontrado por el equipo para cada analito especificado.

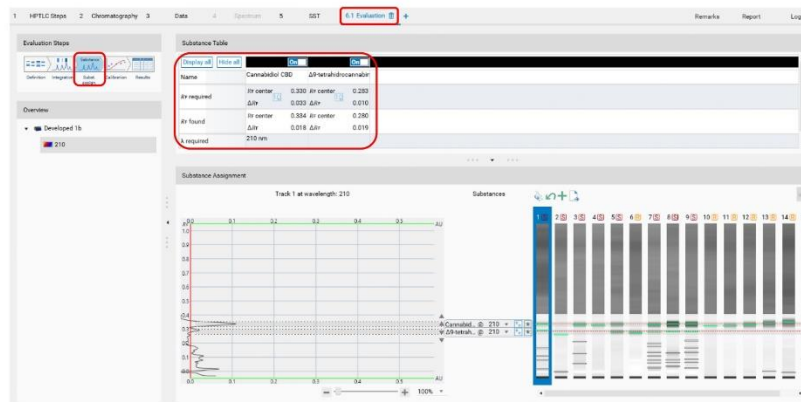


Figura 8. Asignación de las sustancias a los perfiles en la etapa de evaluación durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



6. En el siguiente paso llamado “*Calibration*”, se muestra la información de la curva de calibración generada a partir de los datos obtenidos y el procesamiento de los mismos en las etapas previas (véase figura 9). Una vez integrado y asignado adecuadamente los picos en el paso “*Integration*”, dependiendo del comportamiento de la sustancia, la integración se realiza con base en el área de pico o su respectiva altura, en el caso en estudio, se selecciona el área debido a la literatura consultada y al comportamiento de los analitos frente a los modelos de regresión. Como se mencionó anteriormente, la regresión se puede realizar por medio de distintos modelos matemáticos, la selección de este se realiza con base en el “*Coefficient of variation of the calibration function*” (se busca el menor valor posible), el “*Correlation coefficient*” (el número sea lo más cercano posible a 1) y la curva de calibración con su respectiva ecuación o función que muestra el software al momento de seleccionar cada uno de ellos, donde el modelo Linear-2 fue el que ofreció mejores valores. Como se puede observar en la figura 9. En la sección “*Overview*”, se despliega una tabla con los tracks del análisis, en los cuales se muestra la cantidad de analito en unidades de masa contenido en la muestra diluida analizada junto con el valor del área de pico al que se le asignó la identidad de la referencia. En dicha tabla cabe destacar, que se muestran los tracks de las referencia en verde, las muestras cuantificadas en azul y las muestras que se salieron de la curva de calibración en gris.

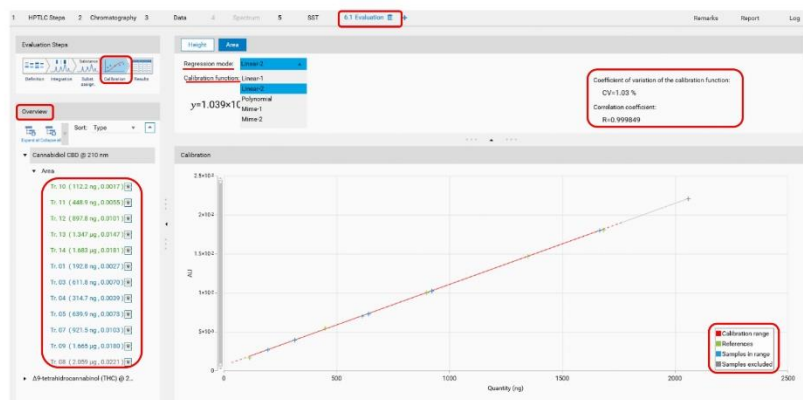


Figura 9. Curva de calibración obtenida en la etapa de evaluación durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



- Finalmente, al seleccionar el paso “Results” se mostrará una tabla interactiva con los resultados para cada track al que se le adjudicó el tipo “Sample” (véase figura 10). Para cada muestra cuantificada se muestran los datos de concentración promedio, coeficiente estándar de variación y el recuento de asignaciones, esto según los resultados obtenidos para cada réplica de la muestra en el caso de que se haya realizado más de una medición de esta. Al hacer click en la flecha con dirección hacia abajo ubicada al lado izquierdo del nombre de cada muestra, se desplegará el volumen de aspersión realizado sobre la placa y la información individual de cada réplica (Rf, concentración del analito y cantidad de este). Cabe destacar que estos pueden ser exportados en un archivo CSV para el análisis de los mismos en herramientas ajenas al equipo.

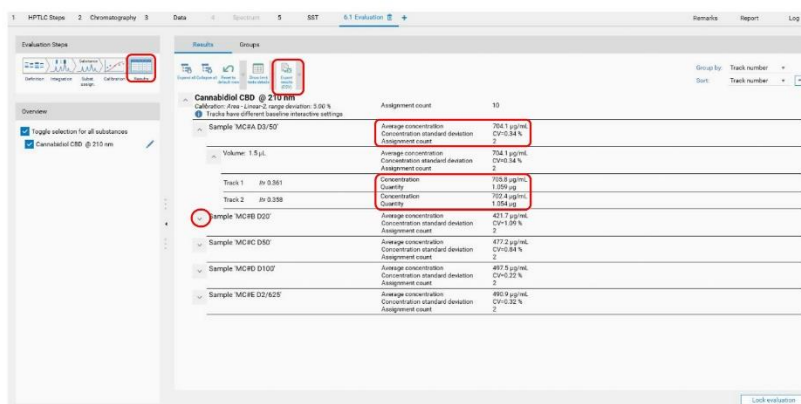


Figura 10. Visualización de los resultados obtenidos en la etapa de evaluación durante el análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

- Una vez finalizado el análisis y la evaluación de los datos obtenidos en el mismo, si el analista lo desea puede generar un informe con la información del método y los resultados que este considere necesario extraer del equipo disponible en la sección “Settings”. A esta opción de generación de reportes se accede al seleccionar la sección “Report” ubicada a la esquina superior derecha dentro de la pestaña del método (véase figura 11).



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA

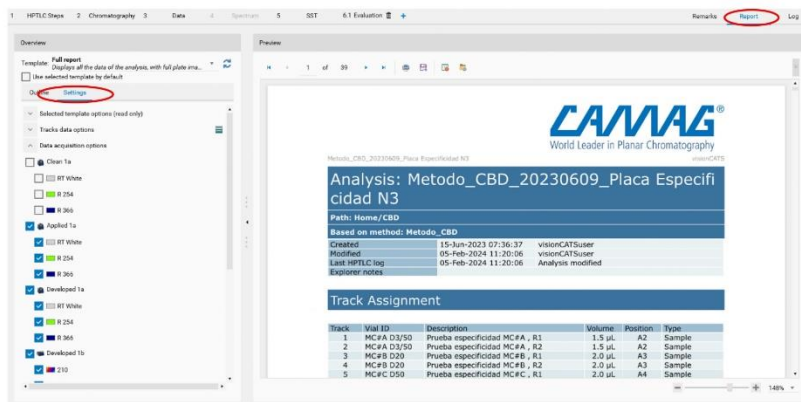


Figura 11. Generación del informe de resultados pertinente al análisis de CBD por HPTLC en muestras de aceites comerciales enriquecidas con extracto de cáñamo.

Sección 6. Anexos

1. Videos en YouTube sobre el funcionamiento de los módulos:
 - 1 CAMAG Automatic TLC Sampler 4
(https://www.youtube.com/watch?v=lpu3vWkuQoE&ab_channel=CAMAG)
 - 2 CAMAG Automatic Developing Chamber 2 (ADC 2)
(https://www.youtube.com/watch?v=hVmXQo8O2uM&ab_channel=CAMAG)
 - 3 CAMAG Derivatizer
(https://www.youtube.com/watch?v=ZxLOYsxxg0HU&ab_channel=CAMAG)
 - 4 visionCATS – CAMAG HPTLC Software
(https://www.youtube.com/watch?v=QNgtMLyGBtE&ab_channel=CAMAG)

2. Preparación de muestras comerciales

Para el proceso de pretratamiento de las muestras comerciales se realizó un documento aparte con una serie de instrucción y directrices detalladas. El analista puede acceder a dicho documento por medio del siguiente enlace:

<https://drive.google.com/file/d/1bDYxSwcFl5cKpFuyPJ-5elxssLRvIPA8/view?usp=sharing>



**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA**



3. Preparación de la fase móvil

La fase móvil debe prepararse en una capilla de extracción de gases una vez que haya terminado el proceso de siembra de las muestras sobre la placa, ya que si esta se prepara con mucha antelación, la composición de la misma podría variar por la volatilización de los componentes de la misma, influyendo en la repetibilidad y reproducibilidad del método si este se replica en días diferentes.

- a. En un frasco de 100 mL o un Erlenmeyer de 100 mL limpio y seco, añada 35 mL de p-Xileno utilizando una probeta de 50mL.
- b. Al recipiente anterior adicione 14 mL de n-Hexano con una probeta de 15 mL. Agite bien la mezcla.
- c. Seguidamente agregue 1,4 mL de dietilamina por medio de una pipeta graduada de 2 mL. Tape el recipiente con una tapa o con papel parafina y agite para homogeneizar la mezcla.

4. Preparación del agente derivatizante

Prepare el agente derivatizante fresco al momento de introducir la placa al “*Derivatizer*”, para lo cual siga las siguientes instrucciones:

- 1 En un frasco de 15 mL limpio y seco, agregue 50mg del reactivo sólido Fast Blue B Salt medidos con balanza analítica.
- 2 Al frasco añada 2 mL de agua Milli Q con micropipeta y agite bien hasta que se disuelva completamente el sólido, puede ayudarse de un agitador vórtex.
- 3 Seguidamente adicione 5 mL de metanol con micropipeta a la mezcla anterior y nuevamente agite bien para homogeneizar la mezcla.
- 4 Añada 3 mL de diclorometano al frasco usando una micropipeta y mezcle bien.
- 5 Finalmente tape el frasco con una tapa o papel parafina y proteja al mismo de fuentes de luz para evitar la descomposición del mismo.

5. Parámetros operacionales de cada módulo durante el análisis de CBD por HPTLC



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



Cuadro 1. Condiciones operacionales etapa "Plate layout".

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Plate manufacturer	Merk	Application type	Band
			Band length: 8 mm,
			Track distance: 11.4 mm
			Distance from left edge: 20 mm
Stationary phase	HPTLC Silica gel 60 F ₂₅₄		Distance from lower edge 8 mm
Bach number	Revisar caja		
Plate format	20x10	Solvent front post (mm)	70

Cuadro 2. Condiciones operacionales etapa "TLC Visualizer 2 documentation settings (Clean 1a)".

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Image quality	Standard	R 366 (">" Auto exposure)	✓
RT White (">" Auto exposure)	✓	R 254 (">" Auto exposure)	✓

Cuadro 3. Condiciones operacionales etapa "ATS 4 application settings (Applied 1a)".

Parámetro	Especificación
Sample solvent type	Methanol
Sample solvent type (">" options)	Dosage speed (nL/s) : 15
	Predosage volume (nL) : 200
	Filling speed (uL/s) : 150
	Filling vacuum time(s): 4
	Retraction volume (nL): 200
	Rinsing vacuum time(s): 4
Filling/rinsing quality	Standard
Rack type	Standard

Cuadro 4. Condiciones operacionales etapa "TLC Visualizer 2 documentation settings (Applied 1a)".

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Image quality	Standard	R 366 (">" Auto exposure)	✓
RT White (">" Auto exposure)	✓	R 254 (">" Auto exposure)	✓



**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA**



Cuadro 5. Condiciones operacionales etapa “ADC 2 development setting (Developed 1)”.

Parámetro	Especificación
Mobile phase	Xylene:Hexane:diethylamine (XHDa) 25:10:1
Development type	Activated and saturated
Saturation (user)	Saturation time (min): 25
	Use saturation pad: ✓
Activation (user)	Bottle content: MgCl ₂ (33% HR)
	Activation time (min): 15
Drying (default)	Pre-drying: ✓
	Drying time (min): 5

Cuadro 6. Condiciones operacionales etapa “TLC Visualizer 2 documentation settings (Developed 1a)”.

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Image quality	Enhanced	R 366 HDRI (“>” Auto exposure)	✓
RT White (“>” Auto exposure)	✓	R 254 (“>” Auto exposure)	✓

Cuadro 7. Condiciones operacionales etapa “TLC Scanner 4 settings (Developed 1b)”.

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Scanner type	Multiple λ	Wavelength selection	Selection: User
Optimization for	Resolution		Lamp: Deuterium & Tugsten
Measurement mode	Absorbance		Start λ: 190
Detector mode	Automatic		End λ: 450
Speed/resolution/slit	HPTLC		Number of λ: 6
	Scanning speed: 200 mm/s		Increment: 50
	Data resolution: 100 um/step		Wavelengths applied: 210 y 285 nm
	Start: 4.9 mm		-
	End: 73.1 mm		-
	Slit: 5 x 0.2 mm, micro		-

Cuadro 8. Condiciones operacionales etapa “Derivatizer setting (Derivatized 1)”.

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Reagent name	Fast Blue B Salt	Nozzle	green
Reagent volume (mL)	2		
Reagent preparation	50 mg FBBS + 2 mL agua Milli Q + 5 mL MeOH + 3 mL diclorometano	Spraying level	3



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOREFINERÍA



Cuadro 9. Condiciones operacionales etapa “TLC Visualizer 2 documentation settings (Derivatized 1a)”.

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Image quality	Enhanced	R 366 HDRI (">" Auto exposure)	✓
RT White (">" Auto exposure)	✓	R 254 (">" Auto exposure)	✓

6. Referencias bibliográficas

- 1 CAMAG. (2017). *Application note: Identification and quantification of different cannabinoids in Cannabis sativa*. www.camag.com
- 2 Liu, Y., Brettell, T. A., Victoria, J., Wood, M. R., & Staretz, M. E. (2020). *High performance thin-layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in cannabis extracts*. Forensic Chemistry, 19, 100249. <https://doi.org/10.1016/J.FORC.2020.100249>
- 3 CAMAG - YouTube. (n.d.). Recuperado el 5 de febrero, 2024, de <https://www.youtube.com/@CAMAGcom/videos>

Anexo 11. Evidencia fotográfica sobre la ejecución de la capacitación bimodal teórica práctica sobre el uso del sistema HPTLC.



Figura 1. Captura de pantalla adquirida al inicio de la sesión virtual de la capacitación impartida por medio de la plataforma Microsoft Teams el 14 de febrero del 2024.

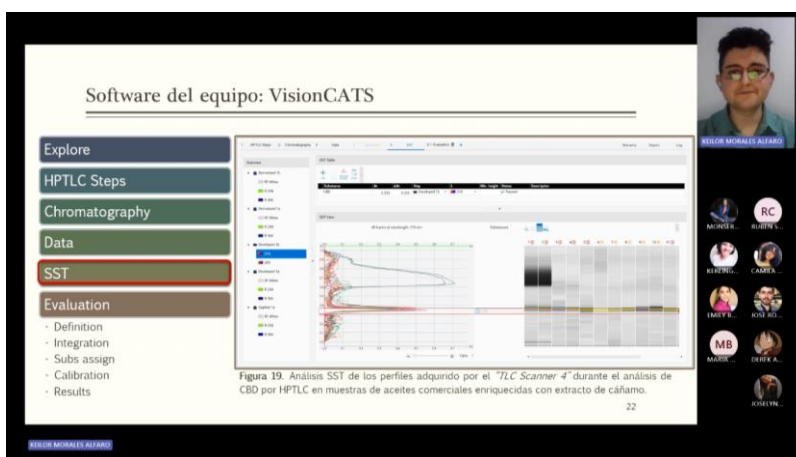


Figura 2. Captura de pantalla adquirida a la mitad de la sesión virtual de la capacitación impartida por medio de la plataforma Microsoft Teams el 14 de febrero del 2024.

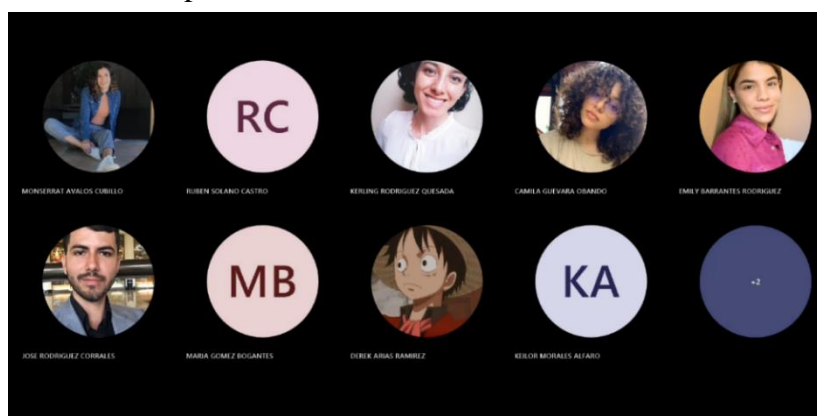


Figura 3. Captura de pantalla adquirida de los participante de la sesión virtual de la capacitación impartida.



Figura 4. Sesión demostrativa sobre el uso adecuado del sistema HPTLC desarrollada el 15 de febrero de 2024 en las instalaciones del LIDETEC, etapa de desarrollo de la placa.

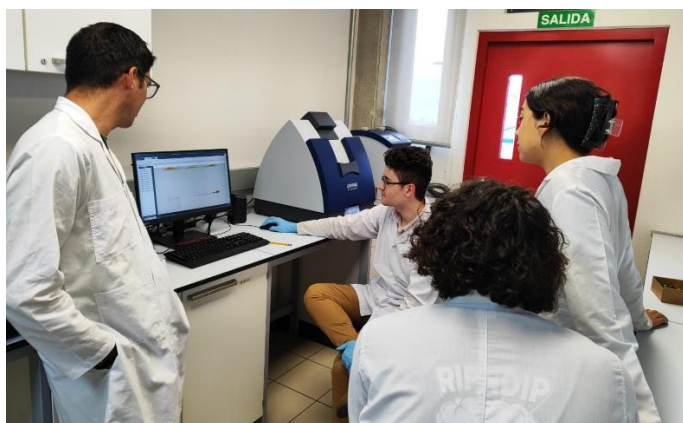


Figura 5. Explicación sobre la visualización de los datos durante la sesión demostrativa desarrollada el 15 de febrero de 2024 en las instalaciones del LIDETEC (grupo 1).



Figura 6. Explicación sobre el uso software visionCATS durante la sesión demostrativa desarrollada el 15 de febrero de 2024 en las instalaciones del LIDETEC (grupo 2).

Anexo 12. Respuestas obtenidas por los participantes de la capacitación teórica práctica sobre el uso del sistema HPTLC al formulario de participación.

Formulario de participación del taller teórico-práctico sobre el uso del equipo HPTLC impartido por el Bachiller en Química Industrial Keilor Morales Alfaro.

10 respuestas

[Publicar datos de análisis](#)

1. Nombre completo del participante del taller

10 respuestas

Rubén Leonardo Solano Castro

Kerling Rodríguez Quesada

Joselyn Stacy Mora Badilla

Camila Guevara Obando

María Belén Gómez Bogantes

Derek Alberto Arias Ramírez

Melany Ulate Salas

José Ángel Rodríguez Corrales

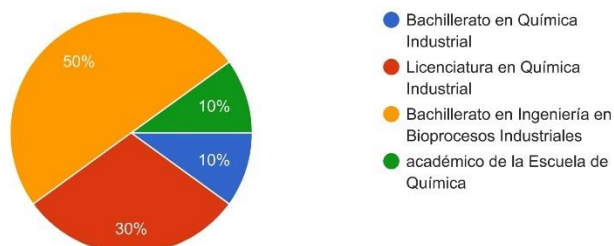
Emily Barrantes Rodríguez

Montserrat Ariela Ávalos Cubillo

2. ¿A qué carrera de la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Costa Rica pertenece?

 Copiar

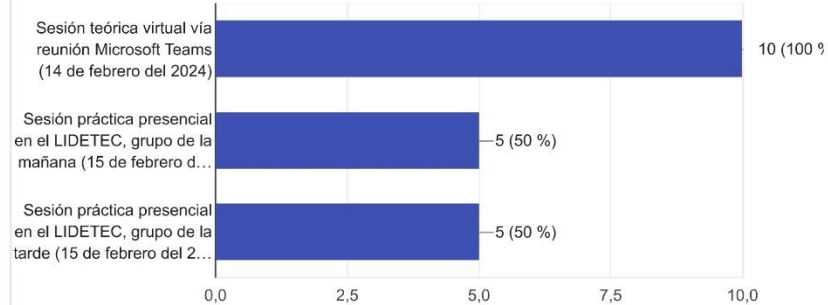
10 respuestas



3. ¿A cuáles sesiones pudo asistir?

 Copiar

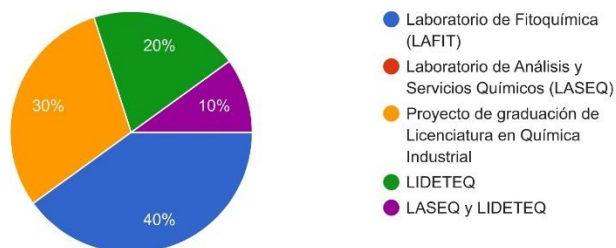
10 respuestas



4. ¿A qué laboratorio de la escuela de química presenta una afiliación o proyecto?

 Copiar

10 respuestas



5. ¿Qué expectativas tenía del taller?

10 respuestas

Esperaba las instrucciones mínimas para su correcta manipulación

Que aclarara las dudas técnicas que surgían sobre el uso del equipo y de las distintas funciones del software, principalmente de este último, pues desconocía muchas de las herramientas que pueden ser de utilidad para mi proyecto de graduación.

Pensé que iba a ser más básico y en realidad el muchacho explicó demasiado bien y a detalle cada paso del procedimiento

Aprender más del software

Aprender las funciones básicas del equipo y cómo manejarlo

No sabía nada al respecto

Aprender a utilizar correctamente el equipo de HPTLC CAMAG

Una experiencia práctica y realista

Comprender en general el uso del equipo HPTLC/CAMAG, para desarrollo del proyecto de graduación y como nueva herramienta de análisis.

Aprender del uso de esta técnica



6. ¿Qué le pareció el taller de capacitación?

10 respuestas

Estuvo muy bien, se cubrió los temas necesarios para el uso adecuado del equipo

Cumplió con las expectativas

Excelente, muy detallado, aprendí mucho

Muy bueno, aprendí bastantes detalles para el cuidado del equipo

Fue bastante útil, muy buena explicación

Increíble, aprecio mucho lo que se pude aprender durante el mismo

Muy bien explicada y detallada toda la información. Se evacuaron todas las dudas de los participantes

Fue muy bueno

Excelente.

Muy provechoso para mi persona

7. ¿Considera útil el material suplementario que se brindó para el taller (programa del taller, unidad académica y presentación PowerPoint con la que se impartió la sesión teórica)?

9 respuestas

Si

Sí

Si, se puede tomar como una "guía" para la utilización del CAMAG

Si claro, es importante tener a mano un ejemplo analizado y completo para así aplicar y adaptar las herramientas que funcionan a otros análisis y métodos en los que se requiera.

Si, mucho

Sí, el material está bastante completo

Si



8. ¿Qué aspectos considera que se podrían mejorar para futuras actividades de este tipo?

8 respuestas

Avisar con tiempo, jaja. Tal vez hacerlo un poco más participativo

-

Que los aparatos estén buenos para poder dar el curso y el ejemplo que utilizamos correctamente (esto está fuera de las manos de él, el equipo estaba malo)

Tal vez trabajar las sesiones prácticas distintos días para tener más tiempo.

En general hacer más capacitaciones de este tipo y permitir que los estudiantes participen más en la parte práctica

Separar mejor lo que respecta al TFG y el método de HPTLC. Hubo momentos en que brinco entre uno y otro

Desarrollo de un análisis por el estudiante guiado por el tutor.

Consideraría que tal vez algo más interactivo o algún tipo de práctica para razonar cómo ajustar los parámetros de calibración para los métodos a utilizar

9. Haciendo uso del siguiente espacio de respuesta, adjunte cualquier comentario adicional sobre el taller.

6 respuestas

Realmente estuvo muy bueno y provechosa la info

Fue un taller muy completo, se aclararon las dudas.

Me encanta que tenga tanta paciencia para explicar y no se preocupaba por el tiempo si no más bien por enseñar

Considero importante que como explicó Keylor, el equipo sea utilizado por personal previamente capacitado para evitar daños al mismo.

N/A

Excelente para el aprendizaje de la técnica de HPTLC

Este contenido no ha sido creado ni aprobado por Google. [Denunciar abuso](#) - [Términos del Servicio](#) - [Política de Privacidad](#)

Google Formularios

