

Análisis de micotoxinas en cannabis y productos derivados

El mercado del cannabis ha crecido considerablemente a partir de la legalización para uso medicinal o recreativo en varios países. Se ha estimado que, sólo en EE. UU., las ventas de productos de cannabis superarán los dos mil millones de dólares en los próximos cuatro años y el potencial de mercado estimado en el Reino Unido es de más de ocho millones libras al año.

**R-BIOPHARM RHÔNE LTD.
Y R-BIOPHARM ESPAÑA S.A.**

A medida que aumentan las ventas de cannabis, también lo hace la cantidad producida en todo el mundo y en 2016 se estima que se alcanzaron las 200 toneladas. El cannabis puede contener compuestos tóxicos como pesticidas, patógenos y micotoxinas, por lo tanto, el análisis de cannabis y productos derivados es imprescindible para disponer de productos seguros y de alta calidad.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por mohos. Estas pequeñas moléculas pueden perdurar en las condiciones más desfavorables durante largos períodos de tiempo y se encuentran en casi todas partes, en cantidades extremadamente pequeñas. La formación de micotoxinas depende de las condiciones ambientales regionales y estacionales, como la disponibilidad de nutrientes, el contenido de humedad en el sustrato y el aire, la temperatura, el valor del pH y la interacción con otros mohos. Las micotoxinas más comúnmente conocidas son las Aflatoxinas, que se descubrieron a principios de la década de los sesenta.

Las micotoxinas en el cannabis no son un hallazgo reciente. De hecho, hubo una publicación que data de la década de los setenta que mostraba que, en condiciones favorables, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* podrían aparecer y producir Aflatoxinas en plantas de marihuana húmedas. Al parecer, hubo poco o ningún seguimiento de estas observaciones, probablemente porque en ese momento se referían a la presencia de micotoxinas en una sustancia ilegal. Sin embargo, la legalización del consumo de productos de cannabis hace necesario su control y dichos productos deben ser examinados en busca de contaminantes como las micotoxinas en la misma medida que se hace en los alimentos o los productos far-



macéuticos. Esto significa aplicar los mismos límites de seguridad para las micotoxinas que se aplican a los productos alimenticios y realizar un seguimiento de rutina para garantizar la ausencia de las mismas.

Existen regulaciones para el cannabis que detallan los límites máximos de residuos para varios contaminantes, incluidas las micotoxinas. Los niveles de Aflatoxinas totales oscilan entre las 4 ppb en Europa y Australia, y 20 ppb en EE. UU. y Canadá, mientras que solo EE. UU. tiene actualmente una legislación para la Ocratoxina A a 20 ppb. Estos límites no son muy diferentes de los niveles legislados que normalmente se aplican a los alimentos para el consumo humano directo. A menudo se encuentra que las Aflatoxinas y la Ocratoxina A coexisten, por lo que un enfoque de análisis múltiple de toxinas puede ser más rentable, y muchos laboratorios están considerando el análisis de múltiples analitos como una forma de reducir los costes asociados a estas determinaciones.

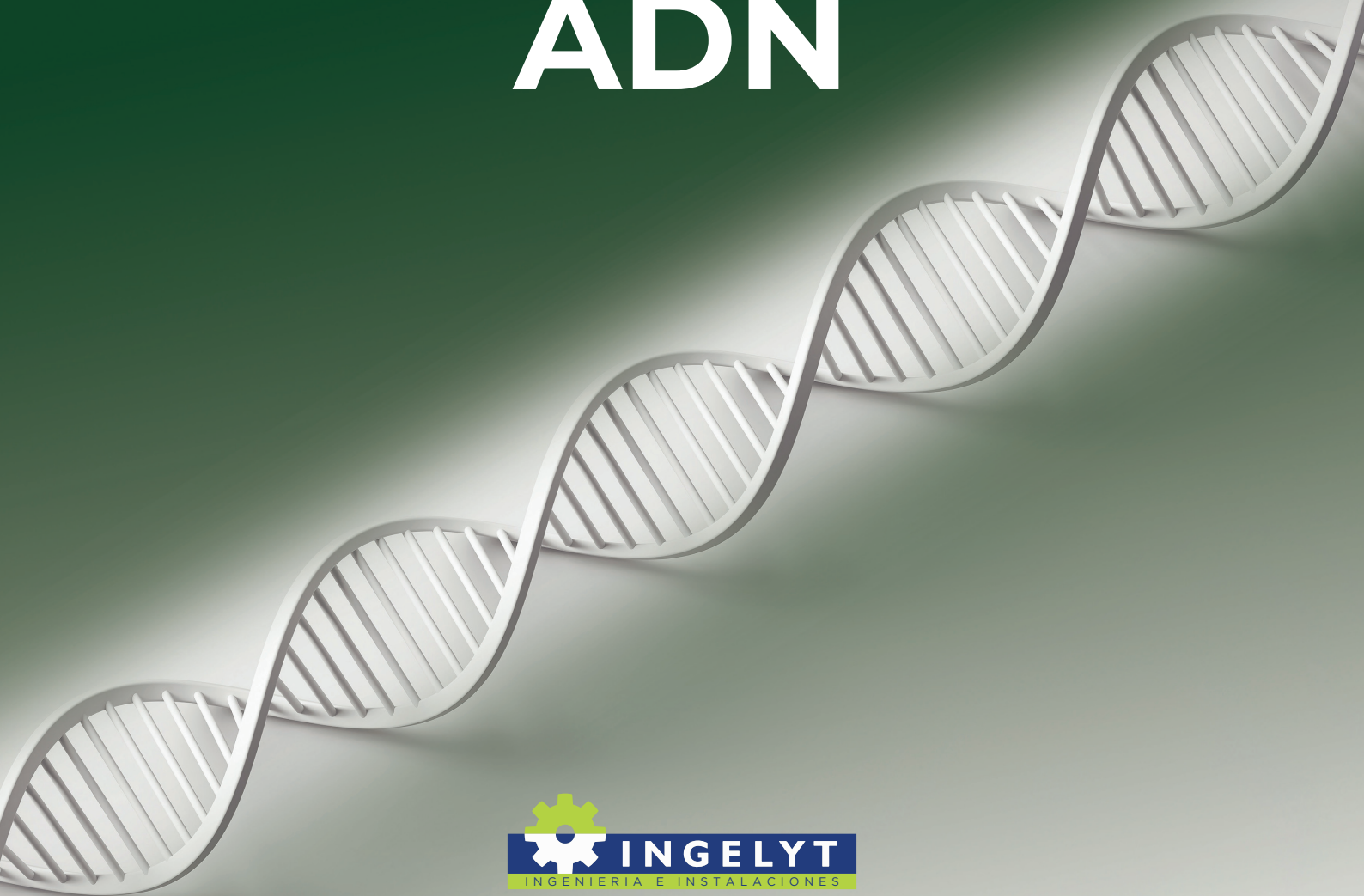
El cannabis y los productos de derivados pueden ser sólidos o líquidos, ya que en el mer-

cado hay disponible una amplia gama de productos. Estos productos contienen múltiples componentes, conocidos como efecto matriz, que pueden generar problemas a la hora del análisis. Las plantas de marihuana contienen clorofila y, dependiendo del disolvente de extracción utilizado, el extracto resultante puede tener un color verde muy intenso, que puede provocar problemas con la cromatografía. Además, los terpenos también están presentes en estas matrices. Dado que la matriz puede tener un efecto considerable en la calidad de los resultados obtenidos, es necesario asegurarse de que se emplea un método adecuado de extracción y de purificación de los extractos obtenidos. La eliminación de cualquier interferencia provocada por la matriz reducirá problemas tales como:

- Obstrucción del instrumental para la detección analítica.
- Resultados falsos positivos.
- Valores altos de %RSD, que indican poca precisión y reproducibilidad.
- Poca sensibilidad del método analítico.

Ingelyt & Grupo Lapeyra Taltavull

Con el mismo ADN



**Proyectos integrales en construcción de Salas Blancas
y equipamiento para el proceso de Sólidos y Estériles**



FABRICACIÓN
PROPIA



ALTO ESTÁNDAR
DE CALIDAD



EQUIPO
MULTIDISCIPLINAR



SEGURIDAD Y
MEDIO AMBIENTE



MÁQUINAS
Y EQUIPOS

Existen varias opciones disponibles para los laboratorios que analizan cannabis y productos derivados. La primera es usar métodos de inyección directa o diluir e inyectar. Por lo general, se usan en la detección por LC-MS/MS; sin embargo, se debe tener en cuenta que estos métodos son simples y que, en última instancia, los resultados podrían estar afectados por el efecto de matriz, que deberá corregirse mediante el uso de estándares internos marcados isotópicamente y, también, mediante la calibración con matriz. Esto no solo aumenta el coste de la determinación, sino que también aumenta el tiempo empleado en el análisis. Además, en la actualidad, existe una disponibilidad limitada de materiales de referencia específicos para el análisis de cannabis.

Las columnas de fase sólida también se emplean de manera habitual antes de la detección por LC-MS/MS. Se consideran una forma básica de purificación del extracto y, como resultado, se usan frecuentemente para el análisis de matrices simples, como ciertas muestras de cereales.

La utilización de la purificación por inmunoadfinidad es un método altamente específico. Estos métodos son particularmente adecuados para el análisis de muestras complejas, como el cannabis y productos derivados, ya que se eliminan todos los componentes que interfieren, lo que le brinda mayor confianza en el análisis y, en última instancia, ayuda a reducir el número de muestras cuyo análisis se debe repetir.

Por lo general, las columnas de inmunoadfinidad se utilizan en métodos oficiales, puesto que se han utilizado con éxito en varios ensayos colaborativos en los que se ha demostrado ampliamente que se pueden lograr resultados consistentes y fiables. Esto se debe a que las columnas de inmunoadfinidad contienen anticuerpos monoclonales específicos que aíslan y concentran selectivamente las micotoxinas de interés, eliminando de manera efectiva cualquiera de los componentes de la matriz que pueden interferir en el análisis. Las columnas de inmunoadfinidad se pueden utilizar para cualquier tipo de muestra y aportan notables ventajas con muestras complejas o extractos fuertemente coloreados como el de cannabis, ya que son la única forma de purificación que elimina por completo todas las interferencias de la muestra, lo que permite obtener extractos limpios.

La legalización del cannabis para uso recreativo y/o medicinal es relativamente reciente y,

por lo tanto, en la actualidad no existen métodos analíticos oficiales (por ejemplo, métodos CEN o AOAC) para el control de micotoxinas en el material vegetal y los productos de cannabis. A principios de 2019, la AOAC creó un grupo de trabajo relacionado con el cannabis, el Cannabis Analytical Science Program (CASP), lo que permite disponer de un foro donde se puedan discutir temas relacionados con el análisis del cannabis. Uno de los objetivos principales del grupo era considerar el desarrollo y la implementación de varios métodos oficiales para el análisis de contaminantes, incluidas las micotoxinas en el cannabis y productos derivados.

El análisis de micotoxinas es bastante complejo debido a la diversidad de la naturaleza fisicoquímica de las toxinas y las particularidades de las matrices de cannabis de las que se deben extraer las toxinas. El material vegetal está altamente pigmentado y contiene aceites. Las resinas de cannabis son materiales muy viscosos y los procedimientos de extracción y purificación deben ser capaces de extraer las toxinas y aislarlas, eliminando el efecto de la matriz.

Un artículo reciente de Greaves et al., en el Journal of AOAC International (1), describe la validación en un laboratorio de un método de purificación con columnas de inmunoadfinidad multitoxinas (AO ZON PREP®), previa a la detección por fluorescencia, para el análisis de Aflatoxinas y Ocratoxina A en cannabis: material vegetal, resinas, vaporizadores y productos comestibles. Las Aflatoxinas y la Ocratoxina A son moderadamente solubles en disolventes orgánicos polares como el metanol y el acetonitrilo. Para el análisis de productos de cannabis, en esta validación se describe un método que utiliza una extracción a base de acetonitrilo, que ayuda a controlar el alto contenido de aceite del material vegetal y los extractos de resina. Como ambas toxinas están legisladas y es posible una sola extracción para ambas, de manera simultánea, tiene sentido llevar a cabo el análisis instrumental de múltiples toxinas para minimizar el tiempo empleado en dichas determinaciones.

El método mostró una buena especificidad y sensibilidad, con recuperaciones que oscilaron entre el 77 % y el 99 % para las Aflatoxinas y entre el 64 % y el 94 % para la Ocratoxina A. Estos resultados están en consonancia con los requisitos de la UE para el análisis de Aflatoxinas y Ocratoxina A en alimentos.

Actualmente, no hay mucha información disponible sobre la contaminación por micotoxinas del cannabis en la bibliografía. Para au-

mentar el conocimiento, Buchicchio et al. En la publicación 'Mycotoxin Research' (2) investigaron la presencia tanto de Aflatoxinas como de Ocratoxina A en muestras de cannabis y resina de cannabis incautadas. Se analizó el contenido de micotoxinas en aproximadamente 150 muestras ilegales de cannabis, utilizando métodos de purificación mediante columnas de inmunoadfinidad para Aflatoxinas y Ocratoxina A antes de la detección por HPLC con fluorescencia. En este caso, se utilizaron columnas de inmunoadfinidad para la purificación por separado: AFLAPREP® y OCHRAPREP®. Las recuperaciones oscilaron entre el 60 % y el 90 % para valores entre 2 y 20 ppb. No se detectaron Aflatoxinas en las muestras, sin embargo, más del 30 % de las muestras contenían Ocratoxina A. Este artículo sugiere que se deben realizar más estudios, a mayor escala, y con tiempos de almacenamiento más prolongados, para confirmar los hallazgos. Además, se sugiere que sería interesante investigar si también pueden estar presentes otras micotoxinas o metabolitos secundarios.

Las columnas de inmunoadfinidad están disponibles desde hace muchos años, sin embargo, los requisitos de análisis están cambiando, por lo que ahora hay más columnas para análisis múltiple de toxinas como AFLACHRA RHONE® WIDE y AO ZON PREP®. La ventaja de emplear una purificación con columna de inmunoadfinidad es que, independientemente de la matriz, se sigue el mismo procedimiento analítico tras la purificación del extracto. Es necesario demostrar la eficacia de la extracción de las toxinas de la matriz pero, por lo demás, la versatilidad de la purificación con la columna de inmunoadfinidad garantiza la simplicidad y fiabilidad del análisis mediante HPLC o LC-MS/MS, sin interferencias de la matriz. El uso de columnas de inmunoadfinidad para múltiples micotoxinas también permite gestionar la creciente demanda analítica, manteniendo al mismo tiempo la calidad de los resultados, en particular para el cannabis y productos derivados, para determinar la presencia de las Aflatoxinas como de Ocratoxina A ●

Bibliografía:

- A. Greaves et al., 2021. Single-laboratory validation of an immunoaffinity column cleanup LC method for the analysis of aflatoxins and ochratoxin A in cannabis plant material, resins, vapes, isolates, and edible products. AOAC Int. Sep 27;104(5):1264-1271.
- L. Buchicchio et al., 2022. Investigation of aflatoxin and ochratoxin A contamination of seized cannabis and cannabis resin samples. Mycotoxin Res. Feb;38(1):71-78



*media partner
líder del sector*



energética



grupo-omnimedia.com

📍 Pollensa, 2 - Ed. Artemisa, Of. 12 • 28290 Las Rozas (Madrid) ☎ +34 916 308 591

✉ info@grupo-omnimedia.com 🖱 grupo-omnimedia.com